

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

23

"ESTUDIO SOBRE LOS CAMBIOS EN LA  
EXPRESION DE CADHERINA-E Y EL ACTIVADOR  
DE PLASMINOGENO TIPO UROCINASA EN UN  
MODELO DE HEPATOCARCINOGENESIS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A

M. EN B. ALEJANDRO NIETO RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DEL 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Gastroenterología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Director de Tesis:

Dra. Lourdes Rodríguez Fragoso

Comité Tutorial:

Dr. Tomás Mendoza Figueroa (†)

Dra. Lourdes Muñoz Moreno

Jurado de examen:

Dr. Saúl Villa Treviño

Dr. David Kershenobich Stalnikowitz

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dr. Mauricio Salcedo Vargas

Dr. Marco Antonio Meraz Ríos

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl

Mi eterno agradecimiento al:

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán  
(INCMNSZ)

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

y

a la Escuela de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
(UAEM)

Por el apoyo Institucional y mi más profundo respeto y cariño por su cobijo y  
respaldo.

Igualmente agradezco el apoyo recibido por el CONACyT a través de la beca de  
Doctorado

A Mary Paz y mis hijas Lizzet y Ana Karen por su eterno e  
incomparable amor, de no haber sido por ellas esta aventura ni siquiera  
hubiera comenzado.

A mis padres y a mis hermanos Jaime y Pili, quienes aunque lejos siempre han  
estado conmigo.

Deseo reconocer de manera muy especial a:

Mary Paz, Miriam y Violeta

Por su incondicional apoyo, amistad y comprensión en los momentos más difíciles  
de esta hazaña.

Al Dr. Rogelio Hernández por su tiempo y dedicación en el análisis histopatológico

Al Dr. Octavio Villanueva por su enorme disposición y voluntad en el manejo y cuidado de los animales durante el desarrollo de este proyecto

A Gaby compañera de mil batallas en el laboratorio

A Lety y Lulú por sus palabras de apoyo y su amistad sincera

A Sullivan por su apoyo y la oportunidad de seguir creciendo

A Dolores, Susana, Alejandro, Federico, Sandra y Heriberto por su compañerismo y amistad durante parte de esta larga travesía

*“ Este trabajo es el resultado de la suma de innumerables voluntades y esfuerzos, pero sobre todo, de una enorme perseverancia”*

ANR

## RESUMEN

En los últimos años el cáncer ha pasado a ser uno de los principales problemas de salud en México, en especial el cáncer de hígado, se presenta como una enfermedad con una gran tasa de mortalidad debido entre otras cosas al grado de avance al momento de su diagnóstico. El cáncer de hígado se encuentra estrechamente asociado a infecciones causadas por el virus de la hepatitis B y C, además de la cirrosis hepática provocada por el consumo excesivo de alcohol.

En este trabajo implementamos un modelo experimental en ratas de hepatocarcinogénesis química, inicialmente desarrollado por Solt-Farber. Este modelo desarrollado durante 12 meses, nos permitió dar seguimiento a las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis, además del estudio de muestras biológicas de los animales en cada una de estas etapas. El esquema de carcinogénesis incluyó el empleo de dietilnitrosamina (DEN) (agente inductor), 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) (promotor selectivo), tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (promotor generalizado) y fenobarbital (activador del metabolismo hepático).

Las primeras lesiones neoplásicas características del carcinoma hepatocelular bien diferenciado (CHC) se registraron al inicio del segundo trimestre del modelo. De los marcadores bioquímicos determinados para dar seguimiento al daño hepático, la enzima que mejor correlación mostró con las lesiones hepáticas fue la gamma-glutamil transepsidasa.

De los múltiples procesos biológicos que involucran el desarrollo del cáncer, la disminución de la adhesión celular y el incremento en la proteólisis son dos eventos que se relacionan directamente con la agresividad de los tumores. En este trabajo estudiamos la cinética de expresión de la cadherina-E (una proteína de adhesión) y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) (enzima proteolítica), durante el desarrollo de la hepatocarcinogénesis. Los niveles de expresión de cadherina-E a nivel de ARNm se mantuvieron en niveles constantes durante el inicio y desarrollo de la carcinogénesis. Mientras tanto, el uPA mostró un incremento en sus niveles de expresión, a nivel de ARNm y de proteína, comparado con los niveles basales, localizándose este incremento en los espacios porta y los nódulos neoplásicos principalmente.

El incremento del uPA lo podemos relacionar con tres eventos: a) en el primer trimestre, con un efecto mitogénico, b) en el segundo trimestre, con un posible incremento de la proteólisis en los nódulos neoplásicos y c) en el último trimestre, con la dilatación y proliferación de conductos biliares y vasos sanguíneos (angiogénesis).

Existen datos contundentes que relacionan al uPA con los procesos de invasión y metástasis, sin embargo, no existe información acerca de su papel en el inicio y desarrollo de la carcinogénesis. Por lo que es necesario seguir estudiando y evaluando su cinética de expresión y su actividad en los procesos neoplásicos.



## SUMMARY

In the last years the cancer has passed by to be one of the main health problems in Mexico. In special the liver cancer, is presented oneself as an illness with a great mortality measure owed principally to the advance degree to the moment of its diagnostic. The liver cancer is met tightly associate to caused infections by the virus of the B hepatitis and C, besides the provoked hepatic cirrhosis by the alcohol of excessive consumption.

In this works we used an experimental model in rats of chemical hepatocarcinogenesis, initially developed by Solt-Farber. This models was developed during 12 month, we took the liberty yield following to the different stages of the carcinogenesis process, moreover of the biological samples studied of each one stages. The carcinogenesis schema included the employ of dietilnitrosamine (inducing agent), 2-acetilaminofluorene (2-AAF) (selective promoter), carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (generalized promoter) and fenobarbital (activator of the hepatic metabolism).

The first neoplastic injuries characteristics of the hepatocellular carcinoma well differentiated (HCC) is registered to the initiates of the second trimester of the model. Of the determinate biochemistry markers for yield following to the hepatic damage, the enzyme that better correlation showed went the gamma-glutamyl tranpeptidase.

Of the multiple biological process that introduces irrelevantly the development of the cancer the diminution of the cellular adhesion and the increment in the proteolysis is two events that are related directly with the aggressiveness of the tumors. In this work we studied the expression kinetics of the E-cadherin (an adhesion protein) and of the urokinase-type plasminógen activator (uPA) (proteolytic enzyme), during the development of the hepatocarcinogenesis. The expression levels of E-cadherine mRNA level to its keep in constants levels during the initiates and development of the carcinogenesis. Meanwhile, the uPA showed an increment in its expression levels, perfectly level of ARNm and of protein, compared with the basal levels, founded this increment in the portal spaces and the neoplastic nodules principaly.

The increment of the uPA we can relate with three events: a) In the first trimester, with a mitogenic effect, B ) in the second trimester, with a possible increment of the proteolysis in the neoplastic nodules and C ) in the last trimester, with the expansion and proliferation of biliary ducts and sanguineous vessels (angiogenesis).

Exists contusive data that relates to the uPA with the invasion process of and metastatic, however, don't exist information to near its paper in the initiates and development of the carcinogenesis. By what be necessary continue being a student and evaluating its expression kinetics and its activity in the neoplastic process.

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	1
Características generales del tejido hepático	1
Cáncer de hígado	3
Estudios bioquímicos de la actividad hepática	6
Modelo experimental de hepatocarcinogénesis	7
Invasión y metástasis el sello de la malignidad	10
La cadherina-E y el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA), proteínas esenciales en los procesos de invasión y metástasis.	11
<b>ANTECEDENTES</b>	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>HIPÓTESIS</b>	25
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	25
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	25
<b>METODOLOGÍA</b>	
Modelo Experimental	26
Producción de anticuerpos anti-uPA	29
Análisis morfométrico e inmunohistoquímico	29
Determinación de la actividad enzimática como marcadores bioquímicos de la función hepática	31
Extracción del ARN total y ensayo de RT-PCR	31
Análisis Estadístico	33

<b>RESULTADOS</b>	34
Análisis histopatológico	37
Distribución del uPA en el tejido hepático	41
Estudio de la función hepática	45
Análisis de la expresión del uPA y la cadherina-E a nivel de ARNm	47
<b>DISCUSIÓN</b>	
Cáncer de hígado	51
<i>Modelo experimental de hepatocarcinogénesis</i>	51
Características histopatológicas del modelo experimental	53
Manifestaciones clínicas	53
Efecto directo de los compuestos carcinogénicos en la histopatología del modelo de hepatocarcinogénesis	57
Actividad de las enzimas hepáticas en el desarrollo del modelo	58
Expresión del uPA en el modelo experimental	60
Expresión de la cadherina-E a nivel de ARNm en el modelo	65
<b>CONCLUSIONES</b>	68
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	70

## FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Evolución de las lesiones hepáticas durante el desarrollo de la hepatocarcinogénesis	9
<b>Figura 2</b>	Esquema del gen y la proteína de cadherina-E	14
<b>Figura 3</b>	Moléculas involucradas en la activación de la cascada proteolítica del uPA	17
<b>Figura 4</b>	Modelo experimental de hepatocarcinogénesis	27
<b>Figura 5</b>	Procesamiento de las muestras biológicas	28
<b>Figura 6</b>	Estudio histopatológico de muestras de hígado de rata durante el desarrollo del modelo de hepatocarcinogénesis	39
<b>Figura 7</b>	Expresión y localización del uPA durante el desarrollo del modelo de hepatocarcinogénesis	42
<b>Figura 8</b>	Análisis de la cinética y distribución celular del uPA	44
<b>Figura 9</b>	Análisis de la función hepática	46
<b>Figura 10</b>	Niveles de expresión del ARNm del uPA y la cadherina-E	48

## TABLAS

<b>Tabla I</b>	Peso promedio y mortalidad de los animales utilizados modelo experimental	35
<b>Tabla II</b>	Tamaño y porcentaje de las lesiones hepáticas en los animales tratados	36

## PIES DE FIGURA

<b>Figura 6</b>	40
<b>Figura 7</b>	43
<b>Figura 10</b>	49

## INTRODUCCION

### Características generales del tejido hepático

Desde los primeros estudios relacionados con la inducción de tumores realizados por Yoshida en 1932, el hígado ha sido uno de los principales órganos estudiados en investigaciones oncológicas (1).

En condiciones fisiológicas el 80% de los hepatocitos son morfológicamente homogéneos, sin embargo, existen diferencias funcionales bien caracterizadas de acuerdo a su localización en el tejido hepático. Las células del hígado incluyen hepatocitos, células sinusoidales, principalmente células endoteliales y células de Kupffer, células de Ito y células pit (2). Los hepatocitos son células poliédricas con tres diferentes tipos de superficie, una superficie peri sinusoidal con muchas micro vellosidades, otra superficie canaliculo biliar y la superficie contigua a otro hepatocito. Los núcleos hepatocelulares son redondos; el tamaño puede variar especialmente con la edad. Cerca del 15% del total de hepatocitos pueden presentarse como células tetranucleadas. Las células hepáticas, en etapa adulta tienen bajo índice mitótico. El citoplasma es eosinofílico y granular, dependiendo del estatus funcional, pueden aparecer vacuolas de glucógeno o de lípidos (3).

La unidad estructural básica del hígado es el lobulillo hepático, estructura hexagonal orientada alrededor de la vena central o vena hepática. Este concepto, fue propuesto principalmente por Rappaport, quien desarrolló el esquema básico del lobulillo hepático teniendo la tríada portal como su centro (2,4). La estructura formada por la vena central, la vena porta y la arteria hepática, junto con los hepatocitos situados entre éstas, se conoce como acino hepático. El concepto de acino hepático muchas veces permite entender mejor el mecanismo de las enfermedades hepáticas y su relación con los cambios morfológicos producidos por estas enfermedades.

El acino es la unidad funcional del hígado y conceptualmente es una masa de parénquima dependiente del aporte sanguíneo proporcionado por la circulación portal (5). El parénquima del acino hepático es dividido de manera arbitraria en tres zonas: (1) periportal, (2) mediolobulillar, y (3) centrolobulillar (3). La zona periportal o zona 1 se encuentra más cerca del aporte vascular, la zona peri venosa o zona 3 se localiza cercana a la vena hepática y la zona mediolobulillar o zona 2 se encuentra intermedia entre ambas. Esta división entre las diferentes zonas no puede ser identificada por métodos histológicos, pero se refleja en su presión sanguínea, aporte de oxígeno, suplemento de nutrientes y grado de actividad enzimática.

Variaciones en estos factores explican por que muchas lesiones tóxicas tienen una distribución zonal. Hepatocitos de la zona 1 (Z1) se encuentran expuestos a sangre con mayor aporte de oxígeno y nutrientes, además de contar con un número mayor de mitocondrias. Las células de la zona 3 (Z3) tienen un aporte de oxígeno y sustratos más reducido, además de contar con un contenido enzimático mayor, como es el caso de las enzimas citocromo P-450, epóxido hidrolasa y glutathion transferasa. Debido a sus diferencias en contenido enzimático y estructura subcelular los hepatocitos de la zona 1 y la zona 3 del parénquima hepático presentan diferencias en su capacidad metabólica. Por lo cual, se puede hacer una división zonal de acuerdo al metabolismo (6).

Zona 1.- Metabolismo energético oxidativo con  $\beta$ -oxidación, catabolismo de aminoácidos, urea génesis, gluconeogénesis, síntesis de colesterol y formación de bilis.

Zona 3.- Glucólisis, liponeogénesis, síntesis de glucógeno a partir de glucosa, cetogénesis, formación de glutamina y metabolismo de xenobióticos.

Debido a su localización intermedia los hepatocitos de la Z2 representan una fase de transición metabólica entre la Z1 y la Z3.

Cada célula hepática es capaz de realizar múltiples actividades metabólicas; la actividad enzimática prevalente en los hepatocitos es el resultado de una adaptación al micro ambiente regulada por la micro circulación hepática. Cambios patológicos en la estructura y la circulación pueden causar un cambio enzimático de una zona acinar a otra.

Las principales enzimas que metabolizan drogas se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos (también llamado microsoma hepático), además de las enzimas presentes en las mitocondrias, el citosol y en los lisosomas (3).

De los procesos de biotransformación realizados en el hígado el sistema enzimático del citocromo P450, juega un papel trascendental. Las enzimas de este sistema representan los catalizadores biológicos más versátiles y se encuentran localizadas en la membrana del retículo endoplásmico liso de las células del hígado. Las principales reacciones bioquímicas que catalizan son reacciones de oxidación y la característica común es la conversión de substratos lipofílicos a metabolitos más hidrofílicos (7).

Aunque originalmente este sistema enzimático se conoce por su principal actividad que es la detoxificación, ahora se sabe que puede metabolizar muchas drogas y activar compuestos procarcinogénicos, que pueden iniciar procesos de carcinogénesis. Un ejemplo de esta activación metabólica es la biotransformación del compuesto hepatocarcinogénico, 2-acetilaminofluoreno (8), empleado en nuestro modelo experimental.

La gran susceptibilidad del hígado al daño por agentes químicos es una consecuencia del papel que juega este órgano en el metabolismo de sustancias extrañas. La susceptibilidad de cada individuo al daño hepático por compuestos químicos varía de acuerdo a la edad, al sexo, el estado nutricional, la exposición a otras drogas, la presencia de enfermedades sistémicas y a otros múltiples factores.

### **Cáncer de hígado**

El cáncer de hígado es el tipo de cáncer más común a nivel mundial. Las zonas endémicas con mayor prevalencia de cáncer de hígado son Asia y África, con un 20 a 30% del total de los cánceres registrados en los países de esos continentes. Mientras que en Europa y Norte América no sobrepasa el 2% del total de neoplasias. Una característica bastante particular, es la elevada frecuencia de este cáncer en el hombre con una relación 6:1 entre los géneros masculino:femenino. La razón de la prevalencia y la mejor supervivencia del género femenino no

es clara. Sin embargo, la predominancia del género masculino se explica en parte por que el alcoholismo, las enfermedades crónicas del hígado, y en particular las infecciones crónicas del virus de la hepatitis B y C (HBV y HCV), se presentan con mayor frecuencia en los hombres que en las mujeres (4).

Las lesiones hepáticas benignas más comunes son los hemangiomas. Mientras que los tumores primarios malignos en hígado, pueden presentarse básicamente en dos diferentes formas, como carcinoma hepatocelular (CHC) o colangiocarcinoma. Desde el punto de vista patobiológico, el cáncer hepatocelular en humano es una enfermedad heterogénea con una etiología que puede ser relacionada a varios agentes y diferentes condiciones.

A pesar de que como se mencionó anteriormente existe cierta prevalencia en cuanto al sexo, las causas exactas del desarrollo del cáncer primario de hígado aún no se encuentran bien establecidas. Sin embargo, en adultos existen factores que incrementan la posibilidad de desarrollar cáncer hepático. Estos factores incluyen:

- Ser del género masculino.
- Tener más de 50 años
- Encontrarse expuesto a sustancias con un gran potencial carcinogénico, como las aflatoxinas
- El uso de estrógenos orales como método anticonceptivo.
- Padecer hemocromatosis hereditaria
- Exposición a los virus de hepatitis B y C
- Padecimiento de cirrosis.

El conjunto de síntomas en el caso de carcinoma hepatocelular puede ser insidioso o repentino. Usualmente años de deterioro en la salud pueden ser atribuibles a una enfermedad crónica del hígado, antes de que aparezcan síntomas agudos tales como dolor abdominal o ictericia. La mayoría de los pacientes con CHC presentan molestia o dolor abdominal, anorexia, baja de peso, náuseas, fiebre e ictericia (9). Los signos clínicos son más evidentes cuando se presenta



hepatomegalia, muchas veces con una masa hepática palpable, ictericia, líquido de ascitis y distensión de las venas abdominales. Muchas de estas características se presentan debido en parte a una cirrosis hepática previa al cáncer de hígado. El curso de la enfermedad varía de paciente a paciente, pero en general su desenlace es rápido con promedio de vida de seis a ocho meses (10).

El desarrollo del cáncer hepático en seres humanos puede tomar varios años y progresar hasta etapas consideradas malignas como la invasión y la metástasis. La historia natural de los tumores malignos del hígado, puede dividirse en cuatro fases: a) daño a nivel de ADN en células blancas, b) crecimiento de células transformadas, c) invasión local, d) metástasis distante (11). El carcinoma hepatocelular puede diseminarse por invasión directa, sobre todo si se encuentra en contacto directo con órganos adyacentes como riñones o el diafragma. La invasión a través de la vena hepática o los conductos biliares son comunes. Sin embargo, el principal órgano que invade es el pulmón además de los nódulos linfáticos abdominales (10).

En tejidos no proliferantes como el hígado, un paso limitante para el inicio del proceso de la carcinogénesis puede ser la proliferación celular. En este órgano las células ovoides son consideradas células indiferenciadas con un gran potencial para progresar a hepatocitos o a colangiomas; éstas mismas células se consideran que pueden ser el origen de algunos carcinomas hepáticos inducidos químicamente. Desde el punto de vista *embriológico*, esta idea es atractiva debido a que los hepatocitos y los conductos biliares tienen un origen común en el divertículo hepático (9). Sin embargo, la etiología a nivel molecular no ha sido aún definida, ya que no existe ninguna asociación específica entre la activación de algún oncogen o la pérdida de un gen supresor en carcinoma hepatocelular, demostrada hasta ahora (12,13).

## Estudios bioquímicos de la actividad hepática

Las manifestaciones clínicas y bioquímicas del daño hepático reflejan parte del daño histológico. Las llamadas Pruebas de Funcionamiento Hepático (PFH's) son utilizadas en la evaluación y manejo de pacientes con alguna enfermedad hepática. Estas representan un método sensible y no invasivo para la evaluación de las disfunciones hepáticas. Los ensayos bioquímicos en pacientes con enfermedad del hígado son necesarios para asegurar el diagnóstico, estimar la severidad del daño, asegurar un pronóstico y evaluar la terapia (14).

El uso de las pruebas de funcionamiento hepático en conjunto, hacen de éstas una herramienta con mayor especificidad y sensibilidad en el diagnóstico. Usadas apropiadamente pueden contribuir a confirmar la impresión clínica. Ninguna de estas pruebas, de manera aislada pueden proporcionar datos suficientes para establecer un diagnóstico. Por lo que es necesario utilizarlas en conjunto, en donde cada una de ellas deberá de reflejar un parámetro diferente de la función hepática (15).

Existen una serie de pruebas bioquímicas para evaluar la funcionalidad del hígado. Estas pruebas se pueden agrupar de la siguiente manera:

- a) Pruebas de capacidad de transporte de aniones orgánicos y metabolismo de drogas. En este grupo podemos encontrar la determinación de bilirrubinas.
- b) Pruebas que detectan daño hepático
- c) Pruebas que determinan la capacidad biosintética del hígado. La determinación de proteínas totales es una de ellas.
- d) Pruebas que detectan infecciones o alteraciones inmunológicas.

Dentro de las pruebas que detectan daño hepático se encuentran los ensayos enzimáticos, los cuales se pueden agrupar en dos categorías: 1) enzimas cuya elevación en suero refleja daño generalizado a hepatocitos y 2) enzimas cuya elevación en suero reflejan probable colestasis. La colestasis se refiere a la falla de los conductos biliares *per se*, lo cual va acompañado de acumulación de sustancias en la sangre normalmente excretadas en la bilis (4)

Los niveles anormales de bilirrubinas, fosfatasa alcalina, aminotransferasas y proteínas totales pueden detectarse tanto en pacientes con cirrosis como aquellos con carcinoma hepático, por lo que ninguna de estas dos enfermedades se puede diagnosticar solamente por la alteración de los niveles normales de estas pruebas de laboratorio.

Pacientes que padecen de cirrosis y presenten cambios repentinos en los valores de algunas de estas moléculas sugieren la complicación hacia cáncer, particularmente en el caso de la fosfatasa alcalina.

El diagnóstico definitivo se apoya en la determinación de otros marcadores séricos como la alfa feto proteína y en exámenes de gabinete como las técnicas de imagenología (10). Además de la sintomatología relacionada directamente con el cáncer hepático, también se presentan cambios metabólicos que incluyen la hipoglucemia, debido al incremento del metabolismo de la glucosa por parte del tumor; hipolipidemia probablemente debido a la incontrolable colesterogénesis; incremento en la AFP, macroglobulinemia y porfiria.

### **Modelo experimental de hepatocarcinogénesis**

El uso de modelos experimentales en el estudio del cáncer, ha permitido reducir el tiempo de aparición de las lesiones neoplásicas, homogenizar el tipo de lesiones e incrementar la incidencia de estas. A través de ellos ha sido posible conocer parte de los mecanismos del control genético del cáncer, de los mecanismos de iniciación y progresión tumoral, y comenzar el estudio del proceso de invasión y metástasis (11, 8).

Los primeros modelos de carcinogénesis en animales se remontan a más de 50 años. En estos, se desarrollaron estudios con papiloma de piel en ratones, utilizando compuestos aromáticos policíclicos como inductores del cáncer (16).

De los modelos experimentales de hepatocarcinogénesis descritos en la literatura existen dos modelos muy representativos. Uno es el hepatoma transplantable de Morris, en donde se muestra claramente la variabilidad en las etapas finales de la carcinogénesis. El otro es el modelo de Farber, el cual contempla principalmente el estudio de la progresión tumoral basado

en la comparación de lesiones precursoras tempranas con el desarrollo de carcinoma hepatocelular (17). Existen otros modelos de hepatocarcinogénesis, los cuales emplean hepatectomía parcial; estos han sido utilizados para determinar la fase de la replicación celular en la cual los hepatocitos son más sensibles al efecto de inducción del cáncer.

En el modelo de Solt-Farber (18), los hepatocitos alterados, resistentes a efectos inhibitorios de la proliferación celular por parte de agentes carcinogénicos, son inducidos por la exposición a una dosis única de un carcinógeno severo que actúa como iniciador (dietilnitrosamina-DEN). Las células transformadas, proliferan de manera lenta. Su capacidad para metabolizar drogas se ve alterada a nivel de la biodisponibilidad, el tiempo de vida media en circulación, la conjugación y el metabolismo. Afectando en consecuencia la farmacocinética de las drogas. En ocasiones, esta transformación se manifiesta como una resistencia al efecto inhibitorio de un carcinógeno. La naturaleza de esta “resistencia” en las lesiones hiperplásicas no es bien conocida, pero en parte puede derivarse a la reducida capacidad para procesar agentes tóxicos o la deficiencia de ciertas enzimas necesarias para la activación metabólica de estas toxinas (19).

Estos hepatocitos “resistentes” son precursores potenciales para el desarrollo del cáncer de hígado, pero no han adquirido la propiedad de crecimiento autónomo. Los hepatocitos “resistentes” son seleccionados a desarrollarse dentro de nódulos, por exposición por dos semanas a una dieta conteniendo acetil aminofluoreno (2-AAF). Además del tratamiento con un estímulo generalizado de la proliferación, tal como una dosis necrogénica de tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Después de esto las células tienen la capacidad de proliferar rápidamente hasta desarrollar nódulos hiperplásicos (20). De acuerdo a la modificación hecha por Lans (21), los animales se mantiene con un suministro constante de fenobarbital (FB). El fenobarbital incrementa el número de células alteradas al favorecer la transformación de “células tumorales latentes” a células realmente malignas, en un proceso de “propagación”. Bajo este esquema se asegura el desarrollo de cáncer hepático (Ver Figura 1).

En el proceso de hepatocarcinogénesis distintos focos o nódulos premalignos se desarrollan en el hígado antes de la aparición del carcinoma hepatocelular. Como lo indica Solt-Farber, un

COMPUESTO	CAUSA	EFEECTO
DEN Dietilnitrosamina <i>INDUCTOR</i>	Alteración en células hepáticas a nivel de DNA.	Células iniciadas
2-AAF 2-Acetilaminofluoreno <i>PROMOTOR SELECTIVO</i>	Induce la proliferación diferencial de las células iniciadas	Nódulos preneoplásicos
Tetracloruro de carbono <i>PROMOTOR GENERALIZADO</i>	Induce la proliferación de las células hepáticas	Incremento en el tamaño y número de nódulos preneoplásicos.
Fenobarbital <i>ACTIVADOR</i>	Promueve la activación del metabolismo hepático	Disminuye el tiempo de transformación de las lesiones preneoplásicas a neoplásicas.

**FIGURA 1. EVOLUCION DE LAS LESIONES HEPÁTICAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA HEPATOCARCINOGENESIS.**

carcinógeno no induce a una célula neoplásica, sino más bien son células precursoras no neoplásicas las cuales sufren transformación a neoplasias.

En el modelo de Solt-Farber las células hepáticas iniciadas que pueden ser seleccionadas parecen estar azarosamente distribuidas sin ninguna predilección por una u otra zona del acino hepático. En este esquema la replicación celular es un punto clave en el inicio y desarrollo del cáncer en el hígado (8). En éste, se induce el crecimiento de numerosos focos locales positivos a la actividad de la enzima gama glutamil transpeptidasa (GGT); muchos de estos progresan a nódulos hiperplásicos y a carcinoma hepatocelular.

### **Invasión y metástasis, el sello de la malignidad en la carcinogénesis (hepatocarcinogénesis)**

La característica fundamental de las células cancerosas es la pérdida de su capacidad para controlar el crecimiento y división. En cualquier parte del cuerpo pueden originarse grupos de células que proliferen de forma anormal. De éstos, los que no pueden invadir los tejidos vecinos y permanecen estrictamente localizados reciben el nombre de tumores benignos; los que invaden y se diseminan reciben el nombre de tumores malignos.

No todas las células que le dan forma a un tumor presentan características funcionales semejantes, aún cuando su origen celular sea el mismo. Así, tenemos que células aisladas de un mismo tumor muestran diferencias con respecto a su manera de crecer, su cariotipo, sus receptores de superficie celular, la expresión de lectinas, inmunogenicidad, respuesta a drogas citotóxicas y capacidad invasiva y metastásica (22).

La metástasis resulta ser la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con cáncer. Algunos tratamientos como la cirugía, la quimioterapia y radioterapia pueden curar aproximadamente al 50% de los pacientes que desarrollan tumores malignos. Desde ese punto de vista lo más importante es que el cáncer se detecte y se extirpe antes de que inicie la metástasis (23).

Una de las principales características del comportamiento de las células tumorales metastásicas es la tendencia a cruzar compartimentos tisulares cercanos y mezclarse con diferentes tipos celulares. Es probable que durante el crecimiento de un tumor éste desprenda células malignas a la circulación, lo cual no siempre desemboca en la formación de metástasis.

La gran heterogeneidad de las subpoblaciones celulares en el tumor primario junto con las pocas células con capacidad para metastatizar, hacen suponer que el número de células invasoras es pequeño y que la inmensa mayoría de las células malignas que se desprenden al torrente sanguíneo mueren posteriormente. Sin embargo, aún cuando en porcentaje el número de células con capacidad real de invadir y metastatizar es bajo, recordemos que sólo se requiere de una sola célula para formar una masa tumoral independiente.

Por todo lo anterior, resulta muy importante estudiar las principales características de las células con capacidad para invadir y metastatizar a otros tejidos u órganos, el cual representa aproximadamente el 1% del total de células de un tumor primario sólido.

### **La cadherina-E y el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA), proteínas esenciales en los procesos de invasión y metástasis.**

Los procesos de invasión y metástasis del cáncer engloban una compleja serie de pasos secuenciales que involucran ciertas propiedades de las células tumorales y del huésped, entre ellas la proteólisis enzimática, la capacidad motriz de las células tumorales y la adhesión celular. En realidad, ninguna de estas propiedades son exclusivas de las células neoplásicas, es claro que las diferencias entre los procesos fisiológicos de migración celular y la naturaleza patológica de la invasión se basan principalmente en los mecanismos de regulación de estas propiedades.

La invasión y la metástasis pueden ser facilitadas por proteínas que estimulan: a) la liberación de células tumorales, b) la unión de estas células a células huésped o elementos de la matriz extracelular, c) la proteólisis por parte de las células neoplásicas hacia la barrera del huésped para facilitar la invasión, d) la locomoción celular, y e) la formación de colonias de células transformadas en el órgano blanco. El entendimiento de los factores que controlan

esencialmente el proceso celular hacia el fenotipo invasivo debe permitir la identificación de nuevas estrategias en la terapéutica para la prevención y tratamiento de la formación de las metástasis.

Los tumores malignos presentan desarreglos en la arquitectura del tejido lo que se ha atribuido a alteraciones en la adhesión celular (24). Esta pérdida en la adhesividad intercelular en células cancerosas es debida, en parte, a cambios funcionales en las uniones célula-célula. Cualquier cambio significativo en la expresión o en la estructura de alguno de los componentes esenciales de las uniones adherentes producen un desensamble y consecuentemente más células móviles del carcinoma invasivo (25). Productos de oncogenes tales como *src*, *ras*, *fos* y *met* se ha demostrado que desestabilizan la unión intercelular (26).

Aparentemente las células malignas dejan de modular la adhesividad intercelular como pre requisito para el comportamiento invasivo (27). Varias moléculas han sido estudiadas por su posible asociación con la invasión y diseminación de los tumores, entre estas se encuentran las integrinas (28), selectinas (29), CD44 (30) y las moléculas de adhesión homotípicas (CAM's).

Entre estas últimas se encuentran las cadherinas, una familia de glicoproteínas transmembranales responsables de la adhesión intercelular dependiente de calcio (31). Estas proteínas se encuentran codificadas en genes que están estrechamente localizados uno de otro en los cromosomas 5, 16 y 18 principalmente (32).

Las cadherinas son glicoproteínas de membrana que constan de 723 a 748 aminoácidos (33), constituidas por un dominio carboxiloterminales altamente conservado, un dominio transmembranal y un dominio extra celular constituido por cinco sub dominios repetidos. Los sub dominios son enumerados de C1-C5 (en donde C1 es el más distante a la membrana celular) (34). Ver Figura 2A.

La proteína cadherina-E es uno de los miembros de esta familia, ha sido caracterizada ampliamente en los laboratorios de Takeichi, Edelman, Kemler entre otros (35, 36). La cadherina-E, también llamada ovomorulina (ratón), L-CAM (gallina) y ARC-1, es una glicoproteína transmembranal de aproximadamente 120 kDa (37), localizada principalmente en la unión de la *zonula adherents*.



La cara basolateral de las células contienen dímeros de cadherinas, los que a su vez se asocian con los dímeros contiguos, presentes en la membrana de las células adyacentes. Esta interacción dimérica genera una estructura en forma de “zipper” que permite la adhesión intercelular y homotípica de las células (Figura 2 A y B) (38, 39). La región citoplásmica de la molécula de cadherina posee sitios de reconocimiento para las cateninas, moléculas que interaccionan con la red de filamentos de actina y otras proteínas citoplásmicas y transmembranales (Figura 2C) (35).

La unión célula-célula a través de la cadherina-E es dependiente de calcio a nivel de su dominio extracelular (40, 41). El sistema de unión intercelular cadherina-cateninas formado a partir de la unión del dominio carboxilo citoplásmico de cadherina-E está asociado con las cateninas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (36, 42, 43). La cadherina se une directamente con las catenina  $\beta$  y  $\gamma$ , mientras que su unión con la catenina- $\alpha$  es a través de un complejo con la actina del citoesqueleto.

El gen de la cadherina-E humana (CDH1) está situado en el cromosoma 16q22.1, dentro de un grupo grande de genes altamente conservados que incluye el locus para heptaglobina, quimotripsinógeno B, metalotionina-1 y -2, tirosin amino transferasa y lectin:colesterol acetil transferasa (44 - 46). El gen de cadherina-E humano consiste de 16 exones en un rango de tamaño de entre 115 a 2245 pb (Figura 2D). Posee un intrón que ocupa más del 50% de la longitud total del gen (65 kb de 100 kb totales)

Datos obtenidos experimentalmente consolidan la correlación observada entre la pérdida de la expresión de cadherina por parte de las células epiteliales, la adopción de la morfología fibroblastoide y el incremento en la progresión tumoral (47). Tumores con morfología epitelial conservada, clasificados como bien diferenciados expresan gran cantidad de cadherina, no así los tumores con morfología alterada, clasificados como dediferenciados los cuales reducen la cantidad de moléculas expresadas (48). En un estudio inmunohistoquímicos en tejido

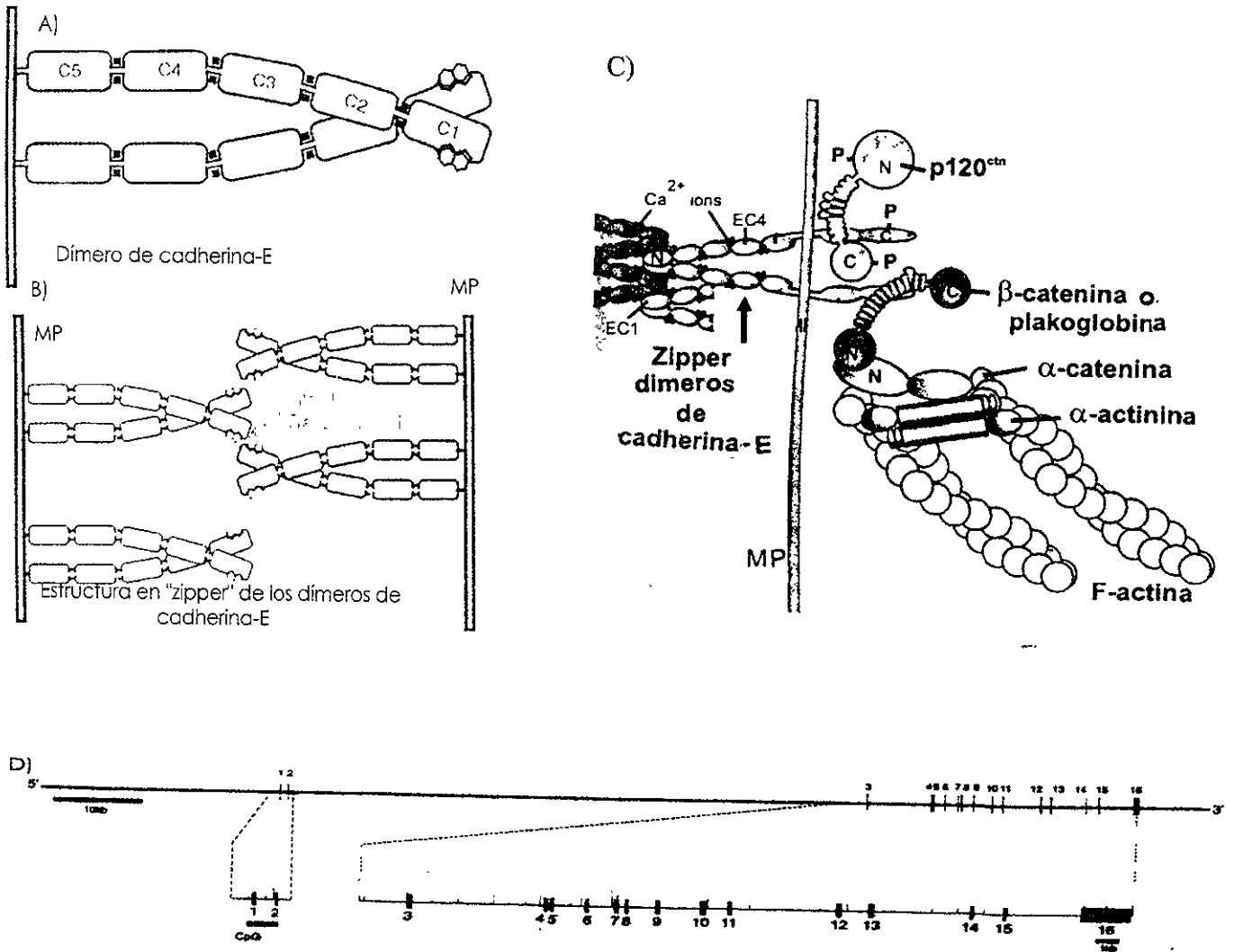


FIGURA 2 ESQUEMA DEL GEN Y LA PROTEINA DE CADHERINA-E.

- Formación de un dímero de cadherina-E en moléculas contiguas. Los subdominios de la región extracitoplásmica se representan como C1-C5
- Estructura en forma de "zipper" entre células adyacentes; estas estructuras forman parte importante de la llamada *zonula adherens*. MP, membrana plasmática.
- Esquema de las proteínas involucradas en el complejo cadherina-E, cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y p120<sup>ctn</sup>) y citoesqueleto ( $\alpha$ -actinina y F-actinina).
- Representación esquemática de la posición de los exones dentro del gen de la cadherina-E.

canceroso, se demostró que la expresión de cadherina-E se redujo hasta en un 45% en cáncer de esófago (49), estómago (50) y mama (51).

La expresión de cadherina-E se encuentra estrechamente ligada con la diferenciación celular e invasión sabiéndose que, por lo menos en algunas estirpes celulares, existe una desregulación en su expresión (52); estos procesos pueden ser revertidos por la reexpresión de la cadherina-E (53). Sin embargo, existen tumores que expresan abundante cantidad de cadherina-E y aún así presentan la capacidad de metastatizar (33). Algunos posibles mecanismos a través de los cuales las células tumorales pueden superar la cohesividad mediada por cadherinas incluyen la desregulación transcripcional, mutaciones puntuales en los sitios de unión a calcio, la pérdida de la expresión de cadherina-E o la proteólisis de la misma (54). La perturbación del sistema de adhesión de la cadherina puede ocurrir también como resultado de la fosforilación de las cateninas y las propias cadherinas (55, 56). Desórdenes traducionales o la pérdida alélica del cromosoma 16q (57), en el cual se encuentra localizado el gen de cadherina-E, han sido reportados como posibles mecanismos de expresión anormal de la cadherina-E en cánceres humanos (58, 59).

Las células con capacidad para metastatizar exhiben un patrón de interacciones intercelulares muy complejo en el proceso de adhesión. La pérdida de la adhesión celular mediada por cadherina-E puede verse como un paso inicial en el proceso de invasión. A esto debe seguir la degradación de la matriz extracelular que facilita la infiltración tumoral (27, 55). Las células tumorales acoplan proteólisis y motilidad para producir la invasión en tiempos y lugares que no son apropiados para las células normales.

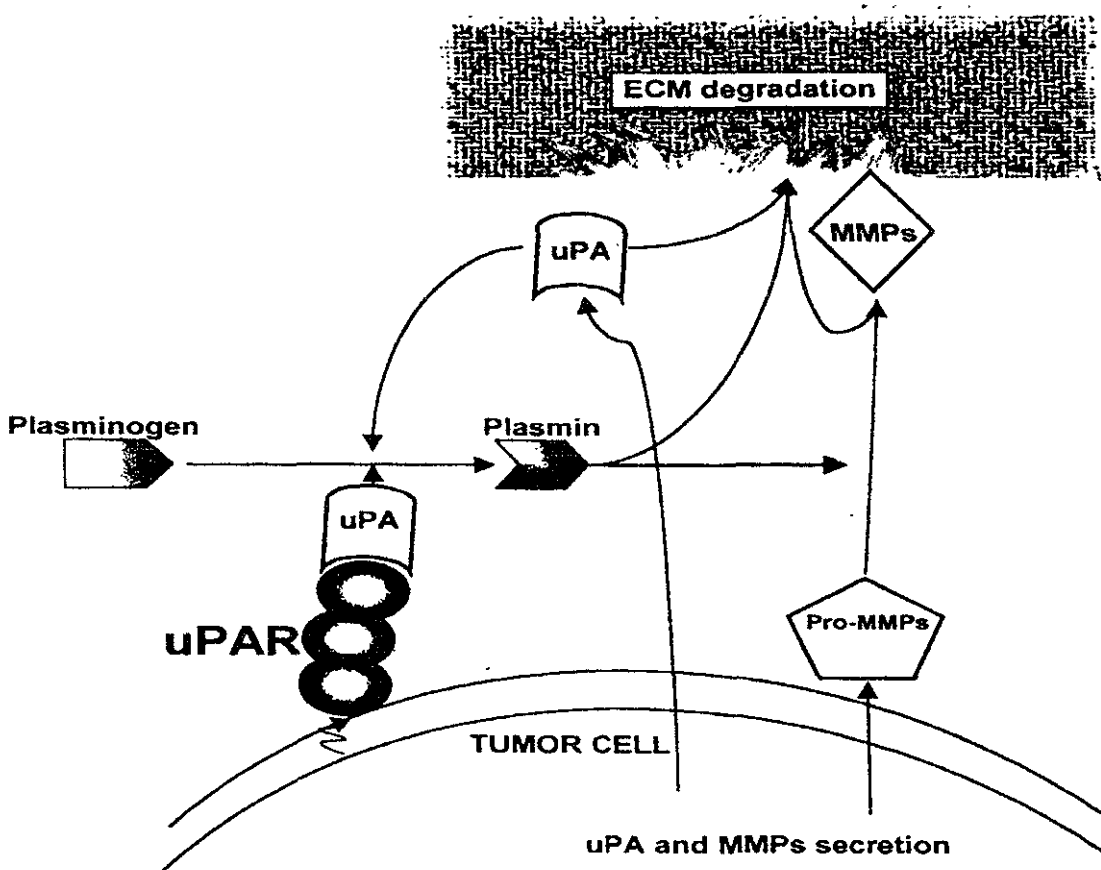
La degradación proteolítica durante la migración celular en procesos de invasión y metástasis permiten a las células migratorias pasar a través de la matriz extracelular o la membrana basal. Una característica típica de las células tumorales es la sobreproducción de enzimas proteolíticas en respuesta a múltiples señales (60); el incremento en la producción de estas

enzimas les permiten degradar parte de las proteínas de la matriz extracelular y les facilitan el proceso de migración e invasión.

La localización de proteasas en la superficie de las células, su activación y la regulación de la proteólisis son claves para la elucidación del papel de las proteasas de membrana en el remodelamiento tisular e invasión tumoral. En este proceso cuatro tipos de proteasas están involucradas: (a) metaloproteasas (colagenasa tipo I, II y III, estromelina, gelatinasas), (b) aspartil proteasas (catepsina D), (c) serin proteasas (activadores de plasminógeno tipo urocinasa y tisular, y plasmina) y (d) cisteinil proteasas (catepsina B, D, H y L).

Así, tenemos por ejemplo, que en el sistema del activador de plasminógeno, constituido por varias serin proteasas, sus niveles de expresión se modifican en respuesta a diversos agentes, además de estar estrechamente asociado al fenómeno neoplásico (61).

Existen dos tipos de activadores de plasminógeno, el tisular y la urocinasa, los cuales actúan sobre el plasminógeno. El plasminógeno es sintetizado en células del hígado como una proenzima inactiva. Al ser activado el plasminógeno pasa a plasmina, la cual a su vez puede activar otras proenzimas de proteasas o puede directamente degradar las proteínas de la matriz extracelular, incluyendo la membrana basal (Figura 3).



**FIGURA 3 MOLECULAS INVOLUCRADAS EN LA ACTIVACION DE LA CASCADA PROTEOLÍTICA DEL uPA.**

El esquema muestra al uPA secretado por un tumor, éste se une a su receptor anclado en la membrana citoplásmica activando el plasminógeno a plasmina. La plasmina puede activar metaloproteinasas (MMP), secretadas también por el tumor. Ambos grupos de enzimas (sistema del activador de plasminógeno y metaloproteasas) ahora son capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular (ECM).

El activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA por sus siglas en inglés) participa directamente en la proteólisis durante la migración celular y remodelamiento tisular, bajo condiciones fisiológicas y patológicas (62). El uPA se encuentra en sangre, semen, orina, fluido uterino y células; es secretado por muchos tipos de células, entre ellas las células cancerosas, macrófagos activados, células granulosa del ovario estimulado, etc. La activación del plasminógeno, catalizado por el uPA, ha mostrado ser esencial en la degradación de la matriz extracelular, disolución de la membrana basal y la invasividad en el cáncer en una gran variedad de modelos (63). La pro-enzima (pro-uPA) se activa al unirse a su receptor de membrana con alta afinidad (uPA-R); este receptor es el sitio de reacción para la activación del plasminógeno mediada por el uPA en la célula, acelerando de esta manera la generación de plasmina a partir del plasminógeno, y localizando la actividad de uPA en la superficie de las células.

En la actualidad, el posible papel del activador de plasminógeno en el desarrollo y diseminación de tumores esta recibiendo una considerable atención. En cáncer de mama se ha visto la relación directa que guarda la expresión del uPA con el grado de diferenciación del tumor sobre todo con aquellos de carácter invasivo (62). Así mismo, en algunos casos se han detectado niveles elevados del receptor en sangre y en orina (64).

El sistema del activador de plasminógeno/plasmina se encuentra sujeto a un control estricto a múltiples niveles, incluyendo la transcripción y activación de genes, la estabilización de su ARNm, la traducción y secreción de proenzimas latentes, la unión de proenzimas a la membrana celular o componentes de la matriz extracelular, la activación de enzimas, la inhibición por inhibidores específicos y la degradación o remoción de enzimas activas (65, 66).

Aparentemente, la producción de grandes cantidades de activador de plasminógeno no es una característica constante de las células malignas. En particular, en líneas celulares con una larga historia de cultivo *in vitro*, estas pueden llegar a perder la propiedad de producción de uPA sin perder su tumorigenicidad. Sin embargo, las condiciones en que se desarrolla un tumor *in vivo* son muy particulares, de ahí la importancia que reviste el establecer si el activador es un

constituyente normal en las células, sí es producido únicamente por el tumor, sí su síntesis se eleva de manera directa con el avance de la malignidad de los tumores o sí se incrementa en ciertos estadios de la tumorigénesis.

La detección de células expresando proteínas del sistema del activador de plasminógeno se ha comenzado a utilizar como marcador biológico en ensayos de citometría de flujo, junto con la expresión de ciertas citoqueratinas (67).

La actividad proteolítica de las células tumorales es tan sólo una de las actividades que favorecen el crecimiento y diseminación de los tumores. También tenemos que considerar que la activación de la síntesis de uPA se ve acompañada por un incremento en los niveles de expresión de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y de crecimiento hepático (HGF) (68, 69).

Debido a que la *cadherina-E* influye en la capacidad de invadir de las células de carcinoma, se ha considerado la posibilidad que esta intervenga en la regulación de la producción del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) de las células invasivas. Se tienen antecedentes que sugieren la relación directa entre la adhesión célula-célula, a través de la *cadherina-E*, la integridad del citoesqueleto en particular los filamentos de actina y la regulación de la biosíntesis del uPA (60).

En células LC-PK, la cual es una línea celular derivada de un epitelio renal de cerdo, la expresión de uPA es inducida por la reorganización de las proteínas del citoesqueleto (tanto actina como tubulina). La inducción es debida a la activación transcripcional del gen de uPA a través de un mecanismo independiente de la *protein cinasa C* y de la *protein-cinasa-dependiente del AMPc*. La activación es específica sobre el gen de uPA a través de un elemento transcripcional que actúa en *cis* sobre el promotor de uPA. En este caso las moléculas de actina pudieran estar actuando como mediadoras en la relación uPA-*cadherina-E*.

Existe otra teoría, que relaciona directamente a uPA y a la *cadherina-E*, y que propone que en la regulación de la expresión del uPA existe un mecanismo de retroalimentación positiva (*feedback*) a través de *cadherina-E*. Al incrementarse la actividad proteolítica en la vecindad de la célula cancerosa, ya sea por un ligero incremento autónomo en la expresión del uPA o alguna otra enzima proteolítica, *cadherina-E* pudiera ser sujeta a proteólisis, esto incrementaría

la expresión de uPA al modificarse las interacciones cadherina-E-actina. La pérdida de la función normal de la cadherina-E seguida de una reorganización de la actina en el citoesqueleto, dirigiría una vía de señalización que incrementaría la expresión de uPA e incrementaría los niveles de proteólisis alrededor de las células tumorales para facilitar su invasión (70).

Junto con estas propuestas, también se han observado experimentalmente que el ión calcio induce la redistribución del uPA en las uniones célula-célula, además de su co-localización con cadherina-E, sugiriendo esto una unión entre el uPA y la formación de uniones intercelulares en queratinocitos. Así, la distribución de uPA unido a su receptor, en el mismo modelo de queratinocitos, es controlada por la concentración del ión calcio en el microambiente y puede ser modulada por la cadherina-E (71).



## ANTECEDENTES

El desarrollo del cáncer en seres humanos puede tomar varios años y durante el llamado período de latencia, pueden llevarse a cabo múltiples cambios celulares en el tejido afectado. Las nuevas poblaciones celulares que aparecen, representan estados o pasos en la evolución celular desde células normales, pasando por iniciadas, preneoplásica, premalignas, hasta células altamente malignas, con la capacidad de invadir o metastizar a sitios distantes.

La invasión y la metástasis son el sello de la malignidad en las neoplasias, la mayor causa de muerte en pacientes con cáncer y el principal impedimento para la cura del mismo.

Una de las características fundamentales en los procesos de invasión y metástasis es la movilidad celular; para que células tumorales puedan migrar hacia otros sitios se requiere favorecer el desarrollo de ciertos procesos como son la activación de proteasas y el decremento en la adhesión célula-célula (24, 61). Sin embargo, se desconoce si la activación o el decremento en la actividad de estas moléculas son exclusivas de la invasión o metástasis o bien, comienzan a presentarse desde las etapas iniciales de la carcinogénesis.

El diagnóstico del cáncer, en especial el cáncer de hígado, aún se sigue realizando en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que la evaluación de la progresión de la carcinogénesis en muestras de pacientes resulta difícil de establecer. Sin embargo, el análisis de muestras provenientes de pacientes con cáncer hepático han sido muy útiles en estudios epidemiológicos, en el seguimiento de tratamientos con anticancerígenos y en evaluaciones fenotípicas, entre otros.

En el estudio de procesos tan complejos como el cáncer, se ha visto la necesidad de utilizar modelos animales (72). Uno de los modelos más utilizados en el estudio de las alteraciones iniciales en el cáncer hepático, ha sido el modelo de hepatocarcinogénesis desarrollado por Solt-Farber, llamado "modelo de hepatocitos resistentes" (18), el cual fue posteriormente, modificado ligeramente por Lans (21). Este modelo permite el análisis detallado y secuencial

de los aspectos bioquímicos y biológicos del cáncer hepático durante las diferentes etapas de su desarrollo (18, 73).

La expresión de moléculas tan importantes en la carcinogénesis, en especial invasión y metástasis, como lo son la cadherina-E y el uPA no han sido evaluadas en modelos que permitan el estudio de la cinética de expresión de ambas moléculas durante la carcinogénesis en hígado, o en cualquier otro órgano o tejido. La mayoría de los estudios clínicos que se tiene de estas moléculas, evaluados de manera individual o en conjunto (74, 75, 76), son estudios transversales que analizan la expresión en muestras de tejido sano, con lesiones pre y neoplásica. Generalmente la evaluación de estas moléculas en la carcinogénesis, en muestras de pacientes se realiza en etapas avanzadas del cáncer, frecuentemente en aquellas muestras en donde se establece el diagnóstico de la enfermedad. La expresión de estas moléculas en el inicio y en las etapas intermedias de la carcinogénesis se desconoce casi por completo. Una de las bondades del modelo de Solt-Farber, es la de permitir un estudio longitudinal, con un número representativo de muestras y con una población en estudio en condiciones ambientales y de alimentación semejantes.

La cadherina-E es la principal molécula de adhesión del tejido epitelial, y ha sido implicada en la carcinogénesis ya que frecuentemente se han reportado alteraciones en su expresión en cáncer epitelial humano (48, 77). El papel de la cadherina-E en el cáncer y en especial en la metástasis ha resultado muy relevante, debido a su aparente uso como indicador pronóstico; se ha visto que la pérdida o la reducción de la expresión correlaciona con el incremento de la agresividad y desdiferenciación de algunos carcinomas (27).

Estudios realizados sobre la progresión maligna de las células hepáticas han buscado algunos marcadores que permitan identificar características ligadas a displasias y que se encuentren relacionadas a alteraciones neoplásicas. Entre estos se han utilizado al receptor del factor de crecimiento hepático (*c-Met*), la proteína del retinoblastoma (*Rb*) (76), el factor de crecimiento transformante-beta 1 (*TGF- $\beta$  1*) y la cadherina-E (54). Los niveles de expresión de cadherina-

E se mantienen constantes en carcinoma hepatocelular bien diferenciados (CHC), particularmente en aquellos con patrón de crecimiento acinar o trabecular. La cadherina-E ha sido detectada en hepatocitos normales, pero no en hepatocitos displásicos, los cuales se cree son precursores del carcinoma hepatocelular (76).

En un estudio realizado con 91 casos de carcinoma hepatocelular en humanos se encontró una disminución en la expresión de la cadherina-E en el 56% de los casos. Esto correlacionó con factores pronósticos, como el tamaño del tumor y el índice mitótico, entre otros. Pacientes con desregulación en la expresión de cadherina-E mostraron una sobrevida más baja que el resto de la muestra estudiada (77).

Como se comentó anteriormente la sobre-expresión de enzimas proteolíticas en los procesos de invasión y metástasis, se encuentra ampliamente documentado (61, 78). Sin embargo, la cinética de expresión del uPA en la hepatocarcinogénesis aún no se ha reportado. En el carcinoma hepatocelular humano se han detectado un incremento en la expresión del uPA y de otros miembros del sistema enzimático de la vía de la urocinasa, entre ellos el receptor para uPA (uPA-R) y la proteína inhibidora del activador de plasminógeno-tipo 1 (PAI-1). Estos miembros del sistema del activador del plasminógeno han sido relacionados con un pobre pronóstico en la sobrevida (78, 79). Se ha observado que existe una correlación entre la elevación en los niveles de expresión de uPA y uPA-R y la existencia de invasión y metástasis. En hígado humano, no existen datos disponibles en cuanto la transcripción de los genes del activador de plasminógeno en condiciones fisiopatológicas. Los datos disponibles se relacionan con los niveles séricos del uPA y tPA en pacientes con CHC o alguna otra patología y no existen evidencias reportadas de la posible contribución del hígado humano como fuente de las formas circulantes del activador de plasminógeno (80).

## JUSTIFICACION

El cáncer sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y una de las principales causas de muerte entre la población mexicana.

Existen datos clínicos y experimentales que han contribuido al entendimiento de algunos factores que inducen, promueven, y favorecen el desarrollo del cáncer. Sin embargo, falta entender varios de los mecanismos que regulan el crecimiento, la progresión y la diseminación del cáncer.

Uno de los principales problemas por abordar es el diagnóstico oportuno, no existe hasta el momento, salvo contadas excepciones, marcadores específicos que indiquen la presencia de lesiones neoplásicas en etapas tempranas. Este problema es particularmente importante en la clínica de hígado, ya que por lo general el cáncer hepático es diagnosticado en etapas muy avanzadas de la enfermedad. Uno de los propósitos del proyecto es el de analizar la posibilidad de que cambios en los niveles de expresión del activador de plasminógeno tipo urocinasa y/o la cadherina-E pudieran asociarse con alguna etapa en particular del desarrollo del cáncer y poder utilizarlos como marcadores tumorales.

Una vez diagnosticada la enfermedad, es de suma importancia conocer su progresión y pronóstico. Puntos en donde pudieran contribuir significativamente la detección del uPA y la cadherina-E, de acuerdo a datos previamente reportados para otros tipos de cáncer (53, 66).

Para cubrir estos puntos nos apoyamos en el modelo experimental de hepatocarcinogénesis química desarrollado por Solt-Farber; mediante este modelo se obtuvieron las muestras biológicas requeridas para realizar los estudios correspondientes y tratar de dar respuestas a los planteamientos establecidos previamente.

Nuestro trabajo trata de mostrar una opción experimental en el estudio del papel de una molécula de adhesión y una enzima proteolítica en el inicio, desarrollo y evolución del tejido neoplásico.

## **HIPOTESIS**

Mediante el empleo de un modelo experimental de hepatocarcinogénesis se podrá analizar la cinética de expresión del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y de la cadherina-E durante la progresión del cáncer. El uPA incrementará su síntesis conforme vaya progresando el cáncer hepático, mientras la cadherina-E se expresará de manera homogénea en el tejido hepático mientras mantenga sus características de diferenciación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los cambios en la expresión de cadherina-E y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) en un modelo de hepatocarcinogénesis experimental.

### **Objetivos particulares:**

- Implementar en el laboratorio el modelo experimental de hepatocarcinogénesis desarrollado por Solt-Farber.
- Evaluar las condiciones funcionales del hígado durante el desarrollo del modelo experimental.
- Estudiar los niveles de expresión de la cadherina-E y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) a nivel de ARN mensajero durante el desarrollo del cáncer de hígado en el modelo experimental.
- Analizar los niveles de expresión de la proteína uPA y su distribución, en cortes de tejido hepático durante la evolución del cáncer de hígado.

## **HIPOTESIS**

Mediante el empleo de un modelo experimental de hepatocarcinogénesis se podrá analizar la cinética de expresión del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y de la cadherina-E durante la progresión del cáncer. El uPA incrementará su síntesis conforme vaya progresando el cáncer hepático, mientras la cadherina-E se expresará de manera homogénea en el tejido hepático mientras mantenga sus características de diferenciación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los cambios en la expresión de cadherina-E y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) en un modelo de hepatocarcinogénesis experimental.

## **Objetivos particulares:**

- Implementar en el laboratorio el modelo experimental de hepatocarcinogénesis desarrollado por Solt-Farber.
- Evaluar las condiciones funcionales del hígado durante el desarrollo del modelo experimental.
- Estudiar los niveles de expresión de la cadherina-E y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) a nivel de ARN mensajero durante el desarrollo del cáncer de hígado en el modelo experimental.
- Analizar los niveles de expresión de la proteína uPA y su distribución, en cortes de tejido hepático durante la evolución del cáncer de hígado.

## **HIPOTESIS**

Mediante el empleo de un modelo experimental de hepatocarcinogénesis se podrá analizar la cinética de expresión del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y de la cadherina-E durante la progresión del cáncer. El uPA incrementará su síntesis conforme vaya progresando el cáncer hepático, mientras la cadherina-E se expresará de manera homogénea en el tejido hepático mientras mantenga sus características de diferenciación celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los cambios en la expresión de cadherina-E y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) en un modelo de hepatocarcinogénesis experimental.

### **Objetivos particulares:**

- Implementar en el laboratorio el modelo experimental de hepatocarcinogénesis desarrollado por Solt-Farber.
- Evaluar las condiciones funcionales del hígado durante el desarrollo del modelo experimental.
- Estudiar los niveles de expresión de la cadherina-E y del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) a nivel de ARN mensajero durante el desarrollo del cáncer de hígado en el modelo experimental.
- Analizar los niveles de expresión de la proteína uPA y su distribución, en cortes de tejido hepático durante la evolución del cáncer de hígado.

## METODOLOGIA

### Modelo Experimental

Se utilizó un modelo experimental de hepatocarcinogénesis química con duración de 12 meses; para lo cual se emplearon un total de 396 ratas Wistar macho de entre 120 y 150 g de peso, alimentadas con una dieta estándar (24% de proteína) y expuesta a ciclos alternos de luz artificial por períodos de 12 horas. Los animales fueron mantenidos en un ambiente con humedad y temperatura controlada y el alimento y agua fueron administradas *ad libitum*. El comité ético del Instituto Nacional de Investigaciones Médicas y de la Nutrición aprobó los procedimientos experimentales.

Los animales fueron sometidos a un procedimiento de selección descrito por Solt y Farber (20) ligeramente modificados por Lans (21) (Figura 4). Brevemente, 220 animales recibieron una dosis única intraperitoneal (i.p.) de dietilnitrosamina (DEN) (200 mg/kg) disuelto en solución salina. Después de dos semanas los animales fueron alimentados con una mezcla homogénea de su dieta estándar más 0.02% de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), suministrado a libre demanda por dos semanas (semana 3 y 4). Al término de la tercera semana los animales recibieron una dosis intra gástrica (i.g.) de tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) (2 ml/kg) diluido volumen a volumen en aceite de maíz. Después de la cuarta semana los animales recibieron fenobarbital al 0.05% en el agua de consumo hasta el día de su sacrificio. Un segundo grupo de 110 animales fueron utilizados como controles sano. Finalmente, tres grupos restantes de 22 animales cada uno fueron utilizados como controles de los agentes carcinogénicos. Un grupo recibió DEN y 2-AAF. El otro grupo fue tratado con 2-AAF y CCl<sub>4</sub>. El último grupo recibió DEN y CCl<sub>4</sub>. De manera periódica (cada dos semanas), los animales incluidos en el modelo, tanto controles como tratados, fueron sacrificados por exsanguinación, previa anestesia con dietil ether. Después del sacrificio se realizó un examen visual post mortem del hígado y del resto de los órganos, en busca de alteraciones anatómica evidentes (Ver Figura 5).



# MODELO EXPERIMENTAL

220 RATAS WISTAR MACHO 120-150 g



## HEPATOCARCINOGENESIS QUIMICA

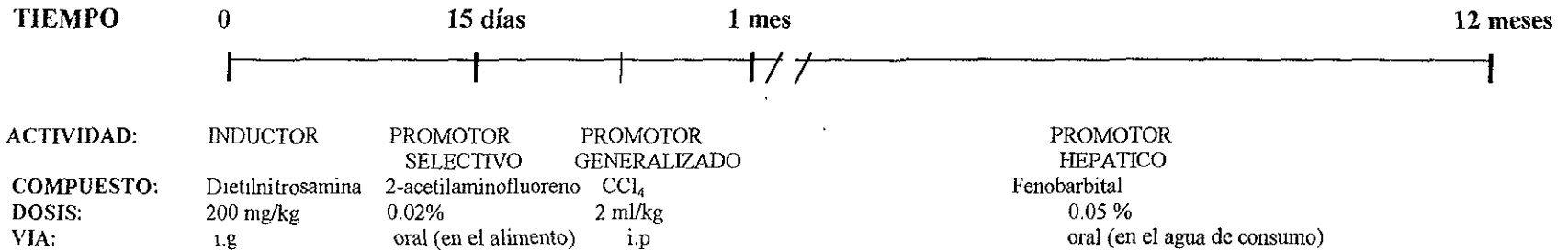
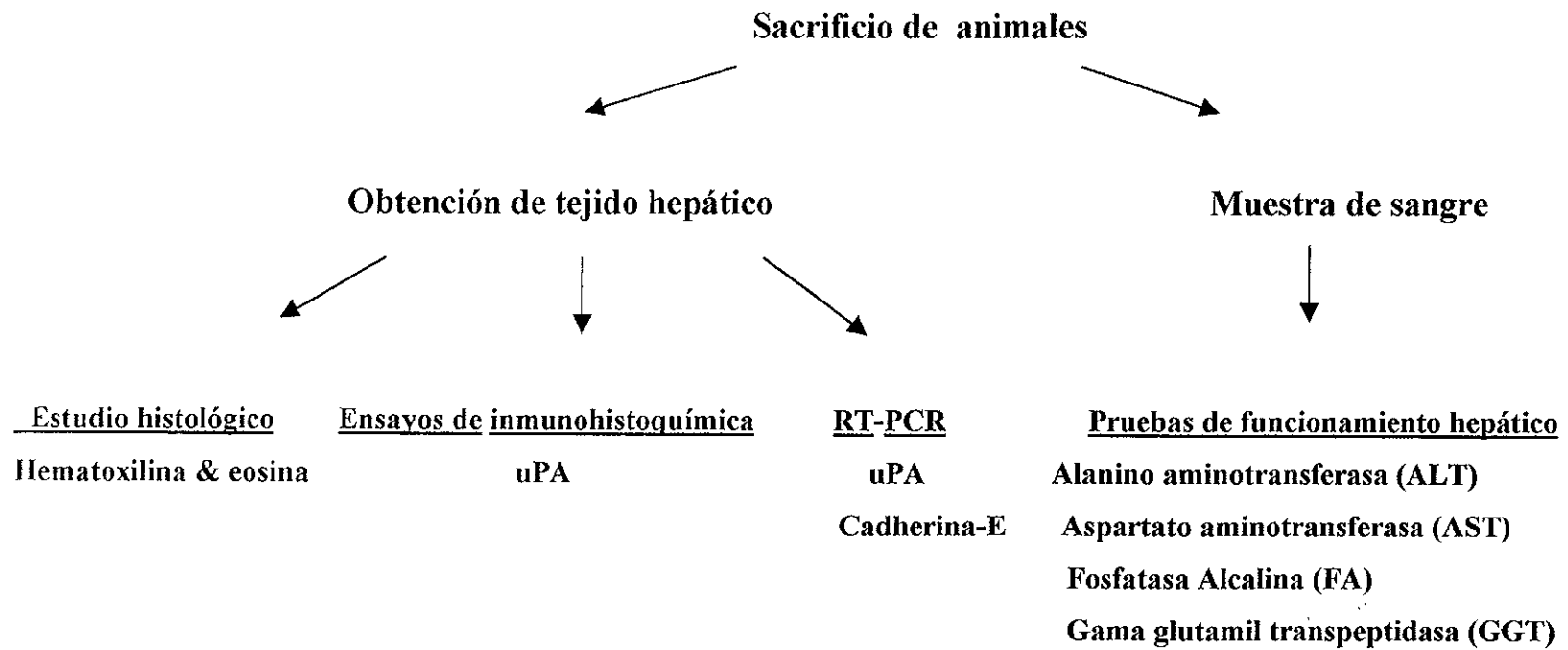


FIGURA 4. MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATOCARCINOGENESIS QUIMICA



**FIGURA 5. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS**

El hígado fue pesado y cortado en pequeñas porciones para su evaluación; posteriormente una parte de la muestra fue fijada en alcohol para su análisis inmunohistoquímico e histológico. Otras secciones fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Junto con las muestras de tejido hepático se tomaron muestras de sangre para realizar los estudios bioquímicos del funcionamiento hepático (Ver Figura 5).

### **Producción del anti suero anti uPA**

Como parte del trabajo experimental se produjo un antisuero policlonal anti uPA. Para esto se emplearon dos conejos machos New Zeland, sanos, de aproximadamente 800 g cada uno. Estos animales fueron inmunizados con 400  $\mu\text{g}$  de urocinasa (UK) (Sigma, St Louis, MO) inactivada con diisopropil fluorofosfato (DIFP) (Sigma, St Louis, MO) (81). La urocinasa fue mezclada con el adyuvante completo de Freund e inyectados subcutáneamente. Los animales recibieron una segunda dosis un mes después. Los conejos fueron sangrados a blanco 8 semanas después de la primera inmunización; el suero fue separado y el título de los anticuerpos anti-urocinasa fue determinado por un ensayo de ELISA. La especificidad de la inmunoreacción fue confirmada al neutralizar con un exceso de 50 veces la concentración molar del uPA las bandas inmunoreactivas en el Western blot (datos no mostrados).

### **Análisis morfométrico e inmunohistoquímico**

Una vez obtenidas las muestras de tejido hepático se colocaron en una solución de formalina al 10%. Posteriormente los tejidos fueron procesados de acuerdo al examen histológico de rutina utilizando la tinción de hematoxilina y eosina.

Junto con los fragmentos de hígado se tomaron muestras de tejido pulmonar de algunos animales del modelo para su análisis histológico.

El uPA fue localizado en los cortes de tejido hepático utilizando los anticuerpos policlonales producidos en el laboratorio. Se utilizaron secciones de 5 micras a partir de bloques previamente fijados en etanol y embebidos en parafina. Se bloqueó la peroxidasa endógena con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 25 minutos, posteriormente el tejido fue incubado con el anticuerpo policlonal anti-urocinasa diluido 1:5,000 en 1% albúmina sérica bovina en buffer de fosfatos- (BSA-PBS) por 60 minutos a 37°C. La unión del anticuerpo fue detectada empleando un segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa (2.5 µg/ml) (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) incubado por 60 minutos a 37°C; como sustrato colorido se utilizó 0.5 mg/ml 3-3' diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma, St. Louis, MO)/ 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina y posteriormente montados. Algunas muestras fueron preincubadas sin el suero de conejo como control negativo.

Para el análisis semicuantitativo de la inmunohistoquímica tres áreas del tejido hepático fueron seleccionadas: el espacio periportal, el espacio intralobulillar y los nódulos. Las células inmunoreactivas fueron evaluadas utilizando el método semicuantitativo descrito por McCarthy and Constantini (82, 83), en el cual la intensidad y el porcentaje de inmunoreactividad de las células fueron evaluados. El porcentaje de la inmunoreactividad de las células fue clasificada en cuatro diferentes categorías de acuerdo a la intensidad de la tinción, considerando como 0 (sin tinción), 1+ (débil tinción pero detectable), 2+ (medio), 3+ (fuerte). Para cada laminilla, el resultado final fue el producto de multiplicar el porcentaje de células inmunoreactivas por la intensidad de las mismas usando la siguiente fórmula:

$$\text{score} : P_i (i + 1)$$

en donde  $i = 1,2,3$  y  $P_i$  varía de 0 a 1, en donde 1= 100% de células inmunoreactivas positivamente. El score calculado de esta manera correlaciona perfectamente con el método inmunohistoquímico cuantitativo derivado del analizador de imágenes computarizado en el caso de la evaluación de receptores de estrógeno en cáncer de mama (82).

## **Determinación de la actividad enzimática de los marcadores bioquímicos de la función hepática**

La función hepática fue evaluada en grupos de 6 de 10 animales problema junto con 4 animales control (sin tratamiento), esto en cada uno de los tiempos estudiados. Se determinó en suero la actividad del aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y gama-glutamiltanspeptidasa (GGT). La determinación de estas enzimas fue utilizando un equipo automatizado Coulter-Counter.

## **Extracción de ARN total y ensayo de RT-PCR**

Para el análisis de la expresión a nivel de ARN mensajero de los genes del uPA, cadherina-E y  $\beta$ -actina, como control interno, se tomaron algunos fragmento de tejido hepático (1 cm<sup>2</sup> aproximadamente) de cada uno de los animales del modelo experimental. El ARN total del tejido hepático fue aislado de acuerdo a la metodología descrita por Chomczynsky (84). Se colocó la muestra de tejido hepático en 1 ml del reactivo TRIZOL (GIBCO-BRL) en tubos corex y se disgregó con la ayuda de un disgregador de tejidos (polytron). Después de la homogenización se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 0.2 ml de cloroformo. Las muestras fueron mezcladas vigorosamente y centrifugadas a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El ARN total fue precipitado a partir de la fase acuosa, mezclando con 1 ml de isopropanol e incubando toda la noche a -20°C. El sobrenadante fue removido y el precipitado lavado con etanol al 75%. El precipitado fue secado al aire y resuspendido en 100  $\mu$ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). El ARN total fue cuantificado leyendo la absorbancia a A<sub>260</sub> nm a partir de una dilución (1:250) de cada una de las muestras. El ADN contaminante fue removido de las muestras de ARN total tratándolas con la enzima ADNasa I libre de ARNasa (GIBCO BRL).

El ARN total fue convertido a ADN copia (cADN) por medio de la reacción de la enzima reversa transcriptasa. Para llevar a cabo estos ensayos se tomaron 1 µl (1 µg) de ARN total y se colocó en un tubo para PCR de pared delgada de 0.2 ml de capacidad. Se agregaron 8 µl de la mezcla de reacción la cual contenía buffer de PCR 1x (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.4 mM dNTP's (GIBCO BRL), 9.6 U Inhibidor de RNasas (ROCHE Mannheim, Germany), 0.080 µg de oligo (dT)<sub>10</sub> (ROCHE Mannheim, Germany), 6.6 mM de DTT y 48 U de la enzima M-MLV Reversa Transcriptasa (GIBCO BRL), esta mezcla fue incubada a 42°C por 60 minutos.

Para el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el producto de ADNcopia fue dividido en 3 fracciones, de 3µl cada una, para la amplificación del uPA, cadherina-E y β-actina. El buffer de PCR (1 x), 1.76 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5 U de la enzima Taq polimerasa (GIBCO BRL) y 10 pMol de cada par de oligonucleótidos, junto con el producto de la reacción de la reversa transcriptasa dieron un volumen final para cada par de oligonucleótidos de 15 µl. Después de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, se programaron 30 ciclos de la siguientes condiciones : 94°C por 50 segundos, 60°C por 50 segundos y 72°C por 50 segundos. Posteriormente se realizó un ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C. El equipo utilizado fue un Perkin Elmer modelo 9600. Los productos del RT-PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2 %, sometidos a una electroforesis y teñidos con bromuro de etidio.

Los oligonucleótidos utilizados en el PCR fueron sintetizados de acuerdo a las secuencia reportada en el Gene Bank, después de haber realizado una minuciosa comparación de homologías para hacer el diseño altamente específicos de cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Tamaño del producto pb
uPA	GAG AAC CAG CCC TGG TTT GC	CAC TGT GGG TCA GCA GCA	521
cadherina-E	CCT CGA AAC ATG CAG TTC TGC	TCC CGC CTT CAT GCA GTT GTT	303
β-actina	GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	218

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo inmunohistoquímico semicuantitativo se utilizó un análisis de varianza de Kruskal Wallis. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

Como resultado del empleo del modelo de hepatocarcinogénesis experimental, con duración de 12 meses desde la administración de la dietilnitrosamina (DEN), se indujo el desarrollo de carcinoma hepatocelular bien diferenciado en ratas macho Wistar.

Al hacer un examen visual del resto de los órganos sólo se encontraron lesiones macroscópicas en pulmón. No se encontró metástasis en algún otro tejido u órgano. Sin embargo, no se descartó la posibilidad de que existiera invasión y micrometástasis al interior del propio hígado.

El día del sacrificio de cada lote de animales control y con tratamiento, se llevó el registro del peso corporal y el peso del hígado; además del valor promedio de los pesos registrados también se analizó la mortalidad de los diferentes lotes de animales. Como se puede observar en la Tabla I la tasa de mortalidad de los animales tratados incrementó conforme fue avanzando el modelo experimental. En los animales control no se observó esta misma tendencia.

Después de hacer el examen macroscópico del tejido hepático de cada uno de los animales, se registró el tamaño de las lesiones y junto con el estudio histopatológico, se determinó el tipo de lesiones. Estos datos se presentan en la Tabla II. El incremento en el tamaño de las lesiones y el aumento en el número de animales que las presentaron fueron más evidentes en los últimos meses del modelo. Así mismo, el tipo de lesiones pasó de ser simples alteraciones locales, al inicio del tratamiento, a la aparición e incremento del carcinoma hepatocelular al término del mismo.

En los dos últimos meses se observó un aumento en la cantidad de nódulos y lesiones, características del carcinoma hepatocelular, que fue imposible hacer un recuento de las lesiones semejante al realizado en los meses anteriores; se podría decir que a ese tiempo el tejido hepático fue sustituido en su totalidad por un carcinoma hepatocelular.



Tabla I Peso promedio y mortalidad de los animales utilizados en el modelo experimental.

Meses de tratamiento	Peso corporal (g) <sup>3</sup>		Peso del hígado (g) <sup>3</sup>		Mortalidad (muertos / total)	
	Tratados <sup>1</sup>	Control <sup>2</sup>	Tratados <sup>1</sup>	Control <sup>2</sup>	Tratados <sup>1</sup>	Control <sup>2</sup>
2	415±57*	319±20	19±1*	14±1	2 / 20*	0 / 10
3	424±30*	512±30	21±2*	13±2	2 / 20*	0 / 10
4	477±31*	526±21	20±3*	13±1	2 / 20*	0 / 10
5	522±57	530±15	24±5	17±2	2 / 20*	0 / 10
6	646±55	580±18	21±2	18±2	4 / 20*	1 / 10
7	532±49	550±20	27±6	18±3	4 / 20*	0 / 10
8	559±52	610±16	26±3*	19±2	5 / 20*	0 / 10
9	575±38*	630±18	21±4	20±3	6 / 20*	1 / 10
10	572±59	620±14	23±3	21±4	7 / 20*	0 / 10
11	601±74	600±20	28±4	22±3	7 / 20*	1 / 10
12	574±57	635±18	39±108	24±4	8 / 20*	1 / 10

<sup>1</sup> Tratamiento, AAF + DEN + CCl<sub>4</sub> + PB. La administración de cada una de estas sustancias se especifica en Material y Métodos.

<sup>2</sup> Control, animales sin tratamiento.

<sup>3</sup> Representan el promedio ± DS de 20 animales tratados y de 10 animales control, respectivamente.

\* p < 0.05 con respecto al control.

Tabla II Tamaño y porcentaje de lesiones hepáticas en los animales tratados\*

Meses de tratamiento	Lesiones hepáticas diámetro (mm)	Animales con lesiones	Tipo de lesiones		
			NH <sup>1</sup>	NN <sup>2</sup>	CHC <sup>3</sup>
2	< 1	6/18	6	2	0
	3	1/18	1	1	0
3	< 1	7/18	6	4	0
	4-5	1/18	1	1	0
4	1-3	7/18	7	4	2
	4-5	5/18	4	2	2
	50	3/18	1	1	2
5	1-3	9/18	5	8	2
	4-5	5/18	3	3	3
6	1-3	3/16	2	3	2
	4-5	8/16	2	5	4
	20	3/16	1	1	2
	50	1/16	0	0	1
7	1-3	3/16	1	2	2
	20-40	4/16	1	2	2
8	4-5	3/15	0	2	3
	20-40	7/15	0	3	7
9	4-5	3/14	0	1	3
	20-40	6/14	1	2	6
	50	3/14	0	1	3
10	20-40	6/13	0	2	6
	50	6/13	1	3	6

<sup>1</sup>NH, nódulos hiperplásicos

<sup>2</sup>NN, nódulos neoplásicos

<sup>3</sup>CHC, carcinoma hepatocelular

\* Tratamiento, DEN+AAF+CCl<sub>4</sub>+PB

## **Análisis histopatológico**

La interpretación del análisis histopatológico ciego al tiempo del tratamiento, fue realizado con la ayuda del Dr. Rogelio Hernández Pando, jefe de Investigación en Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición. Las muestras de tejido hepático en los primeros tres meses de iniciado el tratamiento mostraron pequeños nódulos hiperplásicos distribuidos al azar. Estos nódulos fueron constituidos por hepatocitos grandes (hipertrofia) con núcleos hiper cromáticos y abundante citoplasma acidófilo (Figura 6A). Espacios porta rodeados por células con cierto grado de regeneración activa. Además, se observaron pequeñas zonas de necrosis, asociadas con modificaciones en la estructura celular (núcleos picnóticos y citoplasmas vacuolados). Después de cuatro meses, se desarrollaron grandes nódulos hepáticos formados por hepatocitos neoplásicos mostrando atípia nuclear e hiper cromasia, numerosos núcleos alargados y acidófilos, así como en mitosis (Figura 6B). A partir de este tiempo, de acuerdo al patólogo, se considera como el inicio de la aparición de nódulos constituidos por células de aspecto neoplásico. Después de 5 meses de iniciado el tratamiento, se observaron grandes nódulos (1 cm o más) substituyendo el parénquima hepático. Estos nódulos fueron formados por hepatocitos neoplásicos y quistes con material acidófilo coloidal (Figura 6C). Se observó esteatosis de gota fina y gota gruesa. Dentro o cercano a estos nódulos se encontró la formación de vasos sanguíneos y conductos biliares muy dilatados que recuerdan peliosis (flecha) (Figura 6D).

Después del sexto mes, todas las alteraciones histopatológicas incrementaron progresivamente. Hacia el octavo mes del tratamiento se observó en algunos nódulos y en el parénquima internodular la presencia de vasos sanguíneos telangectásicos, ampliamente dilatados (peliosis hepatis) (Figura 6E) junto con la presencia de grandes conductos biliares (Figura 6F), las cuales fueron características comunes en el hígado de los animales de esta etapa en la carcinogénesis. Animales con 12 meses de tratamiento mostraron enormes tumores coalescentes cubriendo casi todo el tejido hepático. Los grupos controles tratados únicamente

con dietilnitrosamina, acetilamino fluoreno, o tetracloruro de carbono junto con el fenobarbital, mostraron una baja mortalidad y el desarrollo de pequeños tumores.

En el estudio histológico del tejido pulmonar se observó abundante tejido linfoide, ensanchamiento de tabiques Inter. alveolares, infiltrados inflamatorios perivasculares y perialveolares. De manera particular se logró observar en algunos animales áreas con hemorragia, neumonía lipóidica, y conforme avanzaba el modelo fue evidente el desarrollo de inflamación crónica, fibrosis y hemorragia antigua (datos no mostrados).

Otra de las características patológicas registradas durante el desarrollo de nuestro modelo de hepatocarcinogénesis fue la presencia de esteatosis, la cual se caracterizó por una acumulación de pequeñas (microvesicular) o grandes (macrovesicular) gotas de lípidos en los hepatocitos, resultado de una alteración en el desequilibrio entre el depósito y la excreción de los mismos.

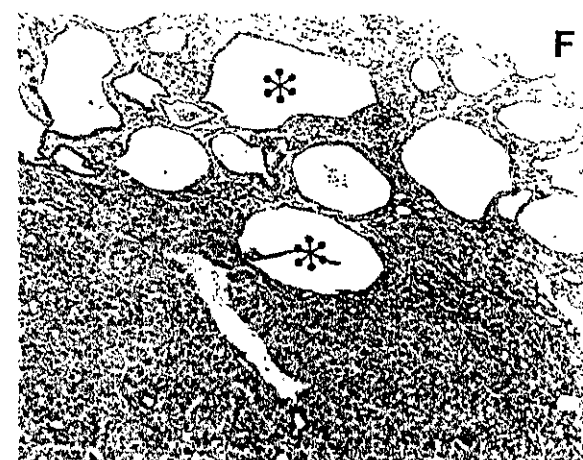
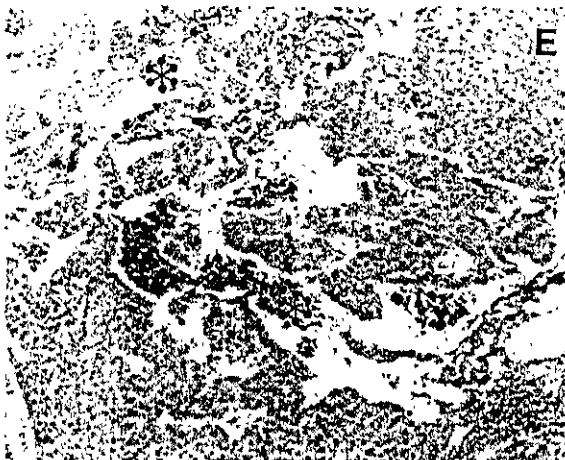
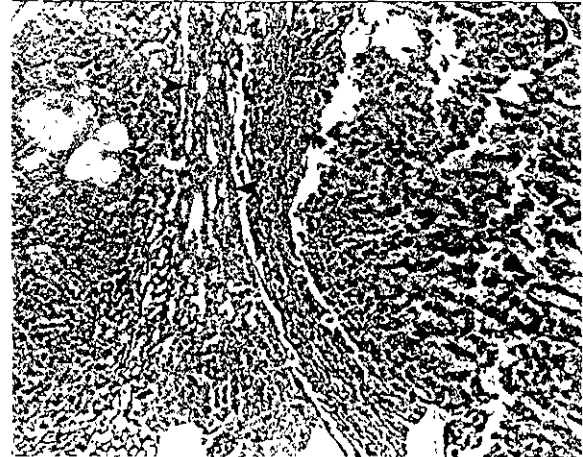
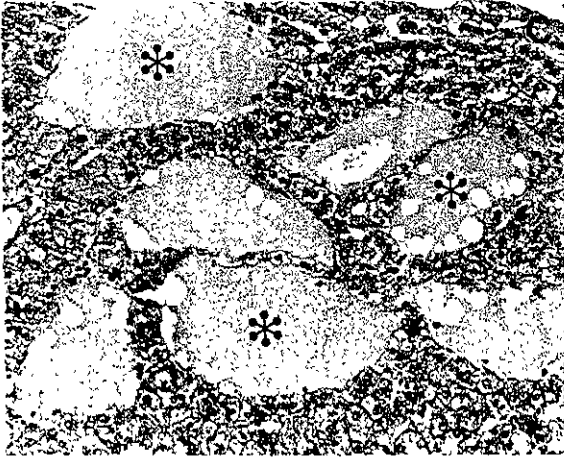
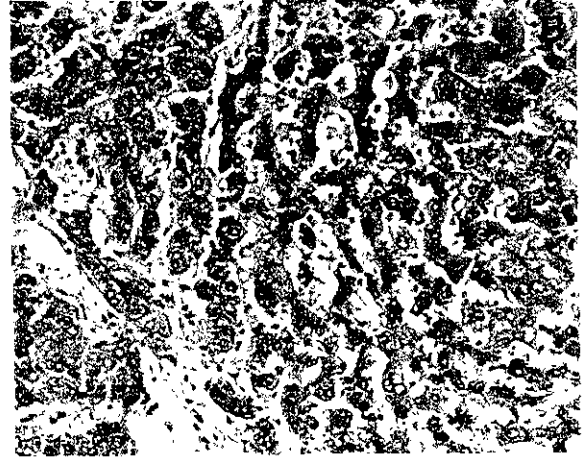
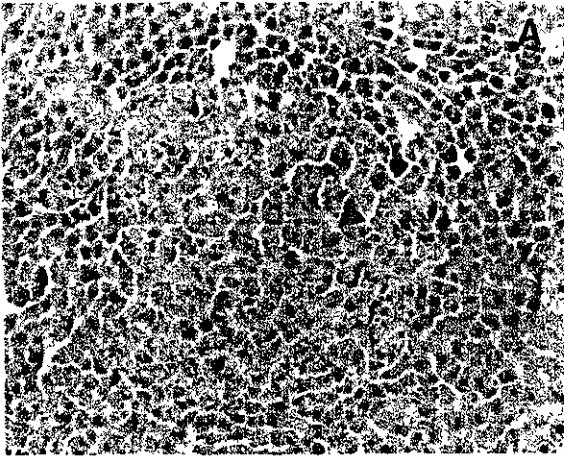


FIGURA 6

**Figura 6. Estudio histopatológico del hígado de rata durante el desarrollo de un modelo de hepatocarcinogénesis química.**

(A) Después de dos meses de iniciada la administración de las drogas del modelo de hepatocarcinogénesis (DEN, AAF, CCl<sub>4</sub> y PB), se observó la aparición de nódulos hiperplásicos con alargamiento de sus hepatocitos además de núcleo hiper cromático (x400). (B) En el transcurso de los meses 3 y 4 del modelo, los nódulos neoplásicos constituidos por células hepáticas con figuras mitóticas (flecha) fueron observados (x400). (C) Al quinto mes de administrado el esquema de drogas carcinogénicas, varias estructuras quísticas con material coloidal (asterisco) fueron formados dentro de los nódulos neoplásicos (x400). (D) En el mismo intervalo de tiempo, se neoforaron muchos conductos biliares con bandas de colágena, las cuales rodeaban a los nódulos neoplásicos (flechas) (x200). (E) Después de seis meses de tratamiento hubo la presencia constante de vasos sanguíneos telangetásicos (asterisco) dentro de los nódulos neoplásicos (x200). (F) A un año del tratamiento todo el tejido sano del órgano fue reemplazado por confluentes nódulos neoplásicos rodeados por septos fibrosos con numerosos conductos biliares en neoformación (asterisco) (x200). Todas las muestras fueron teñidas con hematoxilina & eosina.

### **Distribución del uPA en el tejido hepático.**

En muestras de tejido hepático sano y de los animales tratados los primeros dos meses, se encontraron escasos hepatocitos positivos a uPA localizados principalmente en el área periportal e intralobulillar, cuyo porcentaje de células positivas fue de 18% y 5% ( $p < 0.05$ ), respectivamente (Figura 7A y 8). Después de tres meses de iniciado el tratamiento, el número de hepatocitos inmunotefidos en las mismas áreas incrementó en un 25% y 100%, respectivamente. En este tiempo, el 25% de los hepatocitos localizados en los nódulos hiperplásicos exhibieron una intensa inmunoreactividad (Figura 7B y 8). Después de cuatro meses de tratamiento, cuando los nódulos se encontraron constituidos principalmente por células malignas, la inmunohistoquímica para uPA mostró cierta heterogeneidad. Así, encontramos nódulos neoplásicos con células fuertemente inmunoreactivas o bien zonas en donde, sólo unos pocos hepatocitos localizados en la periferia eran positivos (Figura 7C y D). Cercano a los cinco meses de tratamiento, los hepatocitos positivos para uPA alcanzaron su máximo porcentaje de expresión en los nódulos neoplásicos y en la placa limitante (Figura 8). Los niveles más bajos de expresión fueron localizados en el área intralobulillar, estos niveles permanecieron entre 0.4 – 0.6 unidades de inmunoreactividad durante todo el modelo experimental. En los estados avanzados del cáncer, de 6 a 11 meses, la inmunoreactividad de los nódulos neoplásicos decreció hasta en un 30% (Figura 8). Sin embargo, muchas células del hígado neoplásico con fuerte inmunotinción fueron observadas alrededor de los quistes degenerativos (Figura 7E) y en la neoformación de conductos biliares (Figura 7F). Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

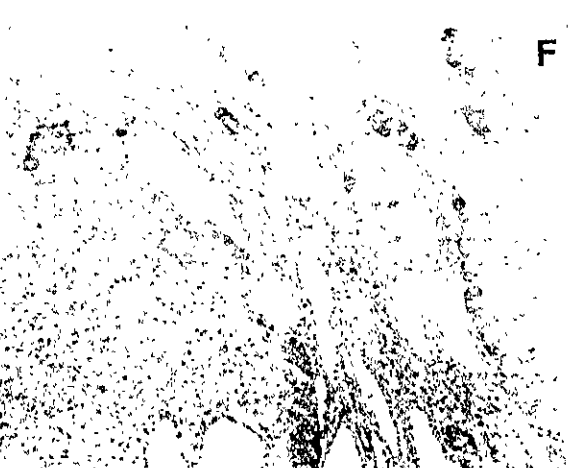
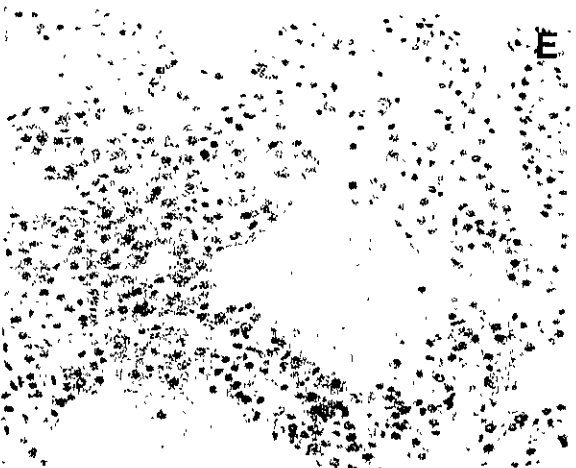
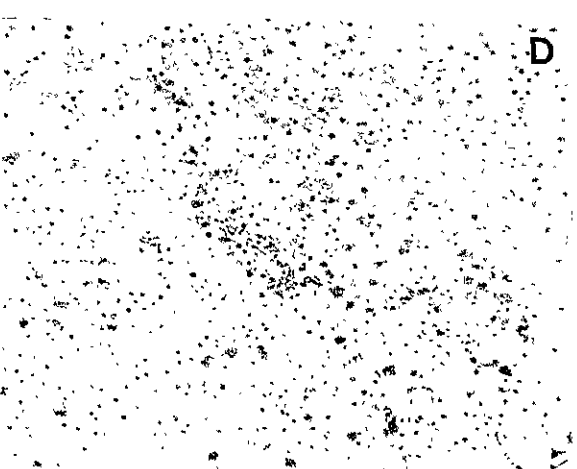
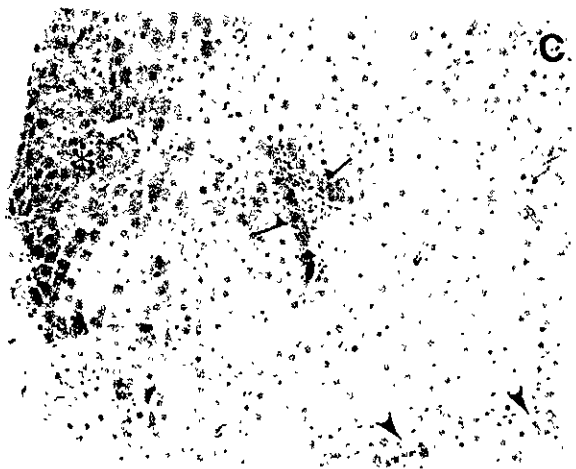
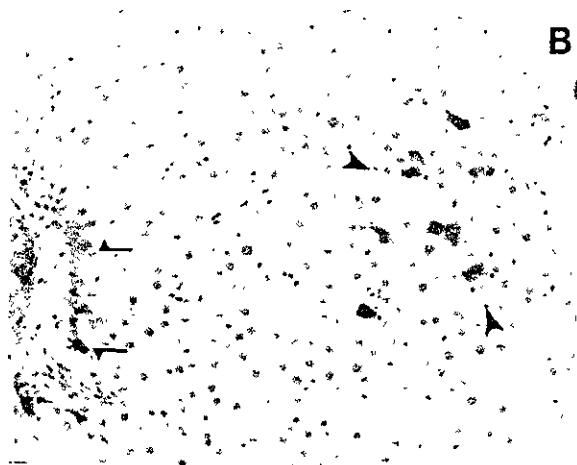
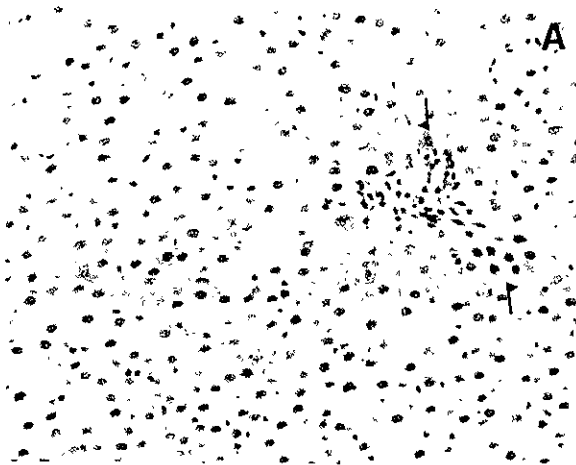
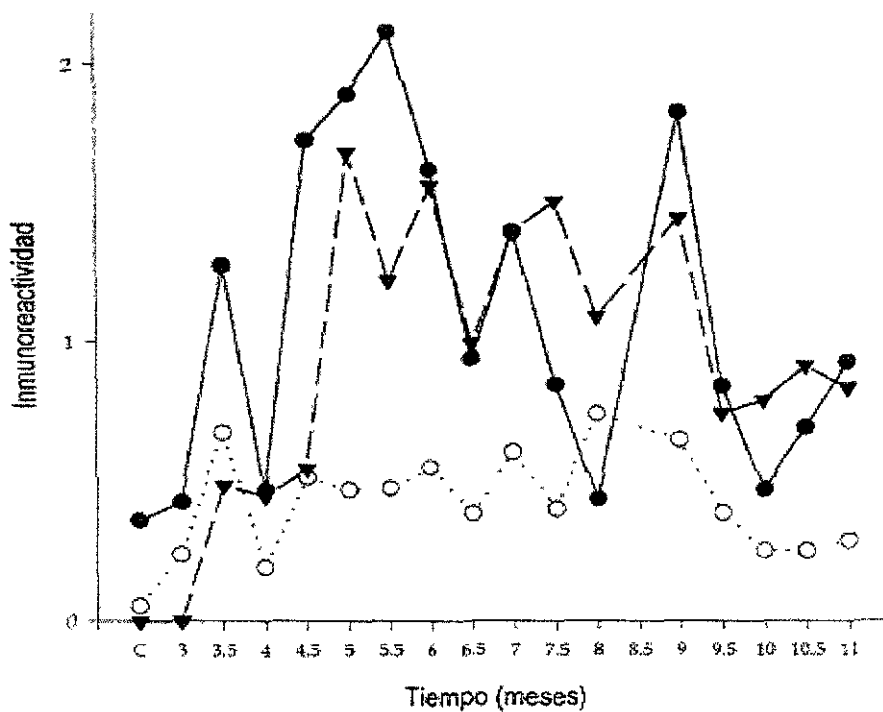


FIGURA 7



**Figura 7. Expresión y localización del activador de plasminógeno tipo urocinaasa (uPA) durante el desarrollo del modelo de hepatocarcinogénesis en cortes de hígado.**

(A) En el hígado de los animales control se observó una ocasional y débil tinción de hepatocitos alrededor de las áreas portal (flecha) y en medio del lobulillo hepático (x 400). (B) Después de dos meses de tratamiento hubo un incremento en el número y en la inmunoreactividad de los hepatocitos del área periportal (flecha) e intralobulillar (cabeza de flecha) (x400). (C) A los cuatro meses del tratamiento, los hepatocitos periportales fueron inmunoreactivos (flechas) y los nódulos neoplásicos mostraban una fuerte heterogeneidad, algunos nódulos exhibieron una fuerte y homogénea inmunoreactividad (asterisco negro), otros nódulos mostraron una tinción media en los hepatocitos localizados en la periferia (asteriscos blanco) (x200). (D) En el mismo intervalo, se observaron gran cantidad de nódulos tumorales con células positivas (x400). (E) Después del sexto mes del tratamiento, se presentaron numerosas células teñidas alrededor de los quistes. (F) Después de un año de la administración de drogas carcinogénicas se detectaron una gran cantidad de hepatocitos inmunoreactivos alrededor de los conductos biliares en neoformación (x200). Los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina. El tratamiento de los animales se describe en detalle en Material y Métodos.



**Figura 8. Análisis de la cinética y distribución celular del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) en el modelo de hepatocarcinogénesis.**

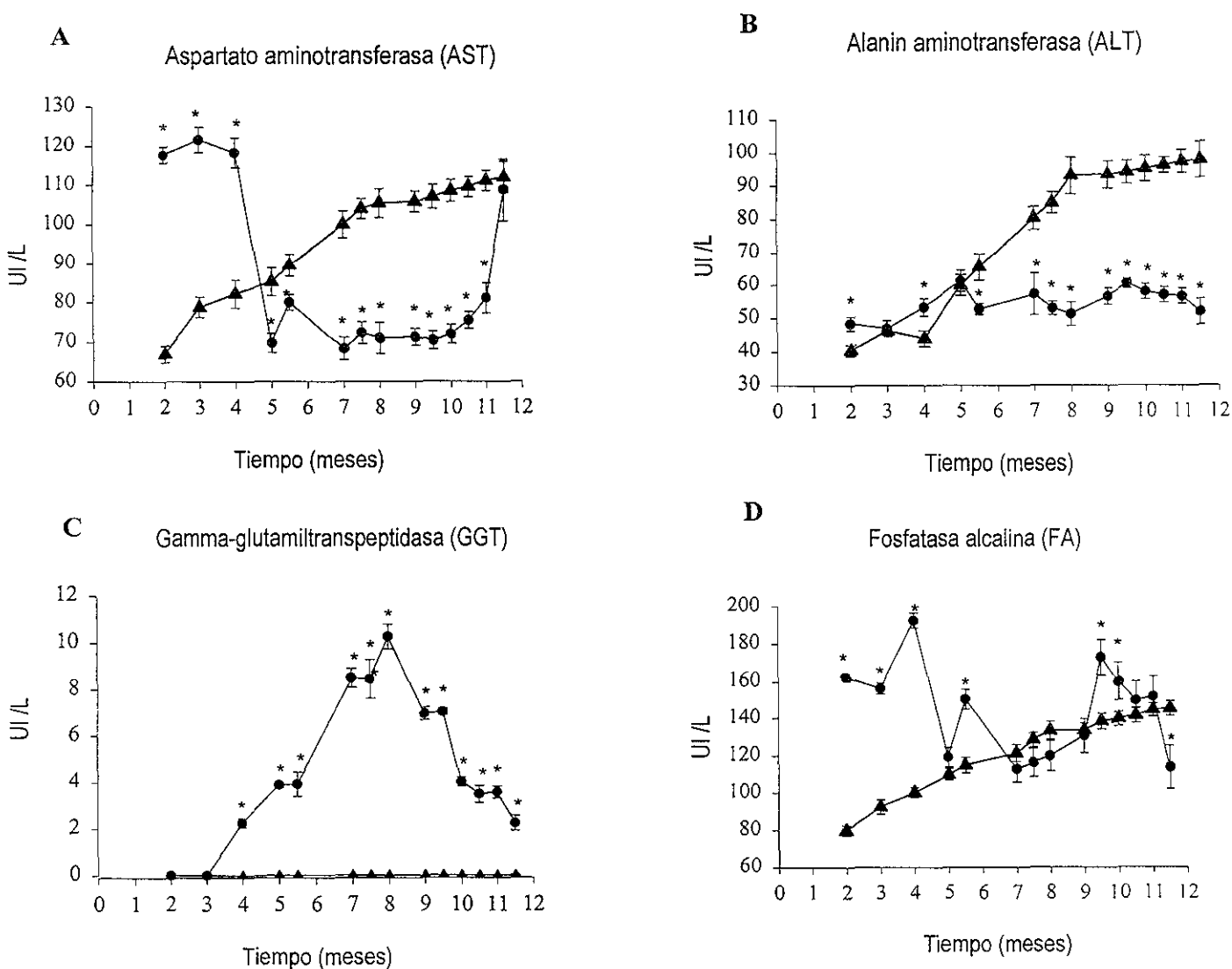
En esta figura se gráfica la inmunoreactividad, la cual resulta de multiplicar el porcentaje de células inmunoteñidas por la intensidad de la tinción, contra tiempo (meses) de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. Las células inmunoteñidas presentes en los nódulos tumorales (▲), zona periportal (●) y las áreas intralobulillares (○) fueron evaluadas. Grupos de 6 animales fueron analizadas a diferentes intervalos de tiempo después de la administración de los carcinógenos. Los cortes de hígado fueron procesados por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-uPA. En donde C representa a los animales en tiempo cero. ( $p < 0.05$ ).

## **Estudio de la función hepática.**

Para evaluar la función del hígado se determinó la actividad de algunas enzimas hepáticas, como la aspartato amino transferasa (AST), alanin amino transferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (FA) y la gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT). En los primeros cuatro meses del tratamiento se observó un incremento bastante considerable de la actividad de las enzimas aspartato amino transferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FA) con respecto a los animales control (Figura 9A y D) ( $p < 0.05$ ). Mientras tanto, en esos mismos tiempos, la gamma glutamiltranspeptisa (GGT) tiende a presentar un incremento constante ( $p < 0.05$ ) y la alanin amino transferasa (ALT) se mantiene en valores semejantes a los controles (Figura 9 B y C).

Posterior al quinto mes y casi hasta el final del modelo la tendencia tanto de la AST como la ALT es a mantener valores por debajo de los registrados en los controles ( $p < 0.05$ ). La FA registra fluctuaciones en sus valores cercanos a los valores obtenidos en las muestras control durante el resto del modelo.

La enzima que mostró una mayor correlación con los cambios histológicos observados en el tejido hepático fue la GGT. El incremento en la actividad del GGT comenzó en el cuarto mes, tiempo en el cual se registra la aparición de los primeros nódulos neoplásicos. La actividad de la GGT incrementó progresivamente y alcanzó su máxima expresión entre el 7 y 8 mes, tiempo en el que existe un gran número de nódulos neoplásicos en el hígado ( $p < 0.05$ ). Después del octavo mes los niveles de la GGT decrecieron hasta valores cercanos a los controles. La GGT no fue detectada en el suero de animales control. La cantidad de proteínas totales en suero, tanto en animales control como los tratados no mostró ningún cambio significativo durante el desarrollo del modelo (datos no mostrados).



**Figura 9. Análisis de la función hepática**

En el suero de los animales tratados (●), junto con grupos control (tratados únicamente con fenobarbital) (▲), se determinaron los niveles de A) Aspartato aminotransferasa (AST), B) Alanin aminotransferasa (ALT), C) Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) y D) Fosfatasa alcalina (FA). La actividad enzimática fue determinada en un Anlizador Coulter. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  DS en ensayos experimentales por cuadruplicado. El (\*) representa la diferencia con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

## **Análisis de la expresión de uPA y cadherina-E a nivel de ARNm durante el desarrollo de la carcinógenesis.**

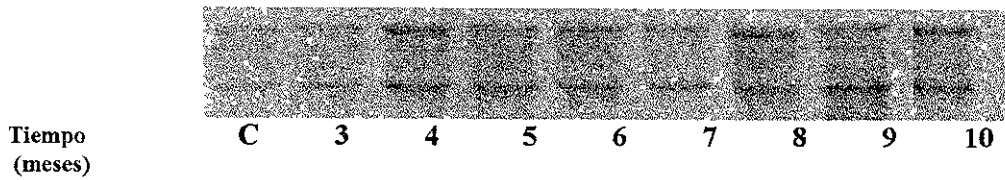
Posterior a la extracción del ARN total, de acuerdo al método de Chomczynsky (ver Material y Métodos), confirmamos la integridad del ARN mediante un gel de agarosa en condiciones reductoras. En la figura 10 A se presentan algunas muestras representativas del ARN total de cada grupo de animales del modelo experimental. En esta imagen se puede observar la calidad óptima de las muestras por la presencia de las bandas de 28S y 18S características del ARN total integro.

Una vez establecidas las condiciones óptimas del RT-PCR para el uPA, la cadherina-E y la  $\beta$ -actina se procedió a procesar las muestras provenientes del tejido hepático de los animales del modelo. En la figura 10 B podemos observar una imagen representativa de los productos de RT-PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos amplificados en cada una de las muestras, concuerda con los tamaños esperados, de acuerdo a la secuencia del ADNc reportada en el Gen Bank. En esta imagen se pueden observar variaciones en la intensidad de las bandas de uPA, mientras que para cadherina-E y  $\beta$ -actina se observa una expresión mucho más constante en los diferentes tiempos estudiados.

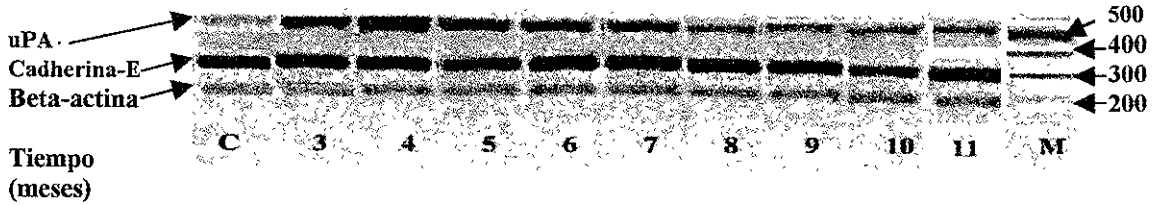
Los niveles de expresión tanto para uPA como para la cadherina-E fueron evaluados de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de un análisis densitométrico de las muestras corridas en los geles de agarosa.

Ayudados por un equipo de captura y análisis de imágenes (marca UVP), se realizó un análisis semicuantitativo de los productos de RT-PCR de las muestras de tejido hepático. En la figura 9C podemos observar la representación gráfica de los datos obtenidos en el análisis semicuantitativo de los niveles de expresión. En esta figura se graficaron las Unidades Relativas de Absorbancia (URA) contra el tiempo del desarrollo del modelo expresado en meses.

A)



B)



C)

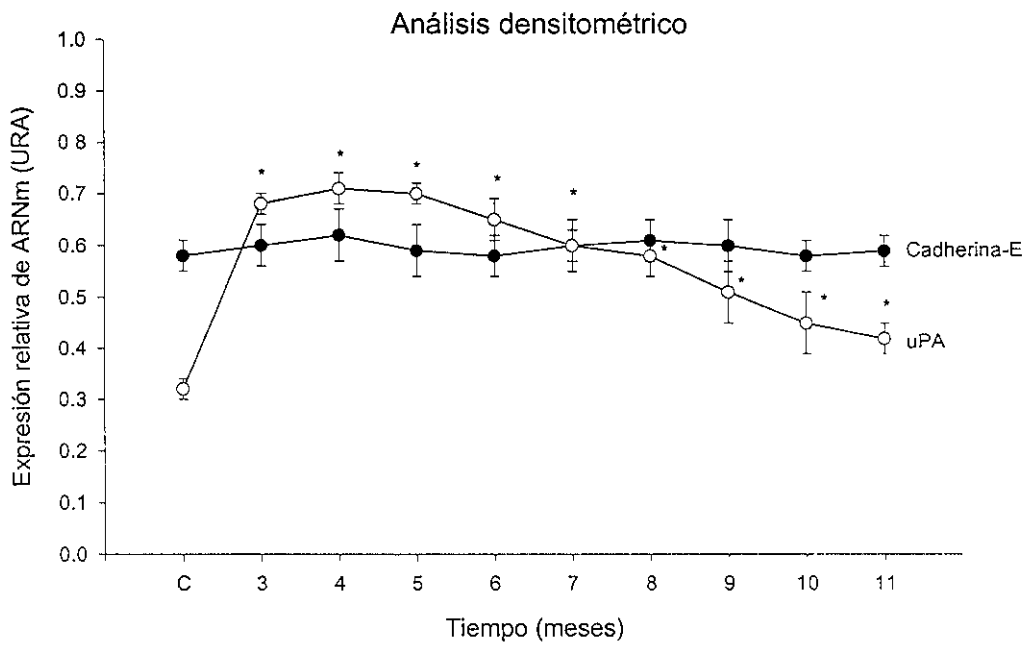


FIGURA 10

**Figura 10. Niveles de expresión del ARNm de uPA y de cadherina-E en muestras de tejido hepático durante el desarrollo del modelo de hepatocarcinogénesis.**

- A) Después de hacer la extracción del ARN total de cada una de las muestras de tejido hepático mediante la técnica de Chomczynsky (ver Material y Métodos), el ARN total se sometió a una electroforesis en condiciones reductoras para verificar su integridad. En esta figura se muestran algunos ejemplos representativos de cada uno de los tiempos analizados. El primer carril (C) representa a los animales control sin tratamiento.
- B) El ARN total extraído, cuantificado y analizado en un gel, fue amplificado por medio de la técnica de RT-PCR (como se especificó en Material y Métodos). De manera específica se amplificó el ARN mensajero que codificaba para el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA), cadherina-E y  $\beta$ -actina (control interno). El último carril (M), representa al marcador de peso molecular.

Los niveles de expresión del ARNm del uPA y cadherina-E fueron calculados de acuerdo a los resultados obtenidos en un análisis densitométrico semicuantitativo de los productos de RT-PCR de las muestras de tejido hepático analizadas en cada tiempo. Se graficaron las Unidades Relativas de Absorbancia (URA) contra tiempo expresado en meses. En donde, las Unidades Relativas de Absorbancia representan el valor promedio del producto de dividir la lectura en unidades de absorbancia de las bandas de uPA (○) entre el valor de  $\beta$ -actina y cadherina-E (●) entre el valor de  $\beta$ -actina respectivamente. El (\*) representa la diferencia con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

Las Unidades Relativas de Absorbancia representan el producto de dividir la absorbancia obtenidas a partir de la banda de uPA entre la absorbancia de la banda  $\beta$ -actina de una misma muestra. Este mismo procedimiento se aplicó a la cadherina-E. En el cálculo de las URA se utilizó la expresión de  $\beta$ -actina como factor de corrección.

De acuerdo a los resultados esquematizados en esta gráfica, podemos observar que la expresión de uPA a lo largo del modelo fue variable. La mayor expresión de uPA se observó entre el tercer y quinto mes, alcanzando valores que duplicaron los niveles obtenidos por los animales control. Posteriormente se registró un descenso constante paulatino hasta el final del modelo, sin llegar a valores semejantes al de los controles.

La expresión de cadherina-E fue más constante, las variaciones a lo largo del modelo fueron pequeñas y no parecen tener una relación directa con la evolución de la carcinogénesis. Los niveles de expresión de la cadherina-E en las muestras control fueron muy semejantes a las observadas en el resto de los animales del modelo.

Al hacer una comparación de los niveles de expresión entre uPA y cadherina-E a lo largo del modelo (ver la Figura 10 B y C), observamos que la cadherina-E se expresó en mayor proporción y de manera más constante en el tejido hepático que el uPA, esto pudiera relacionarse directamente con su función en el tejido hepático.

Los valores de uPA y cadherina-E de los animales del modelo en comparación con los animales control presentan diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos del modelo.



## **DISCUSIÓN**

### **Cáncer de hígado**

Los mecanismos de carcinogénesis en el hígado permanecen como uno de los puntos centrales en investigaciones oncológicas. Se han obtenido significativos avances en el entendimiento de su desarrollo debido a que se han encontrado cambios histológicos, genéticos y metabólicos que clínicamente son relevantes en la transformación maligna.

Sin embargo, existen algunas razones que han dificultado el empleo de muestras clínicas para establecer la secuencia exacta de eventos en el desarrollo del carcinoma hepatocelular. En primer lugar, la obtención de muestras hepáticas de pacientes, requiere del empleo de técnicas invasivas. Además de que la cantidad de muestra obtenida es casi siempre insuficiente. Por otro lado, en estadios tempranos de la enfermedad hay ocasiones que el diagnóstico no puede determinarse por métodos histopatológico, por lo que algunas de las veces se requieren de pruebas específicas en busca de marcadores tumorales que ayuden a confirmar el diagnóstico, sí la muestra de tejido hepático es pequeña este tipo de estudios difícilmente se pueden llevar a cabo.

### **Modelo experimental de hepatocarcinogénesis**

Teniendo en cuenta todo lo anterior se hace necesario el empleo de modelos experimentales en el estudio del inicio y desarrollo del cáncer; este tipo de modelos han contribuido substancialmente al entendimiento del proceso de la carcinogénesis (16, 18, 21).

Una de las aportaciones más importantes de los modelos animales es la posibilidad de hacer un seguimiento de los eventos morfológicos, bioquímicos y moleculares, que conllevan la transformación neoplásica, partiendo de un tejido sano; estudios que difícilmente se podrían realizar en muestras de pacientes. Además del análisis de los mecanismos que inducen, promueven y regulan el crecimiento tumoral, también es posible contribuir, a través de estos mismos modelos, al desarrollo y la evaluación de nuevos tratamientos en contra del cáncer.

En este trabajo se describe el modelo experimental que nos permitió hacer el análisis secuencial del proceso neoplásico *in vivo*, con la oportunidad de estudiar el desarrollo de lesiones cancerosas semejantes a las que se presentan en seres humanos. A través de este modelo se obtuvieron muestras de tejido hepático transformado en diferentes etapas de la carcinogénesis, lo cual permitió cumplir con los objetivos trazados inicialmente en el planteamiento inicial del proyecto. Esto es, evaluar la expresión del activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA) y de la cadherina-E durante el desarrollo del cáncer hepático.

Son indudables las enormes ventajas que aporta el desarrollo de un modelo experimental que permita el estudio de un fenómeno biológico, y más, si este presenta semejanzas con la patología en humanos. Sin embargo, siempre es necesario considerar algunos de los inconvenientes que pueden presentarse durante su desarrollo. De acuerdo a nuestra propia experiencia podemos citar los siguientes puntos:

- El trabajar con un gran número de animales incrementa las necesidades de espacio y de personal especializado para su manejo, entre otras muchas necesidades.
- Los costos del proyecto se incrementan. Se requieren recursos económicos suficientes para la alimentación y manutención de los animales. Además de la compra en el extranjero de todos los reactivos para inducir, promover y mantener el desarrollo del cáncer hepático (DEN, AAF, CCl<sub>4</sub> y FB)
- El tiempo de desarrollo del modelo es largo (10-12 meses), por lo que la obtención, procesamiento, estudio y análisis de las muestras biológicas se prolonga.
- Finalmente, una de las principales consideraciones que se deben de tener en cuenta al trabajar con modelos *in vivo* es que son sistemas biológicos, muchas de las veces con un comportamiento impredecibles.

De entre los múltiples protocolos de hepatocarcinogénesis descritos en la literatura (19, 73), el modelo de “hepatocitos resistentes” desarrollado por Solt-Farber (20) ofrece la ventaja de ser un modelo bien caracterizado, mediante el cual se puede obtener una alta incidencia en el desarrollo de cáncer hepático.

## **Características histopatológicas del tejido hepático en el modelo experimental**

Con la ayuda de este modelo se logró desarrollar en nuestros animales, un carcinoma hepatocelular con características histológicas semejantes a las encontradas en pacientes con hepatocarcinoma bien diferenciado. Sin embargo, a pesar de esas semejanzas existen diferencias notables que deben de ser mencionadas.

En pacientes con carcinoma hepatocelular existe una enorme asociación entre cirrosis y cáncer. Se estima que entre un 60 a un 90% de los casos con cáncer hayan sido precedidos por cuadros cirróticos. A su vez, la cirrosis se correlaciona directamente con hepatitis viral y alcoholismo crónico (85). Esto hace que existan diferencias en el tipo de lesiones que encontramos en el desarrollo del modelo de hepatocarcinogénesis química y las que se encuentran en pacientes con carcinoma hepatocelular.

A diferencia de los pacientes con carcinoma hepatocelular, en los animales del modelo se encontraron septos fibróticos, lesiones semejantes a las encontradas en pacientes cirróticos, en más del 10% de los animales tratados. Al igual que en pacientes con procesos de hepatitis infecciosas, nosotros encontramos en los animales del modelo zonas locales de necrosis, principalmente en el área centrilobulillar, procesos degenerativos caracterizados por hepatocitos con apariencia edematosa, citoplasma alargado, espacios citoplásmicos vacíos, etc. Otra de las características frecuentes en pacientes con cáncer hepático es la presencia de ictericia, sin embargo en los animales del modelo no se observaron casos de ictericia, lo cual coincide con la nula apreciación de colestasis en los cambios patológicos del hígado de los animales del modelo.

### **Manifestaciones clínicas**

Del cuadro clínico presentado por los animales del modelo, la hepatomegalia y la disminución del peso corporal fueron las características más sobresalientes. Desde el inicio del modelo se observó una hepatomegalia discreta en los animales sometidos al tratamiento con agentes carcinogénicos, de acuerdo al análisis histológico del tejido hepático y al registro del peso del hígado (Tabla II). El incremento en el peso del hígado, en los primeros cuatro meses se debió

probablemente al proceso inflamatorio crónico. Posteriormente el incremento fue reflejo del crecimiento de los tumores hepáticos, los cuales alcanzaron tamaños y pesos muy considerables.

El registro del peso corporal, de animales tratados y animales sanos, permitió comparar y relacionar las diferencias en los pesos de estos dos grupos de animales, con las características macro y microscópicas de las lesiones hepáticas. Si comparamos los resultados de Solt-Farber en 1983 (18) con los nuestros, podremos observar que los valores obtenidos en la sobrevida y la disminución del peso corporal son muy semejantes. En el primer caso, nosotros obtuvimos una sobrevida del 75% hasta el octavo mes del modelo contra un 60-70% reportados por este grupo en el mismo tiempo. En cuanto al comienzo franco en la disminución del peso corporal, esta se observó entre el séptimo y octavo mes de iniciado el modelo, de acuerdo al reporte de ambos grupos.

La disminución en el peso corporal pudo deberse a un cuadro de anorexia, o bien a una disminución en los procesos de biosíntesis de proteínas o ambas; esta característica se presenta constantemente en pacientes con carcinoma hepatocelular, por lo que no es sorprendente que este tipo de manifestaciones clínicas se presenten también en los animales con carcinoma.

El tiempo tan largo que transcurre entre inicio del crecimiento tumoral y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad en los pacientes, son algunas de las principales razones por las que esta enfermedad en humanos tiene un promedio de vida tan bajo. En tanto que la mortalidad en los animales del modelo se incremento conforme avanzó el desarrollo del cáncer hepático; es probable que el incremento en la mortalidad se relacione con el desarrollo de insuficiencia hepática crónica o alguna otra complicación asociada. En pacientes con carcinoma hepatocelular se han reportado una serie de síndromes asociados a éste, los cuales muchas veces agravan el cuadro clínico. Estos síndromes pueden ser agrupados en manifestaciones endocrinas (eritrocitosis, hipercalcemia, etc), cambios metabólicos (hipoglucemia, hiperlipidemia, macroglobulinemia, etc.) y síndromes hematológicos

(disfibrinogenemia, disproteinemia, etc.). El curso de la enfermedad varía de paciente a paciente, pero su desenlace frecuentemente es fatal, con una supervivencia de 6 a 8 meses (6).

El modelo de "hepatocitos resistentes" fue desarrollado originalmente por Solt-Farber con el objetivo de evaluar los cambios bioquímicos, celulares y moleculares de las primeras poblaciones celulares transformadas, llamadas "células iniciadas". Ellos hicieron el seguimiento de los cambios histológicos por un período de cuatro semanas, por lo que las alteraciones preneoplásicas y neoplásicas posteriores a ese tiempo no fueron evaluadas (3). Sin embargo, se reportó el desarrollo de carcinoma hepatocelular de un pequeño grupo de animales evaluados a los 8 meses de iniciado el modelo.

Trabajos posteriores han descrito con detalle la cinética en la aparición de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas en la carcinogénesis química (21, 22). Las cuales concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro modelo.

En la primera etapa del modelo de hepatocarcinogénesis y una vez activada la DEN (agente inductor) en el propio hígado, este forma aductos con las moléculas de DNA de los hepatocitos, generando cambios a nivel genético (Figura 1). El efecto de la DEN es tan puntual en células individuales, que no existen cambios aparentes en la arquitectura del tejido hepático, de acuerdo a los propios reportes de Solt-Farber (11,18). En esta etapa, es donde se generan las células iniciadas, resistentes al efecto inhibitorio del crecimiento por parte de otros carcinógenos. Estas células iniciadas pueden revertir sino existe un estímulo que permita su proliferación (ver Figura 1). Si esta proliferación se hace inicialmente de manera selectiva, se favorece el desarrollo de nódulos con características pre-neoplásicas. Estas son las funciones que cumplen el estímulo generalizado ( $\text{CCl}_4$ ) y el promotor selectivo (2-AAF) dentro del esquema de hepatocarcinogénesis química. Estos nódulos pre-neoplásicos se hacen visibles en los estudios histopatológicos de las muestras de tejido hepático, hasta una o dos semanas después de administrado el 2-AAF. El fenobarbital acelera el proceso de aparición de estos nódulos, sin interferir directamente en el número y diferenciación de las lesiones. La aparición de las primeras lesiones posteriores a la administración de los agentes tóxicos (DEN, AAF,  $\text{CCl}_4$ ), no fueron evaluadas los animales de nuestro modelo. Restringiéndose el análisis

histopatológico a muestras correspondientes al período comprendido entre el segundo y el doceavo mes.

El diagnóstico entre nódulos displásicos y carcinoma hepatocelular es difícil de establecer, sin embargo, existen ciertas características morfológicas que ayudan a establecer el diagnóstico; el grado de expresión de algunas de estas características se establecen de acuerdo a ciertos ya establecidos. Las displasias pueden presentar ciertas características como atipia nuclear baja o moderada, relación núcleo citoplasma ligeramente incrementado, citoplasma eosinofílico, figuras mitóticas leves. El incremento de algunas de estas características son consideradas como el paso hacia carcinoma hepatocelular. Incremento en el número de lesiones con atipia nuclear elevada, elevado promedio núcleo-citoplasma, densidad nuclear al menos dos veces mayor de lo normal, prominentes nucleolos, bordes nucleares irregulares, figuras mitóticas, son características del carcinoma hepatocelular (86). Dentro de este análisis morfológico la invasión es difícil de diagnosticar.

En nuestro modelo la aparición de las primeras lesiones neoplásicas comenzaron a observarse alrededor de la semana catorce, después de iniciado el modelo, datos que coinciden con los ya reportados (22). No se presentaron lesiones aparentes en el resto de los órganos, con excepción de los pulmones. En los pulmones de algunos animales de los últimos seis meses, se detectaron grandes infiltrados inflamatorios con gran cantidad de leucocitos. En pacientes tratados con  $\text{CCl}_4$  pueden mostrar cierta patología en pulmón semejante a la observada en los animales del modelo como edema, paredes alveolares fibróticas y proliferación epitelial (18). No existen reportes en la literatura que puedan atribuir este efecto al fenobarbital, el cual por su prolongada administración pudiera suponerse estar directamente involucrado con estas alteraciones en el tejido pulmonar.

De las principales alteraciones citotóxicas de las células hepáticas inducidas por agentes tóxicos se encuentra la peliosis hepática. Esta alteración hepática es común observarla en enfermos con ingesta elevada y crónica de alcohol (3). En nuestro modelo encontramos este tipo de alteraciones en animales del último trimestre. Sin embargo, no existen datos

bibliográficos que nos pudieran indicar que estas alteraciones histológicas pudieran estar inducidas por el fenobarbital.

Se sabe que la dilatación sinusoidal ocurre en cualquier condición en la cual el flujo hepático de sangre se ha impedido, por lo que el incremento en el tamaño del hígado y la degeneración arquitectónica del tejido hepático en esa etapa tan avanzada del cáncer, pudieran provocar la aparición de este tipo de alteraciones. Como se mencionó anteriormente, es común observarla inducida por agentes tóxicos y en cáncer hepático.

La esteatosis registrada se relaciona directamente con el tetracloruro de carbono utilizado en el modelo experimental, el cual bloquea la secreción de triglicéridos al plasma, resultando en un incremento en la acumulación en los hepatocitos, lo cual favorece la aparición de esteatosis además de producir necrosis en la zona 3 del lobulillo hepático.

### **Efecto directo de los compuestos carcinogénicos en la histopatológica del modelo de hepatocarcinogénesis**

El fenobarbital acelera la expresión de las lesiones neoplásicas previamente inducidas por carcinógenos sin alterar las características de las lesiones; causan proliferación del retículo endoplásmico liso, acoplado al incremento en la síntesis de ARN y enzimas metabolizadoras de drogas. También produce un incremento en la actividad mitótica de los hepatocitos, sin representar regeneración como consecuencia de la toxicidad. No se ha demostrado que presente algún potencial carcinogénico (87).

En tanto la dietilnitrosamina induce lentamente cáncer de hígado con una simple dosis por vía oral, intraperitoneal o intravenosa. Además de inducir la presencia de múltiples focos de proliferación y el crecimiento de hepatocitos intensamente basofílicos (88).

Por lo que respecta al 2-acetilamino fluoreno, este es un agente necrótico a hepatocitos, puede causar la metilación o alquilación de las bases púricas a nivel de ADN. Induce un máximo de proliferación celular después de la cuarta semana de administrado (89, 90).

## **Actividad de las enzimas hepáticas en el desarrollo del modelo**

Además de conocer las alteraciones histológicas del hígado durante la evolución de la carcinogénesis, nosotros evaluamos el impacto de estas alteraciones en la funcionalidad de este órgano. Por lo que nos apoyamos en las pruebas de funcionamiento hepático.

Si bien, algunas pruebas no miden la función hepática tal como las aminotransferasas o la fosfatasa alcalina, sí detectan el daño a las células del hígado o interferencias del flujo biliar (91). Los valores séricos más elevados para la fosfatasa alcalina se observan en pacientes con enfermedad colestática, tanto en la obstrucción intrahepática como la extrahepática. No existe diferencia en los valores mediante los cuales se pueda distinguir entre una colestasis producida por un cáncer, por cirrosis o por alguna otro tipo de obstrucción biliar.

De las aminotransferasas, también llamadas transaminasas, se sabe que son enzimas sensibles al daño a células hepáticas. La alanina amino transferasa (TGP/ALT) y aspartato amino transferasa (TGO/AST) son las enzimas hepáticas más frecuentemente determinadas en la clínica. La ALT parece ser una prueba más sensible y específica de daño hepatocelular agudo que la AST y comúnmente es usada para documentar incidencia de hepatitis viral (92). Las aminotransferasas típicamente se encuentran elevadas en los desórdenes hepáticos. Estos incluyen todos los tipos de hepatitis crónica, cirrosis, mononucleosis infecciosa, carcinoma metastásico y enfermedad alcohólica y granulomatosas del hígado.

De los resultados obtenidos en las pruebas de funcionamiento hepático realizadas a los animales del modelo podemos comentar de manera general, que las pruebas no reflejaron una relación directa entre los niveles de actividad enzimática y la evolución del cáncer en el hígado. Particularmente podemos mencionar que la actividad de la AST y la fosfatasa alcalina se ven elevadas en los primeros cuatro meses del modelo experimental; estos incrementos concuerdan con lo reportado en la literatura (91) y pudieran ser el resultado de los cambios en el tejido hepático debido a las alteraciones preneoplásicas y neoplásicas. Sin embargo, la disminución en la actividad de estas dos enzimas que observamos después del cuarto mes, junto con la disminución en la actividad de la ALT, pudieran estar reflejando de alguna manera la progresión del daño hepático debido a la evolución tumoral. Esta evolución



conlleva cambios en la expresión de proteínas, que pudieran tener alguna actividad en la inducción de estas enzimas hepáticas; llega a tal nivel la transformación neoplásica en las células hepáticas que la síntesis de estas enzimas se ve alterada.

Existen reportes que documentan el incremento en la actividad de algunas de estas enzimas hepáticas como resultado del tratamiento con fenobarbital (93). De acuerdo a nuestros resultados, el incremento en la actividad de estas enzimas que observamos en los animales control, no se presenta en los animales tratados probablemente por que las células hepáticas transformadas ya no tienen la capacidad de responder al efecto que tiene el fenobarbital sobre la actividad de estas enzimas. Coincidentemente, la disminución de la actividad enzimática, de por lo menos tres de las cuatro enzimas estudiadas, se presentan al tiempo que se observan en cortes histológicos la transición de lesiones preneoplásicas a neoplásicas. Esta transformación conlleva la alteración en los patrones de expresión y la actividad metabólica de proteínas que pudieran estar involucradas en las vías de inducción del fenobarbital. En ninguna de estas tres enzimas se logra la recuperación a niveles semejantes a los que presentan los animales control en el resto del modelo. Por lo que, tal vez, estas determinaciones bioquímicas no proporcionen mayor información en etapas avanzadas del cáncer en nuestro modelo.

El efecto que tiene el fenobarbital sobre la expresión y la actividad de las enzimas hepáticas es aún muy controversial. Algunos trabajos clínicos han reportado que los niveles séricos de las aminotransferasas en pacientes tratados con fenobarbital no se ven afectados (93). Existen algunos otros reportes en modelos experimentales tanto en ratas (86), como en conejos (94), en donde no han encontrado ninguna variación en los niveles de las enzimas hepáticas al suministrar varias dosis de fenobarbital (95).

Sin embargo, también existe la contraparte: aquélla en la cual se sugiere una relación directa entre el incremento en la actividad de las transaminasas, fosfatasa alcalina y la gamma-glutamil transpeptidasa con la administración de fenobarbital en modelos experimentales (95 - 97). Esta elevación decrece y los niveles séricos regresan a valores normales una vez que se retira el fenobarbital. Algunos otros reportes concluyen que el fenobarbital eleva más

directamente los niveles séricos de la fosfatasa alcalina mientras que las transaminasas se mantienen en niveles normales (98, 99).

Entre los marcadores enzimáticos la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) es uno de los más utilizados. La actividad específica de la enzima en hígado normal es baja. En ratas como en humanos sus niveles se encuentran elevados en hepatocitos durante la etapa fetal y la infancia. Niveles elevados de GGT soluble son encontrados en el suero de pacientes con carcinoma hepatocelular y alcoholismo crónico. El incremento de la actividad enzimática en suero probablemente se deba a su origen hepático, pero el mecanismo preciso es desconocido (94). Debido a que la actividad enzimática de la GGT se encuentra presente en hepatocitos fetales y reaparece en el hígado adulto en lesiones neoplásicas, este ha sido considerado como marcador oncofetal, con un valor significativo análogo al que representa la alfa feto proteína (AFP) en hepatocarcinogénesis humana. Sin embargo, al igual que la AFP, la especificidad del marcador se encuentra comprometida dentro de algunas condiciones. Por ejemplo, la actividad enzimática se encuentra presente en ductos biliares y se incrementa la cantidad en hepatocitos periportales en respuesta a varias condiciones no carcinogénicas incluyendo la edad, ingesta de fenobarbital y algunos tratamientos esteroideos entre otros (95). El incremento que observamos pudiera estar relacionado en parte, con la proliferación de estos ductos biliares. Caso diferente fue el de la GGT la cual reflejó en su cinética una relación más directa entre la elevación de su actividad en los primeros seis meses del modelo y el desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas.

### **Expresión del uPA en el modelo de hepatocarcinogénesis**

Por otra parte, el activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA), sus inhibidores (PAI's) y su receptor (u-PAR) forman en conjunto un sistema proteolítico complejo, el cual ha demostrado su importancia y relevancia en la invasión tumoral y la metástasis (64 - 66). Se ha propuesto que para definir la participación del uPA en el cáncer, es necesario conocer el papel que juegan los distintos componentes del sistema de activación del plasminógeno en el tumor *in vivo*, así como su localización.

Como mencionamos anteriormente, el uPA forma parte de un sistema enzimático que participa en el remodelamiento de la matriz extracelular en procesos fisiológicos como la ovulación, embriogénesis, angiogénesis, entre otros y en procesos patológicos como la proliferación celular, en el cáncer, la invasión y la metástasis (100).

Son múltiples los ejemplos que se pueden citar de estudios en donde se evalúen los niveles de expresión del uPA en muestras de pacientes con algún tipo de cáncer (65, 101), incluyendo cáncer de hígado (80). Sin embargo, no existen reportes en la literatura en donde se cite algún modelo experimental de carcinogénesis en donde se haya estudiado la cinética de expresión de algún miembro del sistema de expresión del activador de plasminógeno en este proceso. Por lo que poco se sabe de la presencia del uPA en las etapas iniciales del cáncer, su evolución durante la carcinogénesis, la localización celular y tisular de esta molécula en las diversas etapas de la carcinogénesis y, la correlación que existe entre esta molécula y las alteraciones en la arquitectura del tejido.

No existe suficiente información acerca de la expresión del gen de uPA en tejido tumoral hepático en humanos. En un estudio realizado con muestras clínicas de enfermos hepáticos se detectaron niveles elevados del ARNm para uPA en el 100% de las muestras con carcinoma hepatocelular y en un 70% en el tejido peritumoral. Sin embargo, en las muestra de tejido no tumoral (tejido sano, muestras con esteatosis y tejido con hepatitis crónica), se han detectado niveles muy bajos del ARNm para uPA (79). Al igual que el uPA, el uPAR se expresa en bajos niveles en tejido hepático no tumoral (102). A nivel de proteínas la presencia del uPA ha sido detectada principalmente en el citoplasma de las células cancerosas y las células del estroma hepático (103).

En las etapas iniciales del presente estudio, observamos una intensa inmunoreactividad en contra del uPA en los hepatocitos localizados en el centro de las lesiones preneoplásicas y en la placa limitante. Después de tres meses, este patrón se incrementó en hepatocitos evidentemente neoplásicos. Esta heterogeneidad en la positividad a uPA por parte del tejido hepático puede tener su origen, en parte, a la distribución azarosa de las células iniciadas

Posterior a la iniciación, algunas de estas células sufren transformación, promoción y propagación, hasta formar nódulos tumorales. Sin embargo, es importante resaltar que una gran parte de las células positivas a uPA se encontraron alrededor de los espacios porta. Los cuales de acuerdo a la teoría de Rappaport, estas células pertenecen a la zona 3, células que tienen el contacto inicial con los compuestos carcinogénicos, las cuales sufren los efectos transformantes más severos dentro del tejido hepático.

La variabilidad en la tinción para uPA pudiera deberse también, a la heterogeneidad en la composición de la población celular presente en los nódulos. A nivel molecular, la progresión tumoral y la heterogeneidad fenotípica asociada resultan de múltiples mutaciones que se acumulan de manera independiente en cada célula, generando de esta manera subclonas con características diferentes.

En el carcinoma hepatocelular humano se ha visto que la invasividad a través del sistema del activador de plasminógeno pudiera estar bajo la coordinación del factor de crecimiento hepático (HGF) (104). Este factor no se puede relacionar directamente con el daño hepático en cáncer, pero cobra mucha relevancia al correlacionarlo con el incremento en la expresión del uPA. Datos previos nos muestran que la pérdida en el balance entre HGF, c-met y uPA ocurre durante la hepatocarcinogénesis (105, 106). Particularmente c-met y uPA parecen ser coordinadamente regulados, y sus niveles de expresión se encuentran inversamente relacionados con la sobrevida; debido a que asumen un papel importante en el desarrollo y progresión del carcinoma hepatocelular pueden ser considerados como posibles marcadores pronósticos .

Generalmente, al uPA se le ha relacionado con los procesos patológicos resultado de la evolución tumoral, como son la invasión y la metástasis (14, 107, 108). Procesos que se observan en las etapas avanzadas de cualquier cáncer en humanos o en modelos animales. Sin embargo, no se sabe nada o casi nada de la participación del uPA en las etapas iniciales del cáncer. En nuestro trabajo podemos apreciar variaciones en los niveles de expresión del uPA, tanto a nivel de ARNm como de proteína. Estas variaciones se observan como una elevación

en la síntesis de uPA en el tejido hepático desde las primeras semanas de iniciado el modelo experimental, en las cuales se puede apreciar la presencia de lesiones preneoplásicas, de acuerdo a lo observado en los cortes histológicos. Estos resultados nos indican que, la participación descrita en reportes previos del uPA en la movilidad celular y la degradación de la matriz extracelular característicos de la invasión y la metástasis, no sea exclusiva sino también probablemente tienen una participación como mitógeno. Se tienen antecedentes de la participación del uPA como mitógeno en células de músculo liso vascular (100). Se sabe que células en estado latente o G<sub>0</sub>, como se encuentran la inmensa mayoría de las células del tejido hepático sano en animales adultos, expresan niveles muy bajos de uPA; durante la transición a células proliferantes se disparan estos niveles (109, 110). Una de las características más notables en las etapas iniciales de cualquier proceso de transformación neoplásica, es la alteración en los mecanismos de control de la proliferación (22). Niveles elevados en la expresión de uPA desde etapas tempranas del cáncer han sido encontrados en cáncer gástrico (111) y cáncer de mama (112).

En condiciones experimentales de regeneración hepática los componentes del sistema de activación del plasminógeno han sido detectados principalmente en estructuras semejantes a ductos formados por células ovals en expansión, pero no en hepatocitos maduros. Estas características junto con la presencia de factores de crecimiento pueden conferirle, a las células ovals, ciertas ventajas proliferativas sobre otras células del tejido hepático (113).

La actividad de los componentes del sistema del activador de plasminógeno en un tumor no depende únicamente de la elevación en sus niveles de expresión, sino también de la relación que exista entre los elementos que conforman este sistema. En cáncer hepático y de mama, pacientes con niveles elevados del complejo uPA:Inhibidor (uPA:PAI-1) presentan una mayor supervivencia que aquellos en los cuales se detectan un incremento en la expresión de cualquiera de estas dos moléculas de manera individual (78, 114). En cáncer hepático se ha estudiado el complejo uPA:Receptor (uPA:uPAR), y se ha encontrado una relación directa entre el incremento en la formación de este complejo y el potencial invasivo de los tumores (115).

La participación del uPA en la carcinogénesis de nuestro modelo experimental pudiera estar dando lugar a tres diferentes niveles del proceso. El primero sería a nivel del incremento en la proliferación de células ovoides. Se ha documentado que durante el desarrollo de la carcinogénesis química y en procesos de regeneración hepática, existe la proliferación de células ovoides. Estas células son consideradas como las células totipotenciales del hígado a partir de las cuales se pueden desarrollar lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas en el tejido hepático (113). Estas células se encuentran localizadas en el espacio periportal; zona que registra una elevación considerable en la síntesis de uPA durante las primeras etapas de la carcinogénesis (116). Una de nuestras evidencias fue el incremento del uPA en algunas células de los espacios porta, por lo que este incremento pudiera verse como reflejo del incremento de la proliferación de estas células.

Sin embargo, no son los únicos eventos durante la carcinogénesis en los que se puede ver involucrado el uPA. Tal vez, el evento más importante en el cual participe el uPA sea la migración y liberación de las células de un tumor primario, el cual puede generarse desde que el tumor primario se encuentra en formación. Aún cuando el incremento es considerablemente elevado en etapas francas de invasión y metástasis; y a pesar de que en nuestro modelo no tuvimos indicios de invasión y metástasis, estos procesos no se pueden descartar en nuestro animales. Ya que si bien no se observó invasión en el análisis histopatológico, ni tampoco se registró metástasis a otros tejidos u órganos, siempre existe la posibilidad de sufrir una micrometástasis intrahepática. La tendencia en los niveles de expresión del uPA a nivel de proteína y de ARNm fueron semejantes en casi todos los tiempos.

Otra de las participaciones directas del uPA es en la angiogénesis, el incremento del uPA en el último bimestre del modelo pudiera relacionarse con la dilatación de conductos biliares y de vasos sanguíneos de las muestras analizadas.

No existen datos bibliográficos que sugieran algún efecto del fenobarbital, o cualquiera de los otros compuestos utilizados en el modelo de hepatocarcinogénesis, en los niveles de expresión del uPA.

## **Expresión de la cadherina-E a nivel de ARNm en el modelo**

Las cadherinas median las interacciones célula-célula a través de un sistema de adhesión, participando de manera importante en procesos como el desarrollo y la morfogénesis. La cadherina-E es la principal molécula de adhesión del tejido epitelial y ha sido implicada en el proceso de carcinogénesis, debido a que se relaciona la frecuente pérdida de su funcionalidad con la progresión del cáncer epitelial. En ensayos de transfección *in vitro* en cultivos celulares, se ha logrado restablecer la funcionalidad de la cadherina-E de modo que se permite revertir el fenotipo de lesión maligna a lesión benigna (35). Debido a su papel en la invasión y la metástasis el gen de la cadherina-E es considerado como un gen supresor de la invasión (117)

Junto con las alteraciones en la expresión y la funcionalidad de la cadherina-E, existen algunas otras moléculas de adhesión que han sido estudiadas en cáncer hepático; entre ellas podemos citar a la integrina (alfa 3, beta 1), la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) y la proteína nm 23-H1 (118, 119).

La ausencia o alteración en la expresión de la cadherina-E se ha propuesto como marcador de malignidad en diferentes tipos de tumores (31), entre ellos el cáncer de hígado (76). La desregulación en la expresión de la cadherina-E se asocia con un deterioro de la sobrevida de pacientes con carcinoma hepatocelular (111).

La inmunolocalización de cadherina-E en muestras de carcinoma hepatocelular se ha visto disminuida en comparación con tejido hepático no tumoral. Mientras tanto, las cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), proteínas del complejo de adhesión célula-célula, muestran una sobre expresión en biopsias de pacientes con carcinoma hepatocelular. La expresión de cadherina-E correlaciona significativamente de manera inversa con el grado histológico del CHC (120), manteniéndose la expresión de la molécula en valores casi normales en los tumores bien diferenciados. En contraste las cateninas correlacionan directamente con el grado de diferenciación de los tumores, observándose una mayor presencia en los tumores menos diferenciados. De esta manera, se correlaciona la disminución en la expresión de cadherina-E,  $\alpha$ -catenina y  $\gamma$ -catenina

y una sobre expresión de la  $\beta$ -catenina con un pobre pronóstico en pacientes con carcinoma hepatocelular (121).

Como se mencionó en la introducción, la expresión y funcionalidad de la cadherina-E pueden ser reguladas a varios niveles. Mutaciones puntuales a nivel de DNA, desregulación transcripcional, modificaciones en el sitio de unión a calcio, modificaciones postraduccionales como fosforilación o proteólisis, son algunos de los mecanismos mediante los cuales esta molécula puede ser regulada. Sin contar su estrecha relación con las cateninas, proteínas que pueden ser igualmente reguladas a varios niveles, y sin las cuales las cadherinas no puede llevar a acabo su actividad biológica. A pesar de la enorme correlación que existe entre desregulación de la adhesión celular vía complejo cadherina-cateninas e invasión y metástasis (122), hasta el momento no es posible limitar los estudios a nivel de expresión (RNA o proteína) para poder considerarlo como ensayos pronósticos, sino que se debe de incluir el análisis de los mecanismos de expresión de ambas familias de proteínas que forman el complejo de adhesión. De los agentes promotores e inductores utilizados en nuestro modelo experimental no existe hasta el momento reportes en la literatura que mencionen algún efecto directo de estos compuestos sobre la expresión de la cadherina-E.

De acuerdo con nuestros resultados, la expresión del gen de cadherina-E en el hígado de los animales de nuestro modelo experimental, se mantiene constante durante el inicio y la evolución del carcinoma hepatocelular. Las Unidades de Densidad Relativa obtenidas en las muestras del modelo son muy semejantes a las del grupo control. No se observa alguna correlación entre el tiempo de desarrollo de la carcinogénesis y los niveles de expresión de la cadherina-E. Al tratar de hacer una correlación entre los niveles de expresión de uPA y cadherina-E se observa que se expresan de manera independiente uno de otro, que los niveles de expresión de la cadherina-E son más constantes que los del uPA. Al comparar con el tipo de lesiones y los niveles séricos de las enzimas hepáticas no se encontró ninguna relación directa.

En concordancia con nuestros resultados creemos que, el carcinoma hepatocelular bien diferenciado conserva las características de expresión para cadherina-E y no presentar indicios evidentes de invasión o metástasis, no altera sus niveles de expresión de cadherina-E



Se ha estudiado la relación existente entre la expresión de la cadherina-E y uPA en muestras de pacientes con cáncer gástrico metastásico. La sobre expresión de uPA y la reducción en la expresión de la cadherina-E ha sido asociada con metástasis a nódulos linfáticos, invasión a vasos y un pobre pronóstico. Además, los tumores con un perfil uPA(+)/ cadherina-E (-) se han asociado con el desarrollo de tumores grandes, y con un riesgo cuatro veces mayor de muerte que lo que presentan los pacientes con perfil uPA (-)/ cadherina-E (+). La relación uPA/cadherina-E ha sido asociada con una intensa invasión, metástasis a hígado, diseminación peritoneal, metástasis a nódulos linfáticos e invasión venosa. Además de presentar un pobre pronóstico y una alta recurrencia, comparado con otros grupos de pacientes (123).

En ensayos *In vitro*, el HGF estimula la motogénesis, pero no la proliferación de células cancerosas. La motilidad celular es acompañada por un rápido decremento en la unión al citoesqueleto vía la cadherina-E, una aceleración en la adhesión celular al sustrato, y la *up-regulation* del uPA a nivel de proteína y ARNm, involucrando la activación del sistema proteolítico uPA / uPAR (124).

Se sabe que alteraciones en la estructura del citoesqueleto correlacionan con la inducción del ARNm del uPA y esto incrementa la transcripción del gen de uPA (79). Durante la transformación neoplásica existen una gran cantidad de cambios a nivel de citoesqueleto y las proteínas de adhesión ancladas a las proteínas del citoesqueleto. Aún cuando nosotros no observamos cambios en la expresión del ARNm de la cadherina-E en los animales del modelo experimental no podemos descartar la posibilidad de que la proteína se exprese de manera correcta. Perturbación en la estructura del citoesqueleto posiblemente alteren la integridad de la matriz nuclear, la cual a su vez estimula en parte un incremento en los niveles de expresión del gen para uPA (70).

Como control interno del ensayo se utilizó la expresión de la proteína constitutiva  $\beta$ -actina. Cabe mencionar que inicialmente se pretendió utilizar como control la expresión de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, se detectó que sus niveles de expresión se alteraban durante el desarrollo de la carcinogénesis.

## CONCLUSIONES

Después de planear, desarrollar y analizar detenidamente este trabajo hemos podido llegar a las siguientes conclusiones:

- El uso de animales como modelos experimentales siguen siendo muy útil en investigación básica. Las condiciones experimentales que se pueden tener en un modelo animal son las más completas para el estudio de cualquier sistema biológico. El modelo experimental empleado en este trabajo, cubrió los aspectos más importantes del inicio y desarrollo de la carcinogénesis. Es un excelente modelo para estudiar el proceso neoplásico hepático en sus diferentes etapas. No así, para tratar de analizar el proceso de invasión y metástasis.
- El apoyo que pudieran otorgar las pruebas de funcionamiento hepático en el diagnóstico del carcinoma hepatocelular en el modelo animal, no resulto tan valioso como en el caso de los pacientes.
- Uno de los resultados más importantes obtenidos en este trabajo y que da pie a continuar los estudios en este campo, es la probable participación del uPA en la carcinogénesis desde las etapas iniciales. Nuestros resultados muestran la probable participación del uPA en el inicio y desarrollo del proceso neoplásico y no únicamente como parte importante de la invasión y la metástasis.
- Se debe considerar seriamente el continuar investigando el papel del uPA en la carcinogénesis, ya que pudiera resultar una molécula muy importante en un ensayo diagnóstico o bien terapéutico. De acuerdo a nuestros resultados podemos esperar un papel más importante como marcador de agresividad tumoral para el uPA que para la cadherina-E, ya que el incremento en su expresión se ha detectado en procesos de replicación celular y degradación de la matriz extracelular, dos procesos básicos en el cáncer invasivo.

- La expresión de cadherina-E en células epiteliales cumple una función esencial en la orientación correcta de las células en el tejido y el mantenimiento de su arquitectura. Alteraciones en su expresión durante el desarrollo de neoplasias afectan enormemente estas funciones. Por lo que conservar su expresión debe de ser una prioridad, aún cuando el tejido se encuentre en un proceso neoplásico. Nuestros resultado apoyan esta idea, el no encontrar colonias metastásicas a pesar del avance tan generalizado de la neoplásia hepática, nos hace suponer que la expresión y probablemente también la función de la cadherina-E se mantiene en condiciones fisiológicas.
- La posibilidad de poder utilizar al uPA como un marcador pronóstico existe. Es necesario elucidar la cinética de expresión en condiciones fisiológicas y patológicas dependiendo del órgano al que se desee aplicar.

## BIBLIOGRAFIA :

- 1 Guidotti G., Loreti L., Ciaranfi E., 1965. Studies on the activity of aliphatic aldehydes. The mechanism of inhibition of amino acid incorporation into protein of Yoshida ascites hepatoma cells. *Eur J Cancer*, 1: 23-32.
- 2 Guyton , 1980. Hígado y sistema biliar. Tratado de Fisiología Médica. 5ta edición. Ed Iberoamericana.
- 3 Bioulac-Sage P., Le Bail B., Balabaud C., 1994. Structure of the liver. *Textbook of Clinical Hepatology*. Ed McIntrye N., Benhamou J., Bircher J., Rizzetto M., Rodes J Oxford University Press. New York. vol 1 160-175.
- 4 Crawford J., 1993. The liver and the biliary tract. *Diseases of the liver*. Ed Schiff L. Schiff E. J.B. Lippincott Company. Philadelphia vol. 1, 831-896.
- 5 Millward-Sadler N., Jezequel A., 1985. Normal histology and ultraestructure. *Liver and Biliary Disease* Ed. Bailliere Tindall W.B. Saunders Company. Eastbourne, England. vol VIII, 68-80.
- 6 Rappaport A., Wanles I., 1993. Physioanatomic Considerations. *Diseases of the liver*. Ed. Schiff L., Schiff E.J.B. Lippincott Company. Philadelphia. vol 1, 215-230.
- 7 Millward-Sodler G., Jezequel A. 1986. Normal histology and ultrastructure. *Progress in liver diseases*. Ed Popper H., Schaffner F. Grune & Stratton Company. Eastbourne, England vol VIII, 13-44.
- 8 Goldfarb S., Pugh T., 1986. Multistage rodent hepatocarcinogenesis. *Progress in liver diseases*. Ed Popper H., Schaffner F. Grune & Stratton vol VIII 597-620.
- 9 Steyn M. and Purchase I., 1970. Symposium on Mycotoxin in human healt. Pretoria (Ed) Purchase I. London: Macmillan, 72-86.
- 10 Schonland M, Millward-Sadler G., Wrigth D., Wrigth R., 1986. Hepatic Tumours. *Progress in liver diseases*. Ed Popper H., Schaffner F. Grune & Stratton vol VIII, 1137-1184.
- 11 Farber E., 1982. Chemical carcinogenesis. *Am J Pathol.*, 106: 271-296.
- 12 Ding S., Aviv A., 1995. Loss of heterozygosity in liver tumors. *J Hepatol.*, 22: 230-238.
- 13 Tabor E., 1994. Tumor supresor genes, growth factor genes, and oncogenes in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Med Virol.*, 42: 357-365.

- 14 Kaplan M. 1993. *Laboratory Test. Diseases of the liver. Seventh edition.* Ed Schiff L, and Schiff E. Lippincott Company. Philadelphia.
- 15 Atterbury C. 1980. Pruebas de función hepática. Técnicas diagnósticas para el estudio de las enfermedades del hígado. Prensa Científica E: 781-793.
- 16 Berenblum J., Shubink P., 1947. The role of croton oil, application associated with a single painting of a carcinogen in tumor induction of the mouse's skin. *Br J Cancer*, 1: 379-382.
- 17 Farber E., 1968. On the concept of minimum deviation in the study of the biochemistry of cancer. *Cancer Res.*, 28:1210-1211.
- 18 Solt D., Cayama E., Tsuda H., Enomoto K., Lee G., and Farber E., 1983. Promotion of liver cancer development by brief exposure to dietary 2-acetylaminofluorene plus partial hepatectomy of carbon tetrachloride. *Cancer Res.*, 43: 188-191.
- 19 Solt D., Farber E., 1976. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*, 263: 701-703.
- 20 Solt D., Medline A., Farber E., 1977. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol*, 88: 595-618.
- 21 Lans M., Gerlache J., Taper H., Prèat V., Roberfroid M., 1983. Phenobarbital as a promotor in the initiation/selection process of experimental rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 4: 141-144.
- 22 Pitot H, 1993 The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72: 962-970.
- 23 Cairns J., 1986. El cáncer. El libro de investigación científica. Scientific American. Prensa Científica Ed Santos E., Rodríguez J. :12-25.
- 24 Tlsty T., 1998. Cell-adhesion-dependent influences on genomic instability and carcinogenesis. *Current Opin Cell Biol.*, 10: 647-653.
- 25 Hamaguchi M., Matsuyoshi N., Ohnishi Y., Gotoh B., Takeichi M., Nagai Y., 1993. p60 causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system. *EMBO J.*, 12. 307-314
- 26 Matsuyoshi N., Hamaguchi M., Taniguchi S., Nagafuchi A., Tsukitas S., Takeichi M., 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol.*, 118: 703-714.

- 27 Birchmeir W, Behrens J., 1994. Cadherin expression in carcinoma: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica Biophysica Acta*. 1198: 11-26.
- 28 Ruoslahti E. Giancotti I.,1989. Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells* 1:119-126.
- 29 Takada A., Ohmori K., Takahashi N., Tsuyuoka K., Yago A., Zenita K., 1991. Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem Biophys Res Commun.*,179: 713-719. -
- 30 Birch M., Mitchell S., Hart I., 1991. Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res.*, 51: 6660-6667.
- 31 Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K, Tamura S., 1991. Expression of immune-reactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol.*,139 : 17-23.
- 32 Yagi T., Takeichi M. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Gen Devel.*, 14: 1169-1180.
- 33 Shiozaki M., Oka H., Inove M., Tamura S., Monden S.,1996. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer*, 77: 1605-1613.
- 34 Kemler R. 1993. From cadherin to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trend Genet.*, 5: 317-321.
- 35 Edelman G., Murria B., Mege R., Cunningham B., Gallin W., 1987. Cellular expression of liver and neural cell adhesion molecules after transfection with their cDNAs results in specific cell-cell binding. *Proc Natl Acad Sci.*, 84: 8502-8506.
- 36 Kemler R., 1992. Classical cadherins. *Sem Cell Biol.*, 3:149-155.
- 37 Ozawa M., Kemler R., 1992. Molecular organization of the ovomorulin-catenin complex. *J Cell Biol* , 116: 989-996.
- 38 Klymkowsky M., Parr B., 1995. The body language of cells. The intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell*, 83: 5-8.
- 39 Gumbiner B., McCrea P., 1993. Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci.*, 17. 155-158.
- 40 Nagafuchi A., Shirayoshi Y., Okazaki K, Yasuda K., Takeichi M., 1987. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, 329: 341-343

- 41 Bussemaker M., van Bokhoven A., Mess S., Kemler R., Schalken J., 1993. Molecular cloning and characterization of the human E-cadherin cDNA. *Mol Biol Rep.*, 17:123-28.
- 42 Takeichi M., 1991. Cadherin cell adhesion receptor as a morphogenetic regulator. *Science*, 251: 1451-1455.
- 43 Ozawa M., Baribault H., Kemler R., 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.*, 8: 1711-1717.
- 44 Berx G., Staes K., van Hengel J., 1995. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics*, 26: 281-289.
- 45 Mansori A., Spurr N., Goodfellow P., Kemler R., 1988. Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation*, 38: 67-71.
- 46 Scherer G., Baush E., Gaa A., van Deimling O. 1989. Gene mapping on mouse chromosome 8 by interspecific crosses: new data on a linkage group conserved on human chromosome 16q. *Genomics*, 5: 275-278.
- 47 Man Y., Hart Y., Ring C., Sanjar S., West M., 2000. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 23: 610-617.
- 48 Acs G., Lowton T., Rebbeck T., LiVolsi V., Zhang P., 2001. Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *Am J Clin Pathol.*, 115: 85-98.
- 49 Bongiorno P., Kossopoulos M., Lee S., Rachwal W., Moore J., Whyte R., Orringer M., Beer D., 1995. E-cadherin expression in primary and metastatic thoracic neoplasms and Barrett's oesophagus. *Br J Cancer*, 71: 166-172.
- 50 Shimoyama Y., Hirohashi J., 1999. Expression of E-cadherin and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res.*, 51: 2185- 2192.
- 51 Heimann R., Lan T., Rebbeck T., LiVolsi V., Zhang P., 2000. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* , 60: 298-304.
- 52 Mareel M., Vleminck K., Vermeulen S., Bracke M., Van-Ray F., 1992. E-cadherin expression: a counterbalance for cancer cell invasion. *Bull Cancer Paris* , 79: 347-355

- 53 Frixen U., Bahrens J., Sachs M., Eberle G., Voss B., Warda A., Lochner D., Birchmeier W., 1991. E-cadherin –mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol.*, 113: 173-185.
- 54 Katayama M., Hirar S., Kamihagi K., Nakagawa K., Yasumotp M., Kalo I., 1994. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* , 69: 580-585.
- 55 Takeichi M., 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin in Cell Biol.*, 5: 800-811.
- 56 Behrens J., Vakaet L., Friis R., Winterhager E., Van Roy F., Mareel M., Birdhmeier W., 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol.*, 120: 757-766.
- 57 Tsuda H., Zhang W., Shimosato Y., Yokota J, Terada M., Sugimura T, 1990. Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.*, 87: 6791-6794.
- 58 Natl E., Magenis RE, Zimmer J, Mansouri A, Scherer G. 1989. Regional assignment of the human loci for ovomorulin (UVO) and chymotrypsinogen B (CTRB) with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosoma 16. *Cytogenet Cell Genet.*, 50: 145-148.
- 59 Garcia S., Martini F., Micco C., Andrac L., Sappa P., Hardwigsen J., Lavaut M., Treut Y. and Charpin C., 1998. Prognostic value of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma. *Ann Pathol.*, 18: 98-102.
- 60 Frixen U. and Nagamine Y. 1993. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion. *Cancer Res.*, 53: 3618-3623
- 61 Chen W., 1992. Membrane proteases: role in tissue remodeling and tumor invasion. *Curr Opin Cell Biol.*, 4: 802-809.
- 62 Duffy MJ., 1990. Plasminogen activator and cancer. *Blood Coag and Fibry.*, 1: 681-686
- 63 Kim S., Liotta L., Kohn C., 1993. Cancer invasion and metastasis. *Physiol Med.*, 45: 92-96
- 64 Sier C, Sidenius N, Mariani A, Aletti G, Agape V, Ferrari A, Casetta G, Stephens RW, Brunner N, Blasi F., 1999. Presence of urokinase type plasminogen activator receptor in urine of cancer patients and its possible clinical relevance. *Lab Invest* , 79: 717-22



- 65 Dublin E., Hanby A., Patel N., Liebman R., Barnes D., 2000 Immunohistochemical expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in breast carcinoma: fibroblastic expression has strong associations with tumor pathology. *Am J Pathol.*, 157: 1219-27.
- 66 Andreasen P., Egelund R., Petersen H., 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol Life Sci.*, 57: 25-40.
- 67 Noack F., Schmitt M., Bauer J., Helmecke D., Kruger W., Thorban S., Sandherr M., Kuhn W., Graeff H., Harbeck N., 2000 A new approach to phenotyping disseminated tumor cells: methodological advances and clinical implications. *Int J Biol Markers*, 15: 100-104.
- 68 Stolz D., Mars W., Petersen B., Kim T., Michalopoulos G., 1999. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.*, 59: 3954-3960.
- 69 Kim T., Mars W., Stolz D., Petersen B., Michalopoulos G., 1997. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology*, 26: 896-904.
- 70 Botteri F., Ballmer-Hofer K., Rajput B., and Nagamine Y. 1990. Disruption of cytoskeletal structures results in the induction of the urokinase-type plasminogen activator gene expression. *J Biol. Chem.*, 265: 13327-13334.
- 71 Jansen P., Wheelock M., 1992. Regulation of urokinase plasminogen activator localization in keratinocytes by calcium ion and E-cadherin. *Exp. Cell Res.*, 202: 190-198.
- 72 Pariza M., 1997. Animal studies: summary, gap, and future reseca. *Am J Clin Nutr.*, 66. 1539S-1540S.
- 73 Peraino C., Fry R., Staffeldt E., 1971. Reduction and enhancement by Phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.*, 31: 1506-1512.
- 74 Witte H., Pitot H., Brunner N., Grondahl-Hansen J., Hoyler-Hansen G., Behrendt N., Guldhammer-Skov B., Sweep F., Benraad T., Dano K., 1997. ELISA for complexes between urokinase-type plasminogen activator and its receptor in lung cancer tissue extracts. *Int J Cancer*, 72: 416-423.
- 75 Farber E., Parker S., Gruenstein M., 1976. The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodule, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens. *Cancer Res.*, 36: 3879-3887

- 76 Zhao M., Zimmermann. ,1998. A Liver cell dysplasia: reactivities for c-met protein, Rb protein, E-cadherin and transforming growth factor-beta 1 in comparison with hepatocellular carcinoma. *Histol Histopatho.*, 13: 657-670.
- 77 Endo K., Ueyama J., Ohta T., Terada T., 2000. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenina, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters and patients survival. *Human Pathol.*, 31: 558-565.
- 78 Zheng Q., Tang Z., Wu Z., Chung Hua Chung Lin Tsa Chich., 1998. Urokinase-type plasminogen activator (uPA), uPA receptor (uPA-R) and inhibitors (PAI-1) expression in hepatocellular carcinoma in relation to cancer invasion/metastasis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci.*, 20: 57-59.
- 79 De Petro G., Tavian D., Copeta A., Portolani N., Giulini S., and Barlati S., 1998. Expresión of urokinase type plasminogen activator (uPA), u-PA receptor, and tissue-type plasminogen activator messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 58: 2234-2239.
- 80 Huber K., Kirchheimer C., Ermler D., Bell C., Binder B., 1992. Determination of plasma urokinase type-plasminogen activator antigen in patients with primary cancer liver cancer: characterization as tumor associated antigen and comparison with a-feto protein. *Cancer Res.*, 52: 1717-1720.
- 81 Unkeless, J.C., DanØ, G., Kellerman, Reich, E., 1974. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. Partial purification and characterization of the cell factor, a plasminogen activator. *J Biol Chem.*, 249: 4295-4305.
- 82 McCarty, K.S., Barton, T.K., Fetter, B.F., Creaseman W.T., McCarty, K S. 1985. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 109. 716-721.
- 83 Costantini, V., Sidoni, A., Deveglio, R, Cazzato, O., Bellezza, G., Ferri, I., Buciarelli, E., Nenci, G., 1996. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression. *Cancer*, 77: 1079-1088.
- 84 Chomczynsky P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15: 532-536.
- 85 Graeme A., Macdonald M., 1997. Hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Gastroen.*, 13: 257-262.
- 86 Wanless I., et al International Working Party. 1995. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology*, 22: 983-993.

- 87 Isogai M., Oishi K., Shimokawa N. Yamaguchi M., 1994. Expression of hepatic calcium-binding protein regucalcin mRNA is decreased by Phenobarbital administration in rats. *141:15-19*
- 88 Becker F., Sell S., 1979. Differences in serum a-fetoprotein concentrations during the carcinogenic sequences resulting from exposure to diethylnitrosamine or acetylaminofluorene. *Cancer Res., 39: 1437-1442.*
- 89 Ho Y J., 1994 N-nitroso-2-acetylaminofluorene: a direct-acting carcinogen inducing hepatocellular carcinoma in Sprague-Dawley rats. *Jpn J Cancer Res., 85: 794-800.*
- 90 Perrone MC., Serra D., D'Agostini F., Cesarone CF., 1991. Evaluation of blood chemistry parameters of rats treated with 2-acetylaminofluorene and N-acetylcysteine. *Cancer Res., 67: 875-879.*
- 91 Schiff L., Schiff E., Lippincott, 1993. *Laboratory Test Company Diseases of the liver.* Philadelphia. Kaplan. 60-75.
- 92 Chu C. 2000. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol., 15: E-25-30.*
- 93 Verma N, Haidukewych D., 1994. Differential but infrequent alterations of hepatic enzyme levels and thyroid hormone levels by anticonvulsant drugs. *Arch. Neurol., 51: 381-384.*
- 94 Anjum F., Shakoori AR., 1994. Sublethal effects of inorganic mercury on the body growth rate and liver function enzymes of phenobarbitone pretreated and promethazine-pretreated rabbits. *J Environ Pathol Toxicol Oncol., 13: 125-132*
- 95 Hirayanagi N., Fujii E., Teshirogi T., 1991. the significance of serum gamma-glutamyl transpeptidase(gamma-GTP) elevation caused by antiepileptic drug(s). Using the antipyrine metabolic capacity as a parameter of microsomal enzyme activity. *Liver, 58: 547-560.*
- 96 Kodavanti P., Kodavanti U., Faroon O., 1992. Mehendale H. Pivotal role of hepatocellular regeneration in the ultimate hepatotoxicity of CCl<sub>4</sub> in chlordecone-, mirex-, or phenobarbital-pretreated rats. *Toxicol Pathol., 20: 556-569.*
- 97 Stal P , Olsson J., Svoboda P , Hulcrantz R., Harms-Ringdahl M., Eriksson L., 1997. Studies on genotoxic effects of iron overload and alcohol in an animal model of hepatocarcinogenesis. *J Hepatol., 27: 562-571*

- 98 Hultcrantz R., Eriksson L., 1989. The source of serum alkaline phosphatase in liver-tumour-bearing rats. *Liver*, 9: 216-222.
- 99 Foster S., Church D., Watson A., 2000. Effects of phenobarbitone on serum biochemical test in dogs, *Aust Vet J.*, 78: 23-26.
- 100 Dumler I., Stepanova V., Jerke U., Mayboroda O., Vogel F., Bouvert P., Tkachuk V., Haller H., Gulba D., 1999. Urokinase-induced mitogenesis is mediated by casein kinase 2 and nucleolin. *Curr Biol.*, 9: 1468-1476.
- 101 Kawasaki, K., Hayashi, Y., Wang, Y., Suzuki, S., Morita, Y., Nakamura, T., Narita, K., Doe, W., Itoh, H., Kuroda, Y., 1998. Expression of urokinase type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitor-1 in gastric cancer. *J Gastroenterol. Hepatol.*, 13: 936-944.
- 102 Morita Y, Hayashi Y, Wang Y, Kanamaru T, Suzuki S, Kawasaki K, Ohta K, Yamamoto M, Saitoh Y, Itoh H, Doe W., 1997. Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 25: 856-61
- 103 Dubuisson L., Monvoisin A., Nielsen B., Le Bail B., Bioulac-Sage P., Rosenbaum J., 2000. Expresión and cellular localization of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol.*, 190: 190-195.
- 104 Monvoisin A, Neaud V, De Ledinghen V, Dubuisson L, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmouliere A, Rosenbaum J., 1999. Direct evidence that hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells is mediated by urokinase. *J Hepatol.*, 30: 511-518.
- 105 Tavian D, Petro G, Benetti A, Portolani N, Giulini S, Barlati S., 2000. uPA and c-MET mRNA expression is co-ordinately enhanced while hepatocyte growth factor mRNA is down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 87: 644-649.
- 106 Kamiyama T., Une Y., Uchino J., Hamda J., 1998. Hepatocyte growth factor enhances the invasion activity of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol.*, 12. 655-659.
- 107 Zhou L, Hayashi Y, Itob T, Wang W, Rui J, Itoh H., 2000. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int.*, 50: 392-397.
- 108 Itoh T, Hayashi Y, Kanamaru T, Morita Y, Suzuki S, Wang W, Zhou L, Rui J, Yamamoto M, Kuroda Y, Itoh H., 2000. Clinical significance of urokinase-type

- plasminogen activator activity in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.*, 15: 422-430.
- 109 Grimaldi G., Di Fiore P., Kajtaniak L., Falco J., Blasi F., 1986. Modulation of urokinase plasminogen activator gene expression during the transition from quiescent to proliferative state in normal mouse cells. *EMBO J.*, 5: 855-861.
- 110 Jensen P., Lavker R., 1999. Urokinase is a positive regulator of epidermal proliferation *in vivo*. *J Invest Dermatol.*, 112: 240-244.
- 111 Farinati F., Herszenyi L., Plabani M., Carraro P., De Paoli M., Cardin R., Roveroni G., Ruge M., Nitti D., Grigioni W., D'Errico A., Naccarato R., 1996. Increased levels of cathepsin B and L, urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type-1 as an early event in gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 17: 2581-2587.
- 112 Constantini V., Sidoni A., Devegilia R., Cazzato O., Belleza G., Ferrari I., Bucciarelli E., Nenci G., 1996. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression: an immunohistochemical comparison of normal, benign, and malignant breast tissues. *Cancer*, 77: 1079-1088
- 113 Bisgaard H., Santoni-Rugiu E., Nagy P., Thorgeirsson S., 1998. Modulation of the plasminogen activator/ plasmin system in rat liver regenerating by recruitment of oval cells. *Lab Invest.*, 78: 237-246.
- 114 Pedersen A., Christensen I., Stephens R., Briand P., Mouridsen H., Dano K., Brunner N., 2000. The complex between urokinase and its type-1 inhibitor in primary breast cancer : relation to survival. *Cancer Res.*, 60: 6927-6934.
- 115 Andreasen P., Kjoller L., Christensen I., Duffy M., 1997. the urokinase type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *Int J Cancer*, 72: 1-22
- 116 Nagy P., Bisgaard H., Santoni-Rugio E., Thorgeirsson S. 1996. In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene. *Hepatology*, 23: 71-79.
- 117 Pearl A., Wilgenbus P., Dahl U., Semb H., Christofori G., 1998. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 392: 190-193.
- 118 Yonemura Y., Nojima N., Kaji M., Fujimura T., Itoh H., Ninomiya I., Miyazaki I., Endo Y., Sasaki T., 1995. E-cadherin and urokinase-type plasminogen activator tissue status in gastric carcinoma. *Cancer*, 76: 941-953.

- 119 Seki S, Kitada T, Kawada N, Sakaguchi H, Kadoya H, Nakatani K, Satake K, Kuroki 1999. Establishment and characteristics of human hepatocellular carcinoma cells with metastatic to lymph nodes. *T. Hepatogastro.*, 46: 2812-2817.
- 120 Endo K., Ueda T., Ueyama J., Ohta T., Terada T., 2000. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma; relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients's survival. *Human Pathol.*, 31: 558-565.
- 121 Itoh H., Yonemura Y., Tsuchihara K., Kawamura T., Nojima N., Kaji M., Fushida S., Nishimura G., Fujimura T., Miwa K., 1995. Correlation between the expression of urokinase-type plasminogen activator, E-cadherin and malignancy in gastric cancer. *Gan to Kagaku Ryoho*, 2: 124-129.
- 122 Beavon I. 2000. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer*, 36: 1607-1620.
- 123 Paciucci R., Vila M., Adell T., Diaz V., Tora M., Nakamura T., Real F., 1998. Activation of urokinase plasminogen activator/urokinase plasminogen activator receptor system and redistribution of E-cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing Met. *Am J Pathol.*, 153: 201-212.
- 124 Sasaki C., Lin H., Passaniti A., 1999. Regulation of urokinase plasminogen activator (uPA) activity by E-cadherin and hormones in mammary epithelial cells *J Cell Physiol.*, 18: 1-13 .



## Expression of urokinase-type plasminogen activator in an experimental model of hepatocarcinoma

Alejandro Nieto-Rodríguez <sup>a,\*</sup>, R. Hernández-Pando <sup>b</sup>, D. Kershenobich <sup>a</sup>,  
L. Rodríguez-Fragoso <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,  
Vasco de Quiroga 15 Col. Sección XVI, Del Tlalpan CP 14000, Distrito Federal, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Patología Experimental, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán,  
Vasco de Quiroga 15 Col. Sección XVI, Del Tlalpan CP 14000, Distrito Federal, México

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av Universidad 1001, Edif C9, Cuernavaca 62210,  
Morelos, Mexico

Received 30 June 2000, accepted 31 October 2000

---

### Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant tumor of the liver. Molecular genetic analyses have clarified that accumulation of genome changes provides important steps in carcinogenesis. Urokinase type plasminogen activator (uPA) forms part of an important enzymatic system that degraded the extracellular matrix in process of invasion and metastasis. In order to study the kinetics of uPA cellular expression during this process, we used specific polyclonal antibodies against uPA in an immunohistochemistry assay in liver sections from a HCC in rats. The neoplastic transformation induced with this model was preceded by the appearance of numerous hyperplastic nodules during early stages, after time lesions progressed to well-differentiated HCC. The morphological changes of premalignant and malignant lesions were associated with a progressive increment of uPA expression, which reached its peak at 5 and 6 months after the administration of the carcinogenic drugs. Of the enzymatic markers analyzed, the gamma glutamyl transpeptidase showed correlation with the histological findings. Our results suggest that the increase in the uPA expression should not only be considered as the hallmark of metastasis, but may also be related to early events in the neoplastic transformation and with the proliferation of vessels and biliary ducts. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Hepatocarcinogenesis; Immunohistochemical; Urokinase type plasminogen activator

---

\* Corresponding author. Present address: Laboratorio de Cáncer Pulmonar, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Calzada de Tlalpan 4502, Col. Secc. XVI, Del Tlalpan, CP 14080, Mexico. Tel.: +52-11-5256668978, fax: +52-11-5256654623. E-mail address: alexn\_00@yahoo.com.mx (A. Nieto-Rodríguez).

## 1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) accounts for 80–90% of all the liver cancers and is more prevalent in parts of Africa and Asia than in North and South America and Europe. The cause of liver cancer is unknown, but contributing factors that include chronic liver disease, viral hepatitis, hemochromatosis, known liver (hepatic) carcinogens, and toxins (mycotoxins) have been found in parts of Africa and Asia (Petersen, et al. 1998).

Molecular genetic analyses have clarified that accumulation of genomic changes provides important steps in carcinogenesis and have identified a number of valuable genetic markers for certain cancers. To date, however, no prognostic markers have been identified for HCC (Itano, et al. 2000).

Urokinase type plasminogen activator (uPA) is involved in the proteolytic degradation of several components of the extracellular matrix under normal and pathological conditions, including the development of cancer. Different studies have reported high levels of metalloproteases and uPA in primary tumor tissue and/or metastasis (Markus, 1988; Jänicke et al., 1990; Schmitt et al., 1992). Moreover, recent studies suggest that uPA expression (RNA and protein) may be a useful prognostic factor in different types of cancer (Blasi et al., 1987; Cohen et al. 1991; Stahl and Mueller, 1994).

Several mechanisms have been proposed to explain the participation of uPA in cancer cell invasion and metastatic dissemination. However, direct tissue participation of uPA during the carcinogenesis process *in vivo* has not been completely studied. In fact, not only in carcinogenesis but also in fibrinolytic and tissue remodeling processes, the participation of uPA has been studied *in vitro* systems using cultured or transplanted cells. In general, these *in vitro* models do not reproduce the wide variations in the production of the plasminogen activator system components during the evolution of these complex events (Ossowski, 1988; Cohen et al., 1991; Casslen et al., 1991).

Over the last three decades, hundreds of chemicals have been shown to transform cells *in vitro* and to be carcinogenic in animals. Using this

knowledge, numerous experimental animal models of cancer induced by chemical substances have been used to study the role of normal regulatory genes that are the principal target of genetic damage (e.g. growth-promoting proto-oncogenes and growth-inhibiting cancer suppressor genes), or to evaluate the pharmacological effects of new anti-tumoral drugs. Interestingly, they have not been used to analyze the activity and expression of the different components of the plasminogen activator system during the carcinogenesis process. In this study, we used the well-characterized *in vivo* cancer model developed by Solt and Farber (resistant hepatocyte model) (Solt et al., 1976) to analyze the uPA expression during the HCC induced in rats. A relationship between the histopathological findings and several biochemical parameters of liver function were done.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental model of hepatocarcinoma

A total of 396 male Wistar rats weighing 120–150 g were fed a standard basal diet (24% protein) and exposed to a daily cycle of alternating 12-h light periods during the 12 months of the experimental model. The animals were housed in a temperature and humidity controlled environment and given food and water *ad libitum*. A local animal experimental ethical procedures committee approved all the experimental procedures.

The rats were split into five groups. First, the named treated animals, were submitted to the selection procedure described by Solt and Farber (Solt et al., 1976) slightly modified by Lans (Lans et al., 1983). Briefly, 220 animals received a single intraperitoneal dose of diethylnitrosamine (DEN) (200 mg/kg) dissolved in saline solution. After 2 weeks, rats were fed a basal diet containing 0.02% acetylaminofluorene (2-AAF) for 2 weeks (weeks 3 and 4). At the end of the 3rd week, animals received a necrogenic *i.g.* dose of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) (2 ml/kg) diluted (v/v) in corn oil. After the 4th week, the animals received phenobarbital (PB) (0.05%) in drinking water until they were sacrificed.



A second group of 110 animals do not receive any treatment, only PB. Finally, the three remaining group of 22 animals each were used as control. One group received only DEN and 2-AAF. Another group was treated with 2-AAF and CCl<sub>4</sub>. The last group received all the drugs except 2-AAF.

The five animal groups, besides receiving the described treatment previously, received water with PB (0.05%) until the day of their sacrifice. Every 15 days for 1 year, groups of ten treated and five control animals anesthetized with diethyl ether were sacrificed by exsanguination, cutting the hepatic vein. After sacrifice, a complete post-mortem examination was performed. The liver was weighed and sliced, and several sections were fixed by immersion in alcohol and embedded in paraffin for histological and immunohistochemistry analysis. The same liver samples of the treated and control rats stained by hematoxylin and eosin were analyzed by immunohistochemistry. Other liver sections were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use. Blood samples were collected from each animal and the plasma was separated for biochemical studies related to hepatic function.

## 2.2. Production of uPA antiserum

The urokinase (UK) was inactivated with diisopropyl fluorophosphate (iPr2-F) (Sigma, St Louis, MO) as previously described (Unkeless et al., 1974). After the UK was mixed with complete Freund adjuvant, and injected subcutaneously to two rabbits, and polyclonal antibodies against uPA were produced. For this, two healthy New Zealand white rabbits were immunized with 400  $\mu\text{g}$  of urokinase (UK) (Sigma, St Louis, MO). Animals received a second subcutaneous injection a month later. Rabbits were bled in the 8th week after the first immunization, the sera were separated and the titer of the anti-UK antibodies was determined by ELISA. The specificity of the immunoreaction was confirmed because the immunoreactive bands in Western blot assay were neutralized with a 50-fold molar excess of corresponding antigen (data not shown).

## 2.3. Preparation of tissue for immunohistochemistry and morphometry

uPA was located in tissue sections by immunohistochemistry, using the polyclonal antibodies raised in rabbits. Sections of 5  $\mu\text{m}$  from the liver tissue fixed in ethanol and embedded in paraffin were used. After blocking the peroxidase endogenous activity with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absolute methanol for 25 min, the tissue was incubated with the polyclonal rabbit antibodies anti-uPA (1:5000 dilution) in 1% BSA-PBS for 60 min at 37°C. Bound antibodies were detected using an anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) incubated for 60 min at 37°C; 0.5 mg/ml 3-3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) was used as reactive color. Sections were counterstained with hematoxylin and mounted. Samples preincubated without immune mouse serum were used as negative controls.

For semiquantitative analysis of uPA immunostaining, three randomly chosen areas of the periportal area, interlobular zone and neoplastic nodules were evaluated. The immunostained cells were scored using the semiquantitative method described by McCarthy and Costantini (Lans et al., 1983; Costantini et al., 1996), in which the intensity and percentage of immunoreactive cells are evaluated. Briefly, the percentage of immunoreactive cells is classified in four different categories according to the staining intensity, these being considered as 0 (no staining), 1+ (weak staining, but detectable above control), 2+ (distinct), and 3+ (intense). For each slide, the score was given after multiplying the percentages of immunostained cells by the intensity of staining using the following formula.

$$\text{score} = \sum (i + 1) P_i$$

where  $i$  (intensity) = 1, 2, 3 and  $P_i$  is equivalent to percentage of cells staining positively.

The score calculated in this way correlates perfectly with a quantitative immunohistochemical score derived from a computer-assisted image analysis in the case of the evaluation of estrogen receptor in breast cancer (McCarty et al., 1985).

#### 2.4. Liver enzyme determination in serum as biochemical markers of liver function

The liver function was evaluated in six animals for each time interval with their respective controls (animals without treatment) by determining the total serum activity of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT). Total protein determination using an automated method in a Biochemical Coulter Analyzer was also included.

#### 2.5. Statistical analysis

Kruskal Wallis one way analysis of variance of ranks was used for the semiquantitative analysis of immunohistochemical results. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Hepatocarcinogenesis model

The schedule of drugs used in this experimental model induced a well differentiated HCC. During the entire process of carcinogenesis the treated

rats showed increase in the liver weight and a significant decrease in the body weight as compared with control rats (without any treatment), see Table 1. As is mentioned in Section 2 the experimental model remained for 12 months, time in which the maximal mortality in the animals was observed (nearly 40%).

#### 3.2. Liver histopathology of experimental hepatocarcinogenesis

The present studies, using the rat liver model of chemically induced carcinogenesis, focus on the basis of induction of neoplastic liver nodules. Neoplastic nodules distort the architecture of premalignant epithelial tissues in both humans and experimental animals, long before the appearance of cancer. In the experimental model, the rats sacrificed in the 2nd month exhibited multiple subcapsular liver lesions of at least 1 mm diameter which were randomly distributed. Table 2 summarizes the incidence of hepatocellular lesions and sizes in tumor-bearing rats.

Lesions were constituted by large hepatocytes with hyperchromatic nuclei and abundant acidophilic cytoplasm (Fig. 1A). Small patches of necrosis were also seen. After 4 months of treat-

Table 1  
Rat body weights, liver and mortality in the carcinogenesis model

Treatment (months)	Body weight (g) <sup>a</sup>		Liver weight (g) <sup>a</sup>		Mortality (died/total)	
	Treatment <sup>b</sup>	Control <sup>c</sup>	Treatment	Control	Treatment	Control
2	415 ± 57	319 ± 20	19 ± 1	14 ± 1	2/20	0/10
3	424 ± 30	512 ± 30	21 ± 2	13 ± 2	2/20	0/10
4	477 ± 31	526 ± 21	20 ± 3	13 ± 1	2/20	0/10
5	522 ± 57	530 ± 15	24 ± 5	17 ± 2	2/0	0/10
6	646 ± 55	580 ± 18	21 ± 2	18 ± 2	4/20	1/10
7	532 ± 49	550 ± 20	27 ± 6	18 ± 3	4/0	0/10
8	559 ± 52	610 ± 16	26 ± 3	19 ± 2	5/20	0/10
9	575 ± 38	630 ± 18	21 ± 4	20 ± 3	6/20	1/10
10	572 ± 59	620 ± 14	23 ± 3	21 ± 4	7/20	0/10
11	601 ± 74	600 ± 20	28 ± 4	22 ± 3	7/20	1/10
12	574 ± 57	635 ± 18	39 ± 10	24 ± 4	8/20	1/10

<sup>a</sup> Each value represents the mean ± S.D. of 20 treated and ten control animals, respectively.

<sup>b</sup> Treatment AAF+DEN+CCl<sub>4</sub>+PB. The carcinogenic drugs administration were given as was specified in Section 2.

<sup>c</sup> Control, animals without any treatment only PB.

Table 2  
Size and percentage of hepatic lesions in treated rats<sup>a</sup>

Treatment (months)	Liver lesions diameter (mm)	Animals with lesions	Type of lesions		
			FA <sup>b</sup>	NP <sup>c</sup>	HCC <sup>d</sup>
2	<1	6/18	6	2	0
	3	1/18	1	1	0
3	<1	7/18	6	4	0
	4–5	1/18	1	1	0
4	1–3	7/18	7	4	2
	4–5	5/18	4	2	2
	50	3/18	1	1	2
5	1–3	9/18	5	8	2
	4–5	5/18	3	3	3
6	1–3	3/16	2	3	2
	4–5	8/16	2	5	4
	20	3/16	1	1	2
7	50	1/16	0	0	1
	1–3	3/16	1	2	2
	20–40	4/16	1	2	2
8	4–5	3/15	0	2	3
	20–40	7/15	0	3	7
9	4–5	3/14	0	1	3
	20–40	6/14	1	2	6
	50	3/14	0	1	3
10	20–40	6/13	0	2	6
	50	6/13	1	3	6

<sup>a</sup> Treated rats = DEN + AAF + CCl<sub>4</sub> + PB.

<sup>b</sup> FA, Foci alteredated

<sup>c</sup> NP, Neoplastic nodule

<sup>d</sup> HCC, Hepatocellular carcinoma

ment larger hepatic nodules were formed; HCC was diagnosed and confirmed by microscopic analysis. These nodules were made up of evident neoplastic hepatocytes showing nuclear atypia and hyperchromasia, numerous enlarged and acidophilic nucleoli as well as atypical mitosis (Fig. 1B). After 5 months of treatment, many large nodules (1 cm or more) substituted the liver parenchyma. These nodules were formed by neoplastic hepatocytes and cysts with acidophilic colloidal material (Fig. 1C). Thick fibrous tissue septa surrounded the nodules. In this fibrous tissue, numerous blood vessels and biliary ducts were seen (arrow) (Fig. 1D). Interestingly, by the 8th month in some nodules or in the internodular parenchyma, the presence of extremely dilated telangiectatic blood vessels (peliosis hepatis) was a

common feature (Fig. 1E), in addition to large biliary duct structures (Fig. 1F). After 6 months of treatment, all these histopathological alterations progressively increased; thus, rats with 12 months of treatment showed huge coalescent tumors, which substituted almost all of the hepatic tissue. The control groups treated with DEN + AAF + PB, DEN + CCl<sub>4</sub> + PB and AAF + CCl<sub>4</sub> + PB, showed low mortality with similar macroscopic and microscopic lesions, but minor frequency and size of the tumors observed in the animals treated. No apparent gross metastasis was observed in any organ. The capsular surface of 20% of the treated rat's kidneys in the last 3 months of the model exhibited varying degrees of granularity with small, subcapsular cysts suggestive of varying degrees of advancement of chronic progressive nephrosis

### 3.3. uPA cellular kinetics and distribution determined by immunohistochemistry

In normal hepatic tissue, scarce uPA positive hepatocytes were located in the periportal and intralobular areas, 18 and 5%, respectively (Fig. 2A, 3). After 3 months of treatment, the number

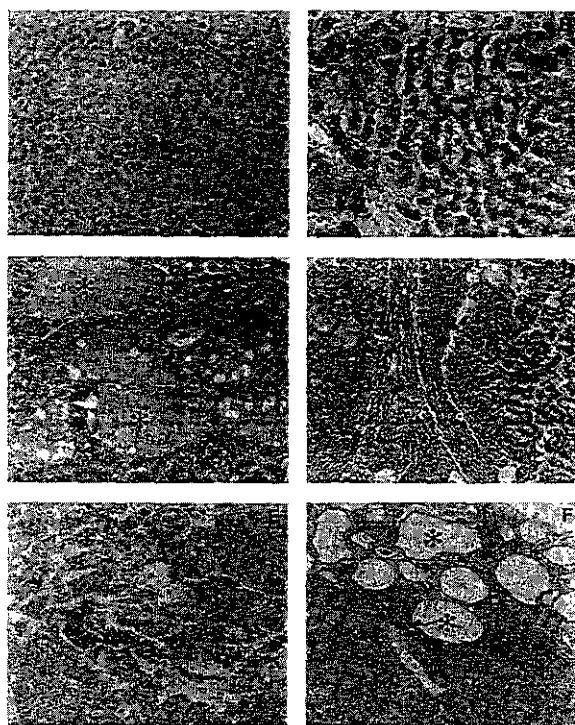


Fig. 1 Representative histopathological features of the liver during development of a hepatocarcinoma model. (A) After 2 months of carcinogenic drugs administration (DEN + AAF + CCl<sub>4</sub> + PB), many hyperplastic nodules made up of large hepatocytes with hyperchromatic nuclei were formed ( $\times 400$ ). (B) During month 3 and 4 of treatment, neoplastic nodules consisting of larger hepatocytes with frequent mitotic figures (arrow) were formed ( $\times 400$ ). (C) At month 5 after drug administration, several cystic structures with colloidal material (asterisks) were formed along with the neoplastic nodules ( $\times 400$ ). (D) At the same time interval, there were many neoformed biliary ducts in the collagen septa, which surround neoplastic nodules (arrows) ( $\times 200$ ). (E) After 6 months of treatment, there were many telangiectatic blood vessels (asterisks) in the neoplastic nodules ( $\times 200$ ). (F) At 1 year of treatment, the whole organ was replaced by neoplastic confluent nodules surrounded by wide fibrous septa with numerous neoformed biliary ducts (asterisks) ( $\times 200$ ). All samples were stained with hematoxylin and eosin.

of periportal and intralobular immunostained hepatocytes increased 25 and 100%, respectively. At this time, 25% of hepatocytes located in the hyperplastic nodules exhibited intense immunoreactivity (Fig. 2B, 3). After 4 months of treatment, when the hepatic nodules were constituted by malignant cells, their uPA immunostaining showed a striking heterogeneity. In fact, in some neoplastic nodules, almost all the cells showed strong immunoreactivity, while in others, a few neoplastic hepatocytes located in the periphery were positive (Fig. 2C), or immunostained cells were scattered throughout in the whole tumoral nodule (Fig. 2D). At 5 months of treatment, the uPA immunostained hepatocytes reached their maximal percentage in the neoplastic nodules (50%) and in the limiting plaque (65%) (Fig. 3), while in the interlobular areas the percentage of positive cells was constant during the entire period of treatment (10–20%). In advanced stages, from 6 to 12 months, the percentage of immunostained hepatocytes in the neoplastic nodules decreased by 30% (Fig. 3), but many neoplastic liver cells with strong uPA immunostaining were observed surrounding degenerative cysts (Fig. 2E) and neoformed biliary ducts (Fig. 2F).

### 3.4. Analysis of liver function by enzyme determination in sera

The serum activities of AST and ALP in treated animals were considerably increased from the 1st to the 4th month of treatment. At that time, the activity of AST decreased below the values observed in the control animals without treatment, while the ALP levels were similar to the control rats ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4A and D). The ALT activity was similar to that of control animals until the 5th month of treatment. Then, a pronounced activity decrease far below the control activity was observed (Fig. 4B). The enzyme, which showed the best correlation with the liver histopathological changes, was GGT. In fact, the increase in GGT activity began after 4 months of treatment, when the neoplastic nodules appeared. GGT activity progressively increased and reached its peak at 6–8 months of treatment, when numerous neoplastic nodules affected the liver with a  $P < 0.005$ ,

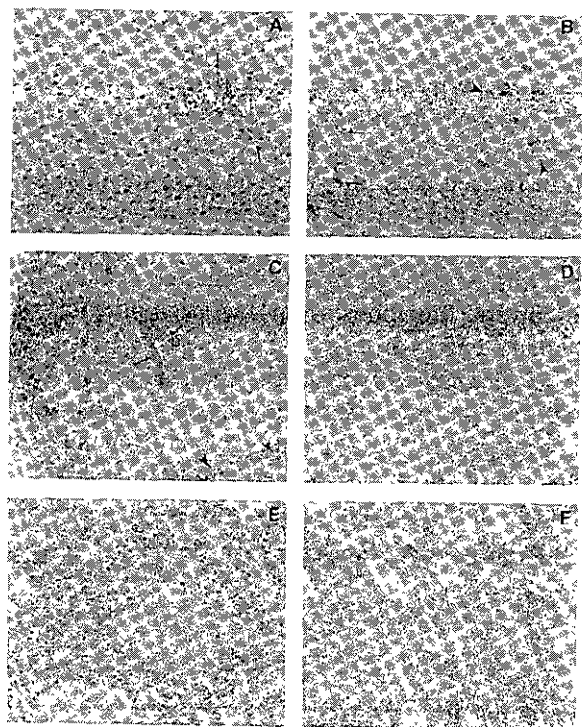


Fig. 2. uPA expression and localization during experimental hepatocarcinogenesis determined by immunohistochemistry. (A) In the liver from control animals, there were occasional and faint immunostained hepatocytes surrounding portal areas (arrows) and in the middle zone of hepatic lobules ( $\times 400$ ) (B) After 2 months of treatment there was an increase in the number and immunoreactivity of periportal (arrows) and intralobular (arrowheads) hepatocytes ( $\times 400$ ) (C) At 4 months of treatment, periportal hepatocytes were immunoreactive (arrows) and the neoplastic nodules showed striking immunostaining heterogeneity, some nodules exhibited strong and homogeneous immunoreactivity (black asterisk) and others showed mild immunostaining in some hepatocytes located in the periphery (white asterisk) ( $\times 400$ ) (D) At the same time interval there were tumoral nodules with many scattered immunostained cells ( $\times 400$ ) (E) After 6 months of carcinogenic treatment there were numerous immunostained neoplastic cells surrounding cysts (F) After 1 year of carcinogenic drug administration, there were many immunoreactive neoplastic hepatocytes near neofomed biliary ducts ( $\times 200$ ). Sections were counterstained with hematoxylin. Animals were treated as was specified in Section 2.

as compared with untreated group. After 8 months of treatment, the serum levels of GGT decreased and were accompanied by disease stabilization and longer survival. GGT was not de-

tected in sera of control animals (Fig. 4C). Total serum protein did not show any significant changes in either treated or untreated animals (data not shown).

#### 4. Discussion

HCC is regarded as an aggressive tumor with a poor prognosis (Haydon and Hayes, 1995; Okuda, 2000). More than 250 000 cases are diagnosed worldwide annually; of those, less than 3% will survive 5 or more years. The genetic basis of hepatocarcinogenesis is still poorly understood.

The use of experimental models in cancer has contributed substantially to the demonstration that during the carcinogenic process, there are fundamental changes in the genome, which produce many alterations in the cellular phenotype (Goldfarb and Pugh, 1986; Moore and Kitagawa, 1986). Alterations in tumor-associated extra-cellular matrix proteolysis are an important event in the mechanism of tumor invasion, dissemination, and metastasis. In this regard, the malignant potential of some solid tumors has been related to their ability to synthesize matrix-degrading proteolytic enzymes such as uPA. In fact, the relationships between plasminogen activators and tumor invasion and metastasis have been clearly demonstrated by several *in vitro* models (Kamiyama 1995; Kawasaki et al., 1998) as well as studies done with different human solid neoplasias (Danø et al., 1985; Janicke et al., 1990, 1993)

Recently the participation of uPA in the development and spread of tumors has been receiving considerable attention. Some studies have concluded that, in order to establish the potential pathogenetic role of uPA in cancer, it is necessary to define which components of the plasminogen system (e.g. relevant enzymes, cellular surface receptors, inhibitors, substrates, reaction products) exist in the tumor tissue *in vivo* as well as their precise cellular location. Recent immunohistochemical studies have shown different patterns of uPA distribution depending on the tumor type. Thus, uPA immunoreactivity has been demonstrated in colon adenocarcinoma cells and/or the surrounding connective tissue (Pyke et al. 1991;

Kawasaki et al., 1998). In gastric and breast cancer, there is strong uPA immunostaining at the invasive edge of the tumor, although other studies in colorectal carcinomas did not show any uPA expression difference in neoplastic cells located in the center or the periphery of the tumor (Tan et al., 1995; Costantini et al., 1996; Kawasaki et al., 1998). In the present study, we initially observed that hepatocytes located in the center of preneoplastic nodules and those located in the limiting plaque displayed intense immunoreactivity. After 3 months, this immunostaining pattern remained, but with stronger immunostaining in evident neoplastic hepatocytes. However, the heterogeneity of uPA immunostaining in preneoplastic and neoplastic nodules was striking, even in the 5th month when the uPA expression was maximal.

This finding may be due to the differences in cell populations present in the nodules (e.g. normal cells, hyperplastic cells, and neoplastic invasive cells), suggesting that the level of uPA expression depends on the type of host cells with which the transformed cells interact. The fact that uPA levels in the tumor were significantly elevated in the establishment of neoplastic nodules at 4–5 months, suggests that the enzyme may participate in diverse functions from the beginning of the carcinogenetic process.

Preferential uPA expression in periportal space along with the first preneoplastic lesions is in accordance with Rappaport's concept of the liver acinus. In this concept, the periportal zone is the most highly oxygenated area with the highest level of nutrients due to its closeness to the portal vein

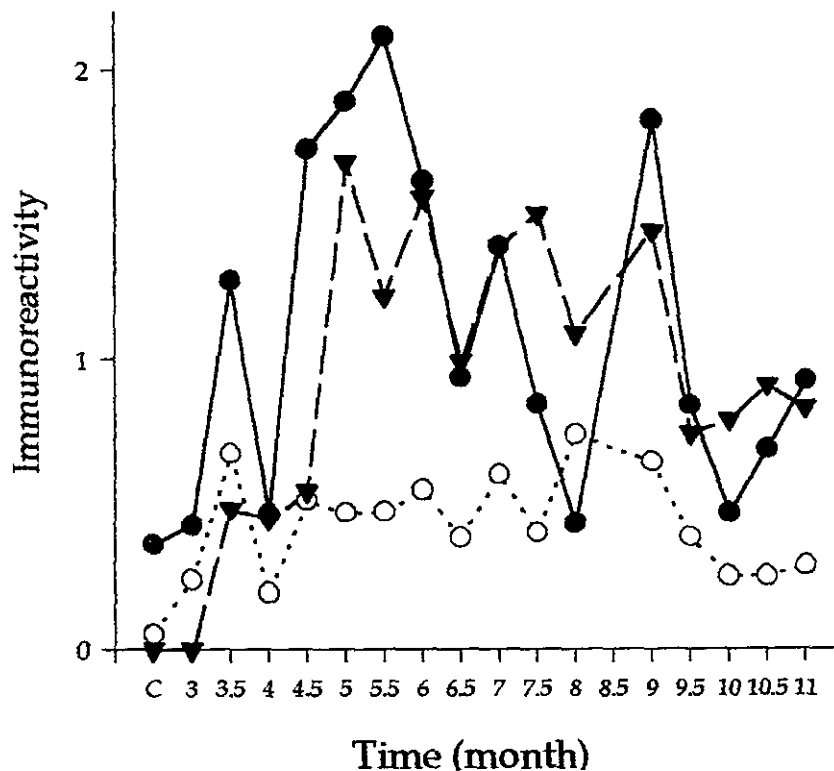


Fig. 3 Analysis of cellular kinetics and distribution of uPA in the hepatocarcinoma model. Immunostained cells present in the tumoral nodules (black triangles), periportal zones (black circles) and intralobular areas (white circles) were analyzed. Groups of six rats were analyzed at different time intervals after the administration of the carcinogenic drugs. The liver slides were processed for immunohistochemistry-uPA and the score was determined by multiplying the percentage of immunostained cells by the intensity of staining as is described in the Section 2. Where C are rats without any only PB in drinking water.

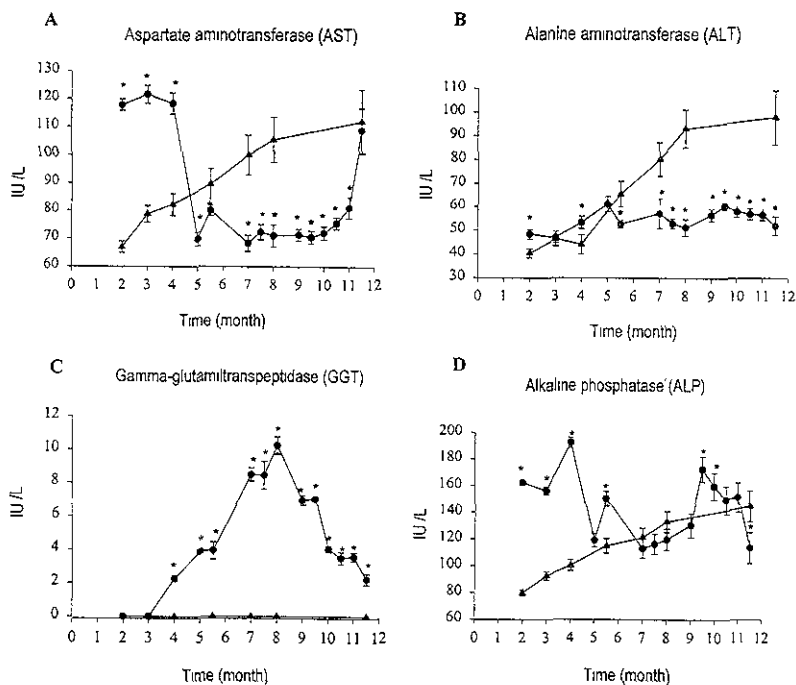


Fig. 4. Analysis of liver function. Plasma enzyme levels in treated animals (DN + AAF +  $\text{CCl}_4$  + PB) (circles) and rats without any treatment (only PB in drinking water) (triangles) of (A) Aspartate aminotransferase (AST), (B) Alanine aminotransferase (ALT), (C) Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) and (D) Alkaline phosphatase (ALP). The enzymatic activities were determined by a Biochemical Coulter Analysis. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. in experiments performed in quadruplicate. \* Means different from the control group ( $P < 0.05$ ).

and hepatic artery branches. However, this is also the zone most exposed to toxic substances (Rapaport and Wanless 1993). Interestingly, it is also in the periportal area that stem liver cells have been located (Daveba and Shafritz, 1993). It seems that stem or oval cells are the normal cellular precursors of hepatocytes and bile duct cells (Pyke et al., 1991). They are extensively activated in liver regeneration and apparently in neoplastic transformation in experimental models of chemical carcinogenesis (Solt et al., 1976; Gerber et al., 1982), so these periportal uPA immunostained hepatocytes may be stimulated or transformed oval cells.

The presence of sinusoidal dilation (peliosis) was a histopathological finding that has not been reported previously in other studies using this model of hepatocarcinogenesis. Normally the liver parenchyma is supported by connective tissue fibers that are in continuity with the surface cap-

sule. These fibers are important to prevent tears in the blood vessels and sinusoidal walls. Its focal dissolution by proteases may be the cause of the blood-filled cysts or peliosis. In support of this idea, is the fact that we found peliosis when the maximal expression of uPA was observed. Thus, it is possible that the high uPA concentrations in the neoplastic nodules produced proteolysis of connective tissue fiber, inducing tears of blood vessels and sinusoidal walls.

In most patients with hepatocarcinoma, the hepatic biochemical tests changes are nonspecific and indistinguishable from those found in patients with other liver diseases (Graeme and Macdonald, 1997; Michael, 1996; Neal, 1997). Thus, these biochemical tests are of little value in the diagnosis and prognosis of cancer. We determined different liver enzymes in sera during the carcinogenesis process in order to correlate with the histopathological changes. It was evident that AST and ALP

showed two peaks, at the beginning and at the end of the carcinogenetic process, which could be related to the formation of preneoplastic nodules and a complete malignant transformation, respectively. In regard to this, it has been indicated that significantly increased concentrations of ALP and AST in serum are suggestive of a primary tumor or infiltrative lesion. Furthermore, it has been observed that a sudden increase in the ALP serum concentration suggests malignant disease (Sherlock, 1981).

The GGT increase observed throughout the carcinogenetic process is related to the serum levels of this enzyme, which are usually high in patients with hepatic disease, including malignant lesions (Whitfield et al., 1972; Castaldo et al., 1996). For the last 20 years, studies in rat and mouse liver cancer have considered GGT as a preneoplastic and neoplastic marker. We observed that GGT increased when the preneoplastic nodule formation started, and reached its peak when the neoplastic nodules were more abundant. Actually, it has been proposed that GGT may provide a metabolic advantage for some tumors, particularly those of the liver, because GGT provides high levels of intracellular glutathione, an important cell growth factor (Hochwald et al., 1996; Hanigan, 1998). In conclusion, our results show a correlation between the disruption of blood vessels and sinusoidal walls in the liver and an increase of uPA, which may have a fundamental role in the invasive potential of neoplastic cells and probably also can be related to early events in the neoplastic transformation. Further studies are necessary in order to elucidate the role of uPA in the early stage of carcinogenesis in other neoplasias besides liver.

### Acknowledgements

Authors thank Dr. Octavio Villanueva for his technical support in the animal care and Dolores Aguilar for the statistical analysis. A. Nieto had a Ph.D. scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

### References

- Blasi, F., Vassalli, J.D., DanØ, K., 1987. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor and inhibitor. *J. Cell Biol.* 104, 801–804.
- Casslen, B., Gussstausson, B., Asted, B., 1991. Cell membrane receptors for urokinase plasminogen activator are increased in malignant ovarian tumors. *Eur. J. Cancer* 27, 1445–1448.
- Castaldo, G., Oriani, G., Lofrano, M., Cimino, L., Topa, M., Budillon, G., Salvatore, F., Sacchetti, L., 1996. Differential diagnosis between hepatocellular carcinoma and cirrhosis through a discriminant function based on results for serum analytes. *Clin. Chem.* 42, 1263–1269.
- Cohen, R.L., Xi, X.P., Crowley, C.W., Lucas, B.K., Levinson, A.D., Shuman, M.A., 1991. Effects of urokinase receptor occupancy on plasmin generation and proteolysis of basement membrane by human tumor cells. *Blood* 78, 479–487.
- Costantini, V., Sidoni, A., Devegilia, R., Cazzato, O., Bellezza, G., Ferri, I., Buciarelli, E., Nenci, G., 1996. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression. *Cancer* 77, 1079–1088.
- DanØ, K., Andreassen, P.A., GrØndehl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L., Skriver, L., 1985. Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv. Cancer Res.* 44, 139–266.
- Daveba, M.D., Shafritz, D.A., 1993. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in D-galactosamine model of liver regeneration. *Am. J. Pathol.* 143, 1606–1620.
- Gerber, M.A., Thung, S.N., Shen, S., Stromeyer, F.W., Ishak, K.G., 1982. Phenotypic characterization of hepatic proliferation. Antigenic expression by proliferating epithelial cells in fetal liver, massive hepatic necrosis, and nodular transformation of the liver. *Am. J. Pathol.* 110, 70–74.
- Goldfarb, S., Pugh, T.D., 1986. Multistage rodent hepatocarcinogenesis. In: Grune, Stratton (Eds.) *Progress in Liver Diseases*, Vol. VIII. Grune & Stratton, Inc. New York, pp. 597–620.
- Graeme, A., Macdonald, D.D., 1997. Hepatocellular carcinoma. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 13, 257–262.
- Hanigan, M.H., 1998. Gamma-glutamyl transpeptidase, a glutathione: its expression and function in carcinogenesis. *Chem. Biol. Interact.* 111–112, 333–342.
- Haydon, G.H., Hayes, P.C., 1995. Hepatocellular carcinoma. *Br. J. Hosp. Med.* 53, 74–80.
- Hochwald, S.N., Harrison, L.E., Rose, D.M., Anderson, M., Burt, M.E., 1996. Gamma-glutamyl transpeptidase mediation of tumor glutathione utilization in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 193–197.
- Itano, O., Ueda, M., Kikuchi, K., Shimazu, M., Kitagawa, Y., Aura, K., Kitajima, M., 2000. A new predictive factor for hepatocellular carcinoma based on two-dimensional electrophoresis of genomic DNA. *Oncogene* 19, 676–683.



- Janicke, F., Schmitt, M., Hafter, R., 1990. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 4, 69–78.
- Janicke, F., Schmitt, M., Pache, L., 1993. Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 24, 195–208.
- Kamiyama, T., 1995. A role of urokinase type plasminogen activator (uPA) in invasion and growth of hepatocellular cancer cells in vitro. *Acta Hepatol J* 147, 688–698.
- Kawasaki, K., Hayashi, Y., Wang, Y., Suzuki, S., Morita, Y., Nakamura, T., Narita, K., Doe, W., Itoh, H., Kuroda, Y., 1998. Expression of urokinase type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitor-1 in gastric cancer. *J Gastroenterol. Hepatol.* 13, 936–944.
- Lans, M., de Gerlache, J., Taper, H., Pr at, V., Roberfroid, M., 1983. Phenobarbital as a promoter in the initiation/selection process of experimental rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 4, 141–144.
- Maikus, G., 1988. The relevance of plasminogen activator to neoplastic growth—a review of recent literature. *Enzyme* 40, 158–172.
- McCarty, K.S., Barton, T.K., Fetter, B.F., Creaseman, W.T., McCarty, K.S., 1985. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 109, 716–721.
- Michael, C.K., 1996. Cancer of the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 12, 284–289.
- Moore, M.A., Kitagawa, T., 1986. Hepatocarcinogenesis in the rat: the effect of promoters and carcinogens in vivo and in vitro. *Int Rev Cytol* 101, 125–173.
- Neal, R., 1997. Cancers of the gastrointestinal tract. In: DeVita, V.T., Hellman, V., Rosenberg, S.A. (Eds.), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 971–980.
- Okuda, K., 2000. Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 32, 225–237.
- Ossowski, L., 1988. In vivo invasion of modified chorioallantoic membrane by tumor cells: the role of cell surface bound urokinase. *J Cell Biol.* 107, 2437–2445.
- Petersen, J., Dandri, M., Gupta, S., Rogler, E., 1998. Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepatitis virus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 6, 310–315.
- Pyke, C., Kristensen, P., Ralfk er, E., Gr ndahl-Hansen, J., Eriksen, J., Blasi, F., Dano, K., 1991. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am. J. Pathol.* 138, 1059–1067.
- Rappaport, A.M., Wanless, I.R., 1993. Physioanatomic considerations. In: Leon, S., Eugene, R.S. (Eds.), *Disease of the Liver*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 1–41.
- Schmitt, M., J nicke, F., Graeff, H., 1992. Tumor-associated proteases. *Fibrinolysis* 6, 3–26.
- Sherlock, S., 1981. *Biochemical Assessment of Liver Function Disease of the Liver and Biliary System*, sixth edn. Blackwell Scientific Publications, London, pp. 14–27.
- Solt, D., Farber, E., 1976. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 263, 701–703.
- Stahl, A., Mueller, B.M., 1994. Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* 54, 3066–3071.
- Tan, K., Powe, D.G., Gray, T., Turner, D.R., Hewitt, R.E., 1995. Regional variations of urokinase type plasminogen activator in human colorectal cancer: a quantitative study by image analysis. *Int. J. Cancer* 60, 308–314.
- Unkeless, J.C., Dano, K., Kellerman, G., Reich, E., 1974. Fibrinolysis associated with oncogenic transformation: Partial purification and characterization of the cell factor: a plasminogen activator. *J Biol. Chem.* 249, 4295–4305.
- Whitfield, J.B., Pounder, R.E., Neale, G., Moss, D., 1972. Serum gammaglutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gut* 13, 702–708.