

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE UNA DIETA  
HIPERCOLESTEROLÉMICA EN LA PROGRESIÓN DE CÁNCER  
HEPÁTICO INDUCIDO POR UN HEPATOCARCINÓGENO QUÍMICO

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

BIOL. EXP. MARCELA DOMÍNGUEZ MERAZ

DIRECTORA

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUIZ

ASESORES

DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ

DR. EDUARDO ESTEBAN MONTALVO JAVÉ

## COMITÉ TUTORAL

### Directora

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F

[mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)

### Asesor

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F

[legg@xanum.uam.mx](mailto:legg@xanum.uam.mx)

### Asesor

Dr. Eduardo Esteban Montalvo Javé

Profesor de Cirugía. UNAM

Jefe del Servicio de Cirugía General. Unidad 304.

Hospital General de México

[montalvoeduardo@hotmail.com](mailto:montalvoeduardo@hotmail.com)

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz.

El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por medio del proyecto con clave 153902.

El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa con número de registro (UAM-1:309-1), forma parte del Programa Nacional de Posgrado de Calidad de CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y recibe apoyo por parte del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 265935 / 364134, en el período 2011-2013.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: " DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA EN LA PROGRESIÓN DE CÁNCER HEPÁTICO INDUCIDO POR UN HEPATOCARCINÓGENO QUÍMICO ", con fecha de examen 28 de Enero del 2014.

### MIEMBROS DEL JURADO



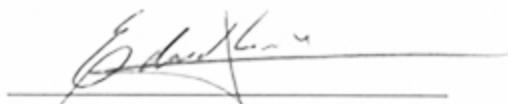
PRESIDENTA

Dra. Leticia Bucio Ortiz  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana.  
México, D.F.



SECRETARIO

Dr. Eduardo Esteban Montalvo Javé  
Profesor de Cirugía. UNAM  
Jefe del Servicio de Cirugía General.  
Hospital General de México  
México, D.F.



VOCAL

Dr. Eduardo Casas Hernández  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana.  
México, D.F.



VOCAL

Dr. Pablo G. Damián Matzumura  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
Universidad Autónoma Metropolitana.  
México, D.F.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz por abrirme las puertas a su laboratorio, por su apoyo, paciencia y orientación.

A mi asesor el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por invitarme al laboratorio, por guiarme y asesorarme durante todo el trabajo.

A mi asesor externo el Dr. Eduardo Esteban Montalvo Javé por brindarme su tiempo, por supervisarme y orientarme durante la realización de la tesis.

A la Dra. Leticia Bucio Ortiz, al Dr. Eduardo Casas Hernández y al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, por aceptar ser miembros de mi jurado, por sus acertados aportes y correcciones a ésta tesis.

Al resto de los integrantes del laboratorio, a la Dra. Verónica Souza por su amabilidad y su ayuda, a Nelly, Mayra, Denise, Benja, Soraya, Natalia, Tona, Arturo, Paty, Angeles, Mayrel, Ely y Alberto por su compañerismo y apoyo.

A Hiram García Campillo por su amabilidad y disposición para encargarse de todos los animales utilizados en ésta tesis.

A mis amigos de la universidad que han estado conmigo desde la licenciatura, Prisca Raquel Bustamante Álvarez y Emmanuel Ramos Sánchez por su confianza y por escucharme y aconsejarme.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la formación que me ha dado.

## DEDICATORIAS

A mi hermano, Armando Domínguez Meraz porque me impresionas día a día con tu madurez, estoy muy orgullosa de ti.

A mi mamá, Rosa Laura Meraz Cabrera por ser mi confidente, por tu fortaleza y porque siempre has cuidado de mí.

A mi papá, Armando Domínguez Ortiz porque siempre has creído en mí y por tus sabios consejos.

A mi tía, María Elena Domínguez Ortiz por apoyarme, aconsejarme y por todas las cosas que haces por mí.

A mi abuelita, María Elena Ortiz Del Valle porque sin haberte conocido no sería la persona que soy hoy en día.

A mi novio, Carlos Enrique Corral Herrera por tu apoyo incondicional y por hacerme sentir como una mejor persona.

## RESUMEN

Entre todos los tipos de cáncer, el carcinoma hepatocelular (HCC) se encuentra en el quinto lugar en incidencia y en el tercero en mortalidad a nivel mundial. Recientemente se ha encontrado que la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) es un factor de riesgo para el HCC. Se ha reportado que en la NAFLD es la acumulación de colesterol, más que de otro tipo de lípido, lo que sensibiliza los hepatocitos al daño. El objetivo de esta tesis es determinar el efecto de la esteatosis producida por una dieta hipercolesterolémica sobre la inducción y progresión del HCC producido por un hepatocarcinógeno químico. Para esto se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de catorce días de nacidos que fueron inyectados vía i.p. con n-dietilnitrosamina (DEN, 10  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal) y se alimentaron con dieta hipercolesterolémica (DHC, 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio). Los ratones se sacrificaron a distintos tiempos y se aisló la proteína de muestras de tejido para realizar ensayos de Western Blot. Parte del tejido se recuperó para realizar análisis histológicos con tinciones de hematoxilina-eosina, tricrómicas de Masson e inmunohistoquímicas con distintos marcadores de proliferación celular. Los resultados muestran que los ratones DHC tienen un desarrollo acelerado de tumores comparado con los ratones alimentados con una dieta balanceada. A los 8 meses de tratamiento la dieta hipercolesterolémica genera esteatosis y fibrosis. Los ratones DHC presentan tumores más grandes, en mayor cantidad y con mayor vascularización en relación con los controles. Los Western blots revelan incremento en la activación de STAT3, expresión elevada de ciclina D1 y disminución de p27 en los ratones DHC. Por lo que podemos concluir que la sobrecarga de colesterol en el hígado acelera la carcinogénesis inducida con DEN activando la vía de STAT3.

## **ABSTRACT**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the predominant type of primary liver cancer rated as fifth among all cancers in incidence and as third in mortality. Recently non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been recognized as an important risk factor for HCC. Recent findings show that in NAFLD cholesterol accumulation more than any other type of lipid sensitizes hepatocytes to damage. The aim of this thesis is to determine the effect of the steatosis induced by a hypercholesterolemic diet over the induction and progression of liver cancer produced by a chemical hepatocarcinogen. To do this thirteen days-old C57BL/6 male mice were fed with a hypercholesterolemic diet (DHC, 2% cholesterol and 0.5% sodium cholate) and were treated with a single dose of N-diethylnitrosamine (DEN, 10 µg/g body weight, i.p.) at fourteen days of age. Mice were sacrificed at different times, proteins were isolated from liver tissue samples to perform Western blot assays and pieces of tissue were embedded in paraffin for H&E and Masson's trichrome routine staining and for immunohistochemistry. Our data revealed accelerated tumor growth in animals fed with a high cholesterol diet compared with those fed with a standard diet. After 8 months of high cholesterol intake mice generated liver steatosis and fibrosis. DHC mice had larger tumors, in greater number and more vascularized than mice fed with the standard diet. Western blots analysis revealed an increase in STAT3 activation, overexpression of cyclin D1 and a decrease in p27 expression in DHC mice. In conclusion our data show that cholesterol overload in liver accelerates DEN induced carcinogenesis over activating Stat3 pathway.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>Obesidad como factor de riesgo para el cáncer</b> .....	3
<b>HCC y NAFLD</b> .....	4
<b>Colesterol</b> .....	6
<b>Mecanismos de hepatocarcinogénesis en NAFLD</b> .....	7
<b>Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la N-dietilnitrosamina</b> .....	9
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	11
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	12
<b>HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	14
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	15
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
<b>Animales</b> .....	16
<b>Tratamientos</b> .....	16
<b>Histología</b> .....	18
<b>Tinción con plata de los centros organizadores nucleolares</b> .....	19
<b>Inmunohistoquímica</b> .....	19
<b>Extracción y cuantificación de proteína</b> .....	20

<b>Western blot</b> .....	21
<b>Análisis Estadístico</b> .....	22
<b>RESULTADOS</b> .....	23
<b>Efecto de la dieta y de la DEN en el peso de los hígados de los ratones.</b>	23
<b>Cambios en histológicos hepáticos inducidos por la dieta y la DEN a corto plazo</b> .....	23
<b>Evaluación molecular de la respuesta temprana a la agresión con la DEN y la dieta.</b> .....	26
<b>La dieta hipercolesterolémica promueve la proliferación inducida por el DEN</b> .....	29
<b>La dieta hipercolesterolémica acelera y promueve la hepatocarcinogénesis inducida por el DEN</b> .....	29
<b>Los tumores que se generaron en presencia de la dieta hipercolesterolémica son más agresivos</b> .....	33
<b>La dieta hipercolesterolémica promueve la proliferación de células tumorales por medio de la vía STAT3</b> .....	37
<b>DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	49
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	50

## **INTRODUCCIÓN**

### **Obesidad como factor de riesgo para el cáncer**

La obesidad se ha convertido en uno de los problemas de salud pública más serios a nivel mundial y su prevalencia ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas (Sun y Karin, 2012). Una persona presenta obesidad cuando su índice de masa corporal (IMC) es mayor o igual a 30 kg/m<sup>2</sup> (Haslam y James, 2005). El incremento de la incidencia de la obesidad a nivel mundial, particularmente en niños, ha llamado la atención de la Organización Mundial de Salud (Rocchini, 2002). La Secretaría de Salud en nuestro País afirma que el sobrepeso y la obesidad afectan a 70% de la población de 20 o más años de edad, a 31% de los adolescentes y al 26 % de los niños entre 5 y 11 años.

La obesidad puede ser causa de múltiples enfermedades como el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD, por su siglas en inglés) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) (Sun y Karin, 2012). Recientemente también se ha reconocido a la obesidad como un factor de riesgo mayor para múltiples tipos de cáncer, entre los cuales el cáncer de páncreas y de hígado mostraron el mayor aumento de riesgo (Haslam y James, 2005).

Múltiples estudios epidemiológicos confirman la importancia de la obesidad como un factor de riesgo independiente para el carcinoma hepatocelular (HCC), la forma más

común de cáncer hepático (Regimbeau, y col., 2004). Moller y col., (1994) observaron un incremento en el riesgo de cáncer entre pacientes obesos dados de alta de hospitales daneses, con un riesgo relativo de 1.9. Otro estudio en Estados Unidos mostró que las mujeres obesas tienen más riesgos de morir por cáncer de hígado (riesgo relativo 1.68) que sus contrapartes no obesas, mientras que los hombres presentaron un riesgo de 4.52 veces más que hombres no obesos (Calle, y col., 2003).

Debido a su mayor prevalencia y a que se encuentra más repartida alrededor del mundo, la obesidad se puede considerar como un factor de riesgo mayor que las infecciones por el virus de la hepatitis B (HBV) o C (HCV) (Sun y Karin, 2012).

## **HCC y NAFLD**

El HCC es la forma más común de carcinoma hepático primario, entre todos los tipos de cáncer se encuentra en el quinto lugar en incidencia y en el tercero en mortalidad a nivel mundial (Venook y col., 2010). En México, las muertes por HCC muestran una tendencia creciente del 2004 al 2006 aumentando 14% (Uribe, 2010).

El HCC se desarrolla frecuentemente en el hígado previamente dañado; los principales factores de riesgo son las cirrosis causadas por hepatitis viral (infecciones por HBV o HCV) o por el abuso de alcohol (Blonski y col., 2010), sin embargo, el rápido desarrollo de potentes agentes antivirales y la creciente incidencia de cirrosis asociada a NASH y al sobrepeso pueden modificar el panorama etiológico de las enfermedades hepáticas crónicas en las próximas décadas (Ascha y col., 2010).

Es muy probable que en los Estados Unidos de Norteamérica y en México, la obesidad sea el primer factor de riesgo junto con otros factores no virales como la diabetes mellitus tipo 2, el alcohol, el tabaco y anticonceptivos orales (Blonski y col., 2010).

La mayor manifestación hepática de la obesidad es la NAFLD y se ha relacionado con el HCC (Abdelmalek y Diehl, 2007). La NAFLD se ha convertido en la enfermedad hepática más común en Estados Unidos y otros países industrializados, afecta al 30% de la población adulta general y a 90% de los pacientes con obesidad mórbida (IMC mayor o igual a 40 kg/m<sup>2</sup>) (Lazo y Clark, 2008). La mayoría de los individuos con NAFLD tienen sólo esteatosis, sin embargo, aproximadamente el 20% de todos los casos presenta esteatohepatitis, la cual consiste en esteatosis e inflamación parenquimal y portal, algunos pacientes también pueden presentar distintos niveles de fibrosis con el potencial de progresar a cirrosis (Rafiq y col., 2009).

La acumulación de lípidos debido a la ingesta excesiva de calorías, factores genéticos u otras enfermedades puede resultar en disfunción hepática debido a que el hígado sintetiza más triglicéridos y no puede exportarlos, en consecuencia los triglicéridos se acumulan en los hepatocitos, provocando esteatosis hepática (Baffy y col., 2012).

La NAFLD es un desorden reversible cuyas causas pueden ser tratadas e inhibidas en etapas tempranas (Eriksson y col., 1986). Sin embargo, sin el tratamiento correcto la NAFLD puede progresar a inflamación hepática crónica (NASH), que puede llevar la enfermedad hasta cirrosis causando graves complicaciones incluyendo falla hepática y HCC (Park y col., 2010). Además la NAFLD puede ser un cofactor en otras enfermedades hepáticas y exacerbar la herida hepática (Powell y col., 2005). Hasta la fecha, se ha subestimado el papel de la NAFLD en el desarrollo de HCC, por lo que

es probable que la NAFLD y otros factores relacionados con el metabolismo actúen sinérgicamente con otras condiciones para promover la hepatocarcinogénesis.

## **Colesterol**

La literatura especializada ha reportado datos en los últimos años con estudios que ya no dejan la menor duda de la relación que tiene la NAFLD y el HCC (Starley y col., 2010, Tokushige y col., 2010). Sin embargo se ha descuidado el papel que tiene particularmente el colesterol en el inicio y progresión del HCC, sobre todo en poblaciones donde la ingesta de colesterol de la dieta es sumamente importante como es el caso de los mexicanos, en donde el contenido de colesterol en la dieta es 10 veces superior a la que tienen países europeos (Enurbal, 2007).

El colesterol es importante para el buen funcionamiento celular. Es componente central de las membranas plasmáticas y, en particular, de las balsas lipídicas por lo que una disminución o aumento de los niveles de colesterol afecta seriamente a los componentes proteicos de las balsas, sobre todo cuando se trata de receptores a factores de crecimiento o citocinas. Datos de nuestro laboratorio muestran que el consumo de una dieta alta en colesterol durante 48 horas provoca acumulación de triglicéridos en los hepatocitos. Los hepatocitos no son células especializadas en el almacenamiento de lípidos y frente a esta sobrecarga de triglicéridos producen de especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales se han relacionado con diferentes procesos patológicos como el cáncer (Baffy y col., 2012).

Recientemente se han caracterizado, por el grupo del Dr. Fernández-Checa (Hospital

Clinic I Provincial, Barcelona, España), los efectos que tiene la sobrecarga de colesterol en los hepatocitos de animales alimentados con una dieta hipercolesterolémica compuesta por alimento base para roedores (Purina # 5001) suplementada con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio, el cual ayuda a mejorar la absorción del colesterol en el intestino (Mari y col., 2006). Este grupo de investigación reporta que es el tipo de lípido más que la cantidad del mismo lo que determina la susceptibilidad del hígado graso de progresar a NASH. Los resultados muestran que es el colesterol libre, pero no los ácidos grasos libres o los triglicéridos, el que sensibiliza al hepatocito a la NASH mediada por el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) y Fas.

Por otro lado, en relación a estudios sobre el cáncer, el mismo grupo de investigación reportó que el colesterol mitocondrial brinda resistencia a la quimioterapia a células de HCC por un mecanismo dependiente del incremento en el orden de membrana mitocondrial. Además, se ha reportado que el tratamiento con estatinas induce la sensibilidad de las células del HCC a la doxorubicina (Montero y col., 2008), demostrando que al menos existe un efecto conferido por el colesterol en la resistencia a las terapias anticancerosas.

### **Mecanismos de hepatocarcinogénesis en NAFLD**

La hepatocarcinogénesis es un proceso de varios pasos que puede tardar varias décadas para evolucionar en enfermedad hepática crónica (Farazi y DePinho, 2006). La desregulación del balance entre los procesos de proliferación y muerte celular tiene

un efecto tumorigénico. En el HCC humano generalmente se asocia con la activación de las señales de proliferación e inhibición del proceso de muerte celular que llevan a la sobrevivencia y luego proliferación de las células afectadas (Fabregat y col., 2007). Múltiples mecanismos pueden estar interviniendo en la creación de un ambiente favorable para la formación de tumores en el HCC relacionado con la NAFLD. La obesidad se caracteriza por una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, que es un factor de riesgo para el HCC. Cuando el tejido adiposo se expande promueve la liberación de citocinas proinflamatorias, como la interleucina 6 (IL-6) que pueden activar rutas proto-oncogénicas como la que involucra a STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) (Stickel y Hellerbrand, 2010).

Las células cancerosas a menudo exhiben alta síntesis alta de ácidos grasos y acumulación de lípidos (Menendez y Lupu, 2007), esto sugiere que el incremento en la disponibilidad de lípidos en los hepatocitos puede proveer energía y soporte estructural a la rápida proliferación de las células del HCC (Baffy y col., 2012). La lipotoxicidad se define como la disfunción celular ocasionada por acumulación de grasa en tejidos no adiposos como el hepático (Unger y col., 2010). Cuando la oxidación de ácidos grasos elevada se producen peróxidos lipídicos y radicales libres que ocasionan tanto estrés del retículo endoplásmico como disfunción mitocondrial incrementando la producción de ERO (Wei y col., 2006). Las ERO activan a las células estelares que producen varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que pueden estimular vías oncogénicas que contribuyen en la expansión y selección de los clones neoplásicos de hepatocitos (Baffy y col., 2012).

El HGF también activa las vías de señalización RAS/ERK (cinasa de proteínas

regulada por señales extracelulares) y fosfatidilinositol cinasa 3 (PI3K)/Akt (Fabregat y col., 2007). Se ha encontrado una activación aberrante de la vía RAS/ERK en el HCC humano (Tsuboi y col., 2004). Además, la proliferación de tumores inducida por la activación de ERK está asociada a la resistencia contra cualquier tipo de terapia como la radiación y la quimioterapia (Yoshida y col., 2006), sin embargo, el mecanismo de la desregulación de ERK aún no se conoce del todo.

La vía PI3K/Akt también juega un papel importante en la regulación del blanco de la proteína “blanco de la rapamicina en mamíferos” (mTOR) el cual regula el crecimiento celular en respuesta al ambiente nutricional celular. Akt también podría estar sobreactivando señales antiapoptóticas como proteínas de la familia de Bcl-2, Mcl-1 (Schulze-Bergkamen y col., 2004).

### **Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la N-dietilnitrosamina**

La N-dietilnitrosamina (DEN) ha sido usada extensivamente en el pasado como un carcinógeno, un iniciador de lesiones en modelos animales de carcinogénesis o ambos. La DEN induce lesiones hepáticas neoplásicas y preneoplásicas en ratones. Para inducir tumores con DEN se utilizan ratones infantiles (14 días de edad) debido a que el hígado en desarrollo es susceptible especialmente a carcinógenos químicos (Vesselinovitch y col., 1984). Este modelo es uno de los más utilizados para estudiar las diferentes etapas de la hepatocarcinogénesis (Fausto y Campbell, 2010). La DEN se metaboliza en un agente alquilante que induce daño en el ADN, mutaciones (Verna y col., 1996) y muerte de los hepatocitos (Farber y Gerson, 1984). Los eventos

moleculares resultantes de la exposición a la DEN reflejan la situación del HCC humano con mal pronóstico.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la población mexicana tanto adulta como infantil presenta una prevalencia muy alta de obesidad. El contenido de colesterol de la dieta del mexicano es 10 veces superior a la que tienen países europeos, sobre todo los de las costas del Mediterráneo. Además, en su dieta, el consumo de grasas es superior al valor recomendado, lo cual nos lleva a considerar que una proporción muy alta de la población mexicana debe de tener hígado graso. La acumulación de lípidos en el hígado provoca un estado inflamatorio que puede llevar a HCC. La evolución de NAFDL a HCC es un proceso lento, que puede tomar hasta 30 años, por lo que datos concretos de la relación hígado graso – HCC no existen por el momento. Considerando que el estado de estrés oxidante crónico en los hepatocitos acelera el proceso carcinogénico, que la ingesta alta de colesterol provoca un estado de estrés oxidante y el aumento en el consumo de alimentos con alto contenido calórico tanto en adultos como en niños, es fácilmente predecible que en los próximos 20 años se observará un aumento alarmante en casos de HCC, siendo todavía más preocupante que puede irse presentado en edades mucho más tempranas. La caracterización de las rutas de supervivencia y proliferación afectadas en modelos experimentales de esteatosis y HCC inducido por DEN nos permitirá conocer más acerca de esta fisiopatología e identificar marcadores pronóstico de seguimiento y progresión del proceso hepatocarcinogénico en el hígado graso.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Puede una dieta rica en colesterol favorecer la progresión del cáncer hepático inducido por la N-dietilnitrosamina?

## **HIPÓTESIS**

La esteatosis generada por el consumo de una dieta hipercolesterolémica acelerará el proceso carcinogénico inducido por la N-dietilnitrosamina, incrementando la activación de las rutas de proliferación celular y disminuyendo las relacionadas con la muerte celular.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la esteatosis producida por la dieta hipercolesterolémica sobre la inducción y progresión de la hepatocarcinogénesis química.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Determinar el efecto de una dieta hipercolesterolémica sobre la proliferación celular y generación de lesiones en un modelo de carcinogénesis química inducida por la N-dietilnitrosamina.
- 2) Determinar los cambios histológicos producidos por el efecto de una dieta hipercolesterolémica en el cáncer hepático inducido por la N-dietilnitrosamina,
- 3) Determinar el efecto de una dieta hipercolesterolémica sobre las rutas de supervivencia y proliferación STAT3 y ERK en carcinogénesis química inducida por la N-dietilnitrosamina.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich de México, salvo cuando se indique lo contrario. Los anticuerpos primarios y secundarios se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology EUA, salvo cuando se indique lo contrario.

### **Animales**

Para el presente estudio se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6 de 13 días de nacidos que se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación de la Ciudad de México hasta el día del sacrificio. Los animales se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos, ciclos de luz y oscuridad 12/12h y se mantuvieron con su madre hasta cumplir 1 mes de edad.

### **Tratamientos**

Los ratones se dividieron en cuatro grupos que se describen a continuación:

- Los ratones control consistieron fueron alimentados con una dieta estándar para roedores (Chow, Purina Inc) durante todo su tratamiento, grupo CW. A los 14 días de edad se les administró una inyección de 50  $\mu$ l de solución salina (SS) vía i. p.

- En el grupo DCW los ratones fueron alimentados con dieta Chow hasta el día de su sacrificio. A los 14 días de nacidos se les administró una inyección de DEN diluido en SS a una concentración de 10 µg/g de peso corporal vía i. p.
- Los ratones del grupo HC se alimentaron desde los 13 días de nacidos y hasta su sacrificio con una dieta hipercolesterolémica compuesta por con una dieta base Chow suplementada con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio (Dyets Inc.). 24 horas después se les administró SS por vía i. p.
- El grupo DHC está compuesto por ratones que se alimentaron con la dieta hipercolesterolémica desde los 13 días de nacidos y hasta su sacrificio. Al día siguiente se les administró DEN por vía i.p.

Seis ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 0, 1, 2, 7, 15, 31 (1 mes), 84 (3 meses), 140 (5 meses) y 224 (8 meses) a partir del inicio de la dieta. El día del sacrificio los ratones se anestesiaron con 0.6 ml de tribromoetanol (avertina) por vía i. p. para después pesarlos y tomar una muestra de sangre por punción cardiaca. El área abdominal se desinfectó con etanol al 70% y se realizó una incisión en forma de V para dejar expuesto al hígado. Los hígados fueron resecados, pesados y fotografiados. Se contó el número de lesiones visibles macroscópicamente así como el número de tumores mayores a 1 mm. Fragmentos de hígado o de tumores (dependiendo del tratamiento y del tiempo) se fijaron en formalina al 10%, otros en paraformaldehído al 4% y otros se congelaron en nitrógeno líquido. En el caso de los tumores también se congeló tejido circundante.

## **Histología**

Los fragmentos de tejido hepático preservados en formalina se deshidrataron con etanol para luego ser embebidos en parafina. A partir de los bloques de parafinas, se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  que se depositaron sobre portaobjetos. Los portaobjetos se introdujeron 10 min a una estufa a 60°C, luego se desparafinizaron con xileno y se hidrataron con concentraciones de etanol del 100 al 50% por 5 min cada uno para acabar con un lavado en agua por 5 min. Después se colocaron en hematoxilina de Harris por 5 min y a continuación se lavaron en agua por 5 min, se continuó sumergiéndolos en HCl-EtOH96% hasta que apareció un color rojizo, después se sumergieron en agua amoniacal (200 ml de agua destilada con 3-4 gotas de amoníaco) hasta que apareció un color azul. Se volvió a lavar con agua corriente durante 2 min y con agua destilada otros 2 min. En seguida se colocaron los portaobjetos en eosina alcohólica 1 min. Posteriormente se deshidrataron las muestras en etanol del 50% al 100% se sumergieron 1 min en xileno y se montaron con Dako Cytomaton, USA.

Para la tinción tricrómica de Masson los portaobjetos con las secciones hidratadas se colocaron en solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente los portaobjetos se lavaron y enfriaron con agua corriente para luego teñirse en hematoxilina de Gill durante 5 min. Después de lavar y aclarar con agua desionizada se tiñeron las secciones en una solución de fucsina ácida-escarlata de Bierich por 5 min. Se aclaró con agua desionizada y se colocaron los portaobjetos en solución de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico (esta solución se preparó mezclando 1 volumen de ácido fosfotúngstico y 1 volumen de ácido fosfomolibdico con 2

volúmenes de agua desionizada) durante 5 min. Posteriormente se colocaron los portaobjetos en una solución de azul de anilina durante 5 min. Después se deshidrataron, aclararon con xileno y montaron.

### **Tinción con plata de los centros organizadores nucleolares**

Secciones de biopsias hepáticas de 5  $\mu\text{m}$  se desparafinizaron con xileno y rehidrataron como se explicó previamente. Posteriormente las muestras se sumergieron en una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6.0 y se introdujeron en una autoclave a 120°C por 20 min. A continuación las secciones se lavaron en agua desionizada 2 veces por 5 min y se tiñeron con una solución compuesta de un volumen de 2% de gelatina en 1% ácido fórmico acuoso y dos volúmenes de nitrato de plata al 50%. La tinción se llevó a cabo en una incubadora a 37°C por 11 min. Posteriormente se lavaron las muestras con agua desionizada 3 veces por 5 min. Después se deshidrataron, aclararon con xileno y montaron.

### **Inmunohistoquímica**

Para los estudios inmunohistoquímicos las secciones de 5  $\mu\text{m}$  se desparafinizaron y rehidrataron de igual forma que las muestras que se utilizaron para las tinciones histológicas. Para la recuperación antigénica los portaobjetos se sumergieron en una solución de 10 mM de citrato de sodio pH 6.0 y se introdujeron en una autoclave a 120°C por 20 min. Posteriormente las muestras se lavaron en agua desionizada 2

veces por 5 min y se bloquearon por 1 h con TBS-Tween suplementado con 5% de leche descremada. A continuación se quitó la solución de bloqueo, se depositaron 200  $\mu$ l de la solución con el anticuerpo primario diluido en TBS-Tween y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se quitó el anticuerpo y se lavaron las secciones 3 veces en TBS-Tween por 5 min cada lavado. Se agregó el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min a temperatura ambiente y después se lavaron las muestras con TBS-Tween 2 veces por 5 min. Se les agregó reactivo ABC (Vector Laboratories, Inc.) y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente, después se lavaron 2 veces con TBS-Tween por 5 min. Luego se agregaron 200  $\mu$ l de reactivo DAB se monitoreo la tinción y una vez teñidos se lavaron los portaobjetos en agua desionizada. A continuación las muestras se deshidrataron y montaron. Los anticuerpos primarios utilizados contra mTOR, PCNA y EpCAM pertenecen a la marca Cell Signaling.

### **Extracción y cuantificación de proteína**

Se tomó un fragmento de aproximadamente 100 mg de tejido hepático y se homogenizó en 1ml de PBS, posteriormente se centrifugó a 8900 g durante 1 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en 300 $\mu$ l de amortiguador de lisis T-PER (Pierce Chemical, USA) con mezcla de inhibidores de fosfatasas y de proteasas (Roche). Se incubó en hielo durante 15 min y después se centrifugó a 17000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se guardó a - 80°C en alícuotas hasta ser cuantificadas.

La concentración de proteínas se determinó colorimétricamente utilizando el estuche comercial BCA (Pierce Chemical), basado en la reacción de Biuret ó del ácido bicínónico. Como curva patrón se utilizó albúmina sérica de bovino.

### **Western blot**

De las proteínas obtenidas de homogenizados de tejido hepático se tomaron 100 µg de proteína total y se les agregó un amortiguador de muestra constituido por Tris-HCl 0.1 M a pH 6.8, glicerol (J. T. Baker, México), dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% (BioRad, EUA), 2--mercaptoetanol al 10% (BioRad, EUA) y azul de bromofenol al 1.0% (BioRad, EUA). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS 0.1 % en una cámara de electroforesis mini-Protean II (BioRad, EUA) a un voltaje de 120 V durante 90 min. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare Life Science) durante 120 min a 120 V en un sistema transblot (Biorad, USA). La membrana fue bloqueada con TBS-Tween suplementado con 5% de leche descremada durante 1 h en agitación constante. Para la detección de cada proteína de interés, la membrana se incubó con anticuerpos específicos durante toda la noche en agitación constante a 4°C. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces en TBS-Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano por 1 h. Después se lavó 2 veces por 10 min con TBS-Tween y 1 vez con TBS por 5 min. Después se reveló usando un agente quimiolumincente comercial (Roche). Las bandas se cuantificaron por densitometría usando el fotodocumentador

Gel logic 1500 (Kodak, USA). Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron anti-STAT3 fosforilado (S727), anti-STAT3 fosforilado (Y705), anti-ERK1/2 y anti-ERK1/2 fosforilado (Cell Signaling), y anti-STAT3, anti-ciclina D1, anti-p27 y anti-SOD1 (Santa Cruz). Se empleó a la GAPDH (Santa Cruz) como control de normalización de carga.

### **Análisis Estadístico**

Cada experimento se realizó por triplicado en por lo menos 3 eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados se hará por análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey. El nivel de significancia considerado fue de  $p < 0.05$ .

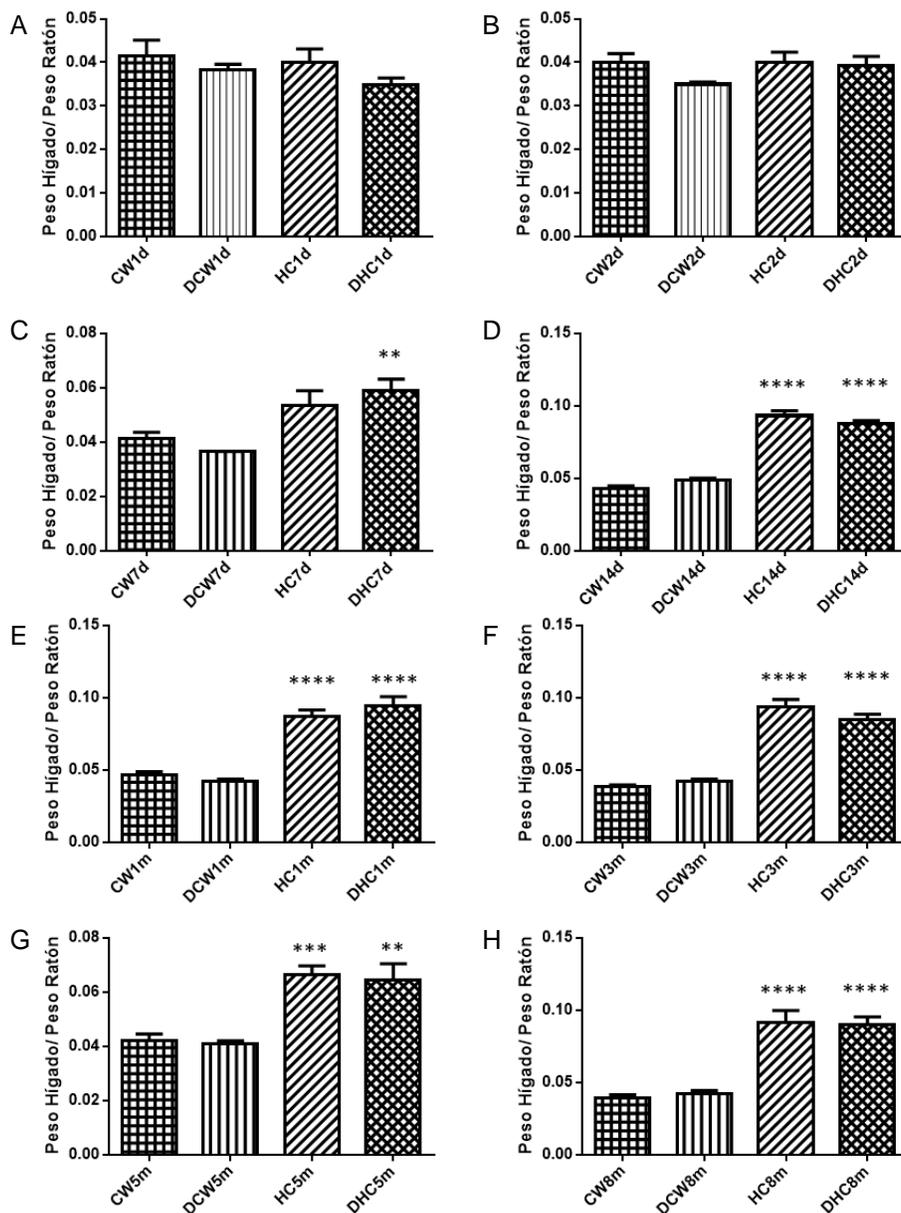
## **RESULTADOS**

### **Efecto de la dieta y de la DEN en el peso de los hígados de los ratones**

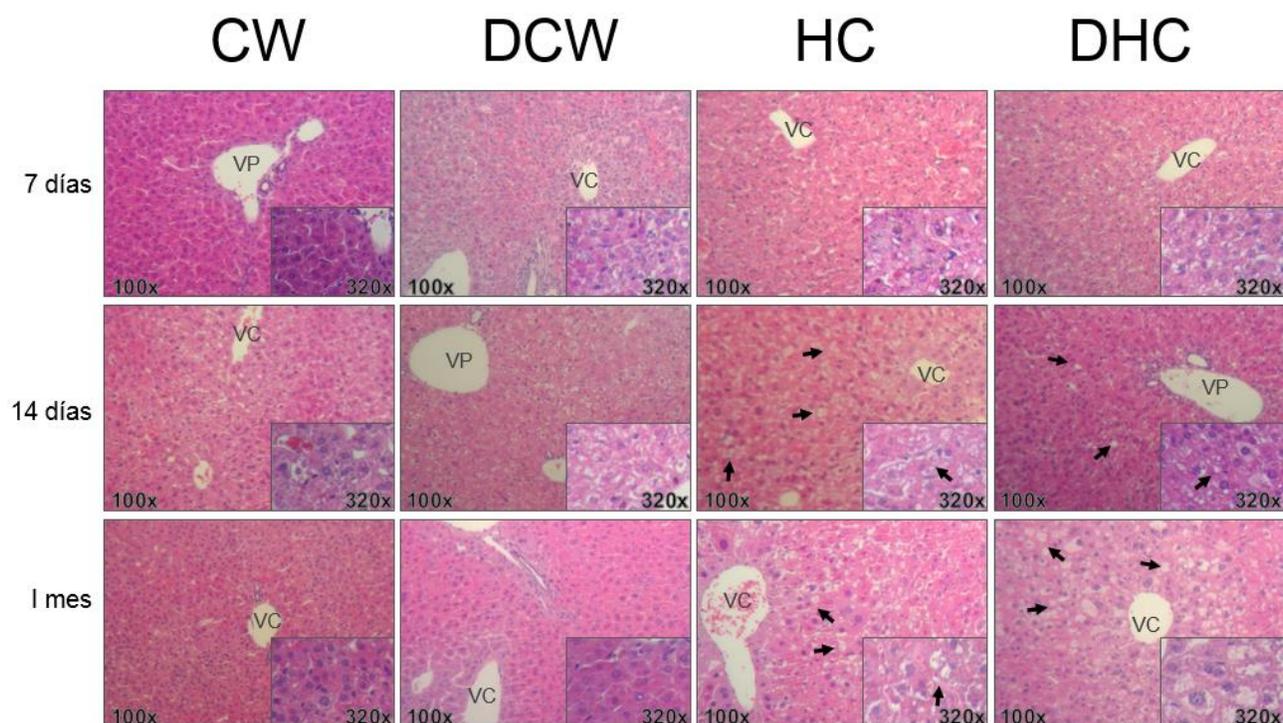
Los primeros cambios a evaluar fueron el efecto de la dieta y de la DEN en el peso de los hígados de los ratones a diferentes tiempos. Los datos muestran que empieza a haber una diferencia significativa entre el peso de los hígados tratados con dieta CW y los que fueron tratados con dieta HC partir de los 14 días de tratamiento en donde se puede observar un incremento de dos veces en el cociente del peso de hígado entre el peso total de ratón (Fig. 1C). Este aumento significativo en los dos grupos tratados con la dieta HC continúa hasta los 8 meses de tratamiento (Fig. 1C, D, E, F, G y H). El grupo DCW no muestra cambios significativos cuando se compara con el grupo control CW en ninguno de los tiempos.

### **Cambios histológicos hepáticos inducidos por la dieta y la DEN a corto plazo**

Las micrografías de las secciones hepáticas teñidas con hematoxilina eosina muestran esteatosis en las muestras de 14 días y de 1 mes de tratamiento con dieta HC tanto en los ratones inyectados con SS y con DEN (Fig 2.). En las muestras tratadas con DEN se observan células más claras alrededor de la vena central que son indicativas de daño pericentral a los 7 y 14 desde la administración de la DEN. En el grupo DCW el daño a los hepatocitos pericentrales ya no es visible al mes de tratamiento.



**Figura 1. Cambios en el cociente del peso del hígado entre el peso total del ratón en los distintos tiempos de tratamiento.** Cocientes del peso del hígado entre el peso del ratón a tiempos de 1 día (1d), 2 días (2d), 7 días (7d), 14 días (14d), 1 mes (1m), 3 meses (3m), 5 meses (5m) y a 8 meses (8m). Los tratamientos administrados a los ratones son CW: dieta balanceada Chow, DCW: dieta Chow y DEN, HC: dieta hipercolesterolémica, y DHC: dieta hipercolesterolémica y DEN. Las columnas representan el promedio de experimentos independientes  $\pm$  error estándar. Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA seguido por una prueba de Tukey,  $n \geq 5$ . \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

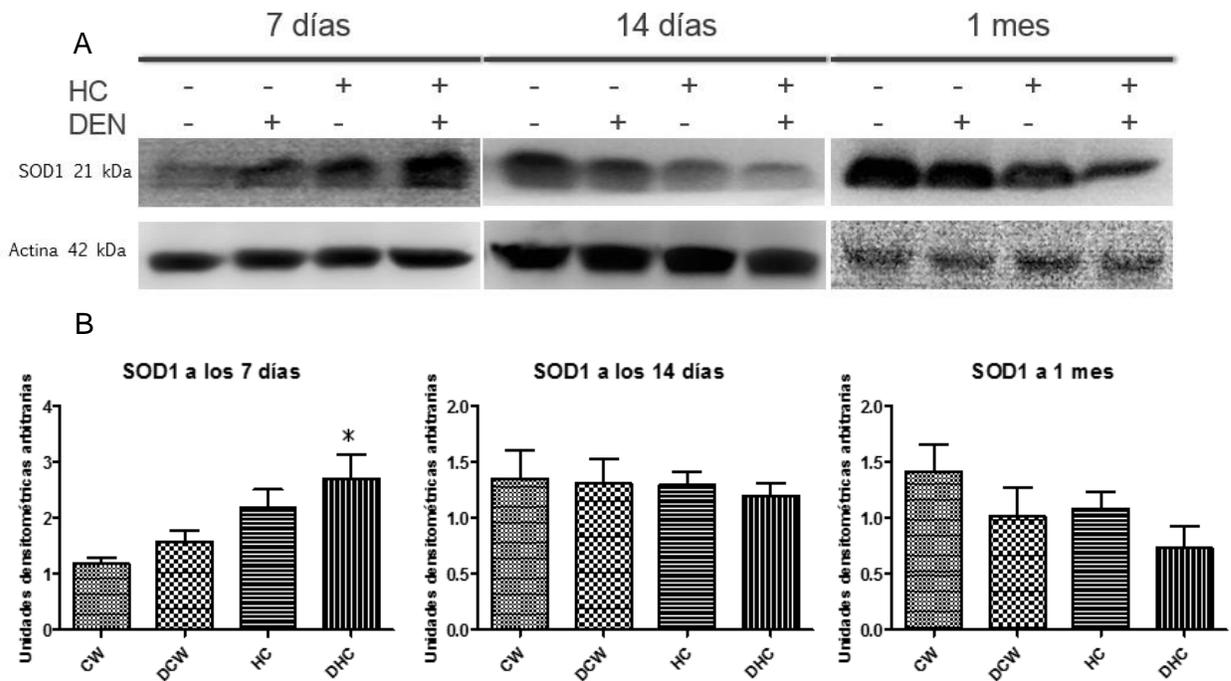


**Figura 2. Tinciones con hematoxilina eosina de biopsias hepáticas de ratones a tiempos cortos.** Microscopías de tinciones con hematoxilina de muestras hepáticas de ratones CW, DCW, HC y DHC de 7, 14 días y 1 mes de tratamiento. En las muestras de los ratones alimentados con la dieta HC se pueden apreciar desde los 14 días, vesículas lipídicas (flechas negras) que confirman la presencia de esteatosis. VC = Vena Central; VP = Vena Porta.

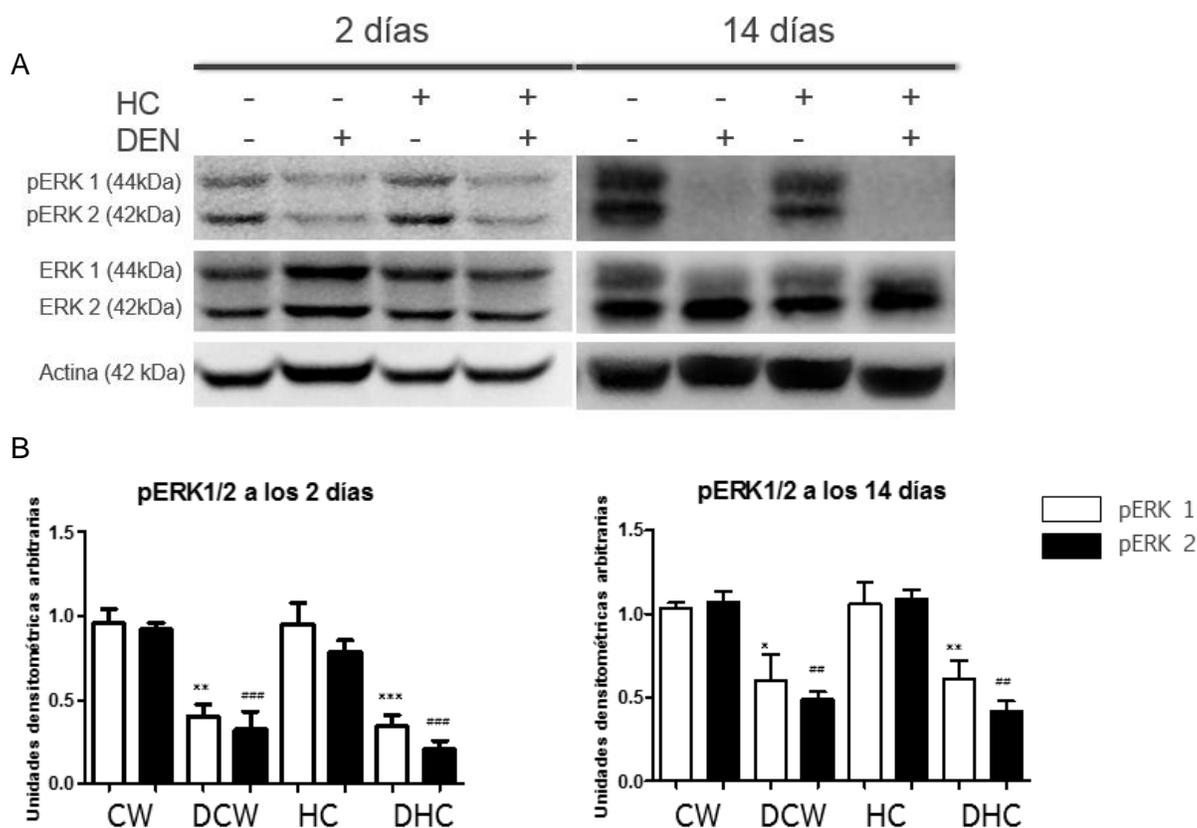
## **Evaluación molecular de la respuesta temprana a la agresión con la DEN y la dieta**

La DEN es una sustancia química que se biotransforma en los hepatocitos gracias al citocromo P450 2E1 (CYP2E1) el cual activa el carcinógeno a un agente electrofílico (Kang y col., 2007). Estos agentes generan estrés oxidante por lo que inducen una respuesta antioxidante en la que participan enzimas como la superóxido dismutasa 1 (SOD1). Además se ha visto que las células cancerosas presentan una actividad reducida de la SOD1 (Derenzini y Trere, 1994). Es por esto que se analizó la expresión de la SOD1 desde tiempos cortos por medio de Western Blots. Estos muestran que a los 7 días de tratamiento los niveles de expresión de la SOD1 aumentan tanto en el grupo DCW como en el HC (Fig. 3A), y se encuentra significativamente incrementados en el tejido DHC en comparación con el control CW (Fig. 3B). A los 14 días y al mes de tratamiento los patrones de expresión de la proteína SOD1 muestran un comportamiento inverso al de los 7 días, ya que su expresión disminuye en los grupos DCW, HC y DHC en comparación con el grupo control. El grupo DHC es el que presenta la menor cantidad de SOD1 (Fig. 3A y B).

Una de las varias vías que se pueden encontrar involucradas en el inicio y la progresión del HCC es la ruta de Ras/ERK (Naugler y col., 2007). Debido a esto se evaluó su expresión desde tiempos cortos. Los resultados de la hibridación por Western Blot mostraron que al poco tiempo después de la administración de la DEN (2 días) los niveles de expresión de la proteína ERK fosforilada son casi nulos y, a los 14 días, la DEN impide su expresión tanto en el grupo DCW y DHC (Fig. 4A y B).



**Figura 3. Respuesta antioxidante mediada por SOD1 ante la agresión con dieta hipercolesterolémica y DEN.** Western Blots representativos de lisados celulares de hígados de ratones tratados desde 2 días hasta 1 mes. A) Niveles de expresión de SOD1 a tiempos de 7, 14 días y de 1 mes de tratamiento. B) Análisis densitométrico de los Western Blots de SOD1. Cada columna de las gráficas representa el promedio  $\pm$  error estándar (EE) de al menos 3 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA seguido por una prueba de Tukey,  $n = 3$ . \*,  $P < 0.05$  \*\*.



**Figura 3. Respuesta temprana de ERK ante la dieta hipercolesterolémica y la DEN.** Western Blots representativos de lisados celulares de hígados de ratones tratados desde 2 días hasta 1 mes. A) Niveles de expresión de ERK fosforilado en muestras de 2 y 14 días de tratamiento. B) Análisis densitométrico de los Western Blots de ERK fosforilado. Cada columna de las gráficas representa el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA seguido por una prueba de Tukey,  $n=3$ . \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*, \* vs pERK 1 y # vs pERK 2

## **La dieta hipercolesterolémica promueve la proliferación inducida por el DEN**

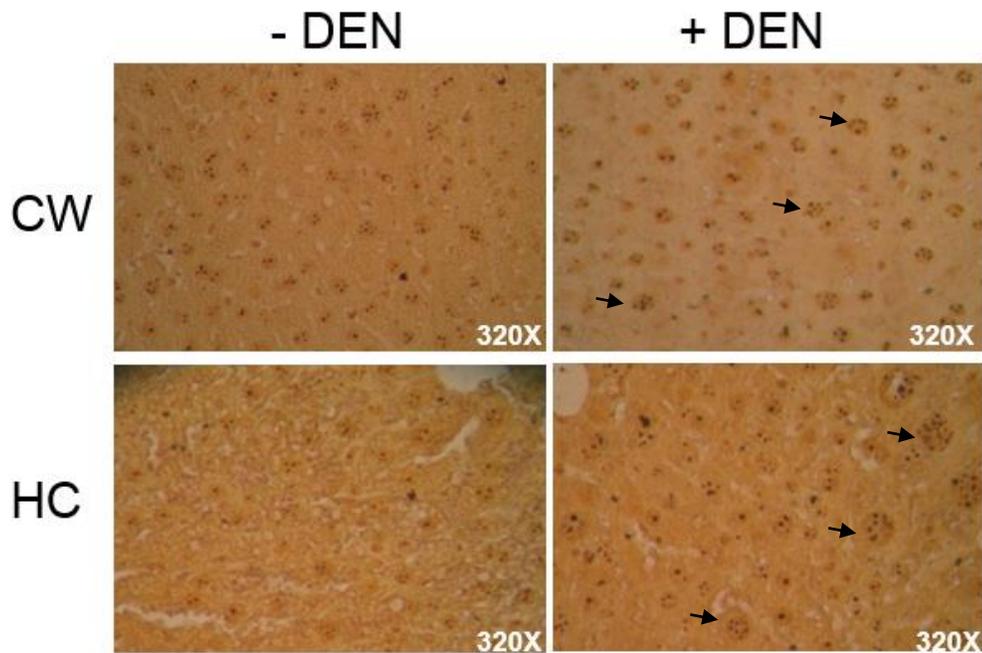
Para determinar el efecto de la dieta y el DEN sobre la proliferación celular se realizaron tinciones de plata de las regiones organizadoras nucleolares (NORs). Las cuales son los sitios en donde se transcribe el RNA ribosomal. Varias proteínas involucradas en este proceso son argirófilas por lo que se pueden teñir con plata y permiten visualizar los NORs al microscopio (Wang y col., 2011). Estos aparecen como unos puntos negros dentro del núcleo y se conocen como AgNORs. Se ha reportado que las células cancerosas exhiben frecuentemente una mayor cantidad de proteínas AgNORs al compararlas con células no transformadas siendo estos marcadores de incremento en la proliferación celular (Derenzini y Trere, 1994).

Las micrografías (Fig. 5) muestran que los núcleos de los hepatocitos de las muestras tratadas con DEN por 3 meses presentan un mayor número de AgNORs. Aunque la muestra control también presenta algunos núcleos ricos en AgNORs, la muestra del grupo DHC es la que presenta un mayor número de AgNORs en los núcleos de los hepatocitos, que además son más grandes que otros núcleos, indicando que las células tienen una tasa de proliferación más alta en comparación con las muestra de los otros grupos.

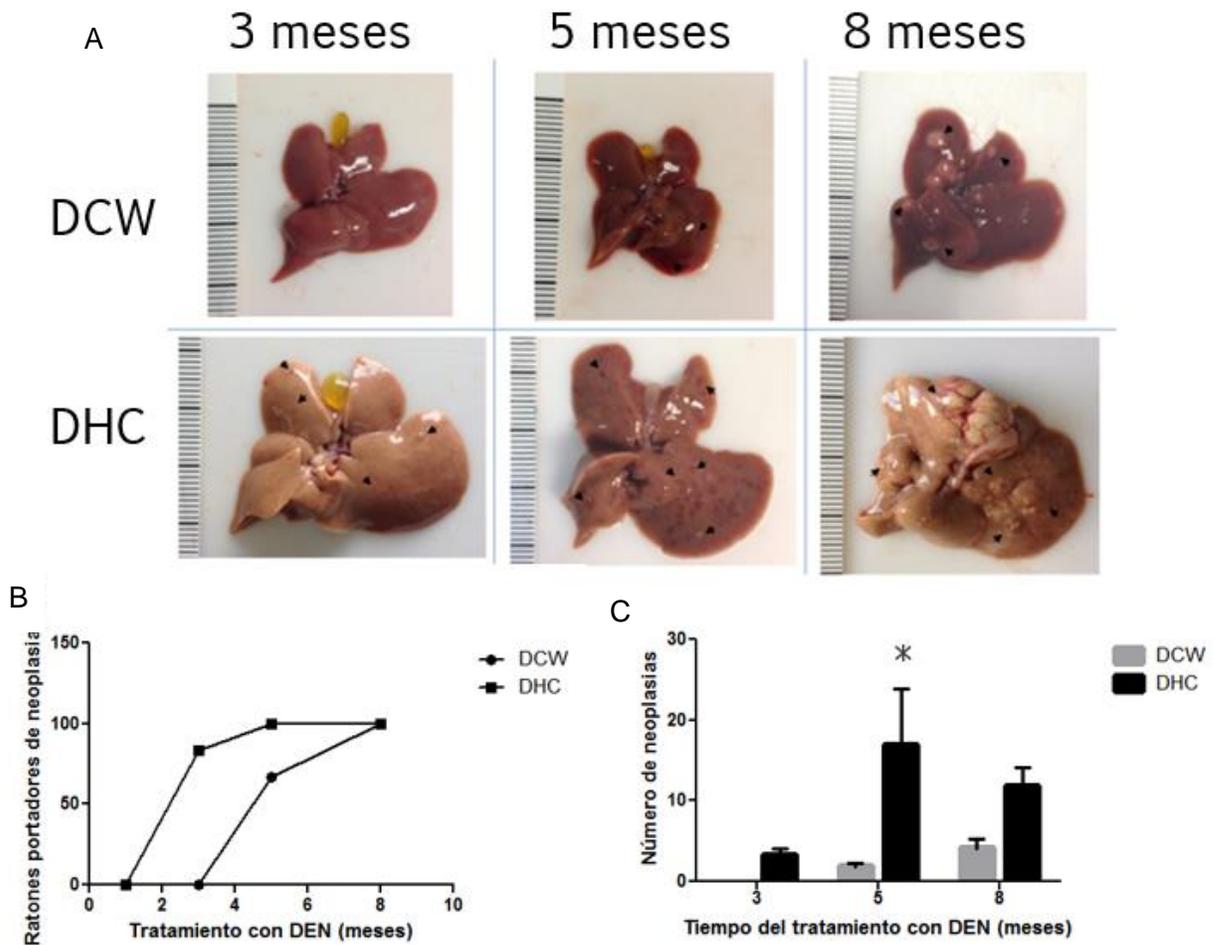
## **La dieta hipercolesterolémica acelera y promueve la hepatocarcinogénesis inducida por el DEN**

Los ratones del grupo DHC desarrollan neoplasias antes que los del grupo DCW que se alimentaron de una dieta balanceada. Las lesiones en los ratones DHC son visibles

desde los 3 meses después del tratamiento con DEN en el 80% de los ratones del grupo (Fig. 6A, B y C). A los 5 meses, todos los hígados de los ratones DHC muestran una alta multiplicidad de nódulos comparados con los ratones del grupo DCW en los que sólo un 60% presenta nódulos (Fig. 6A y B). Además la cantidad de nódulos presentes en los ratones del grupo DHC es 6 veces más alta que en los del grupo DCW (Fig. 6C). A los 8 meses los ratones DHC presentan en promedio el doble de tumores que los ratones DCW (Fig. 6C), de mayor tamaño y que aparentan ser mucho más vascularizados (Fig. 6A).



**Figura 5. Efecto de los tratamientos sobre la presencia de centros organizadores nucleolares (NOR).** Micrografías representativas de biopsias de hígados de ratones tratados o no con dieta HC y DEN por 3 meses que fueron teñidas con plata. Las flechas señalan células que presentan múltiples AgNORs.



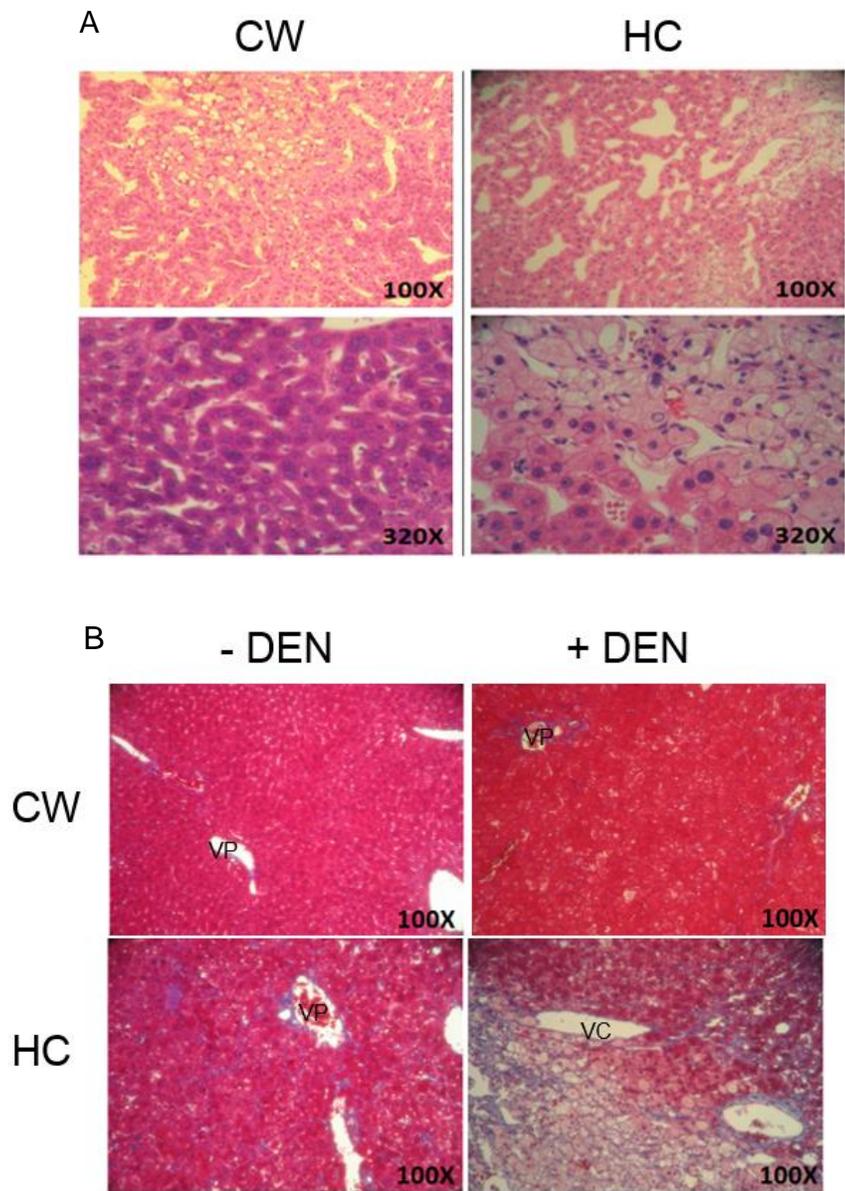
**Figura 5. La dieta hipercolesterolémica acelera y promueve el proceso carcinogénico inducido por el DEN.** A) Apariencia de los hígados de los ratones tratados con DEN y con la dieta HC o la dieta control a los 3, 5 y 8 meses. Las flechas señalan lesiones preneoplásicas a los 3 y 5 meses y tumores en los ratones de 8 meses. Escala en centímetros. B) Número de ratones con lesiones hepáticas a lo largo del tiempo de 1 a 8 meses después de la administración de la DEN.  $n = 6$  para cada tratamiento y a cada tiempo. C) Número promedio de lesiones presentadas en el hígado de cada ratón a los 3, 5 y 8 meses después de la administración de la DEN.  $n = 6$  para cada tratamiento y a cada tiempo. Las columnas representan el promedio de experimentos independientes  $\pm$  EE. Los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA seguido por una prueba de Tukey. \*,  $P < 0.05$ .

## **Los tumores que se generaron en presencia de la dieta hipercolesterolémica parecen ser más agresivos**

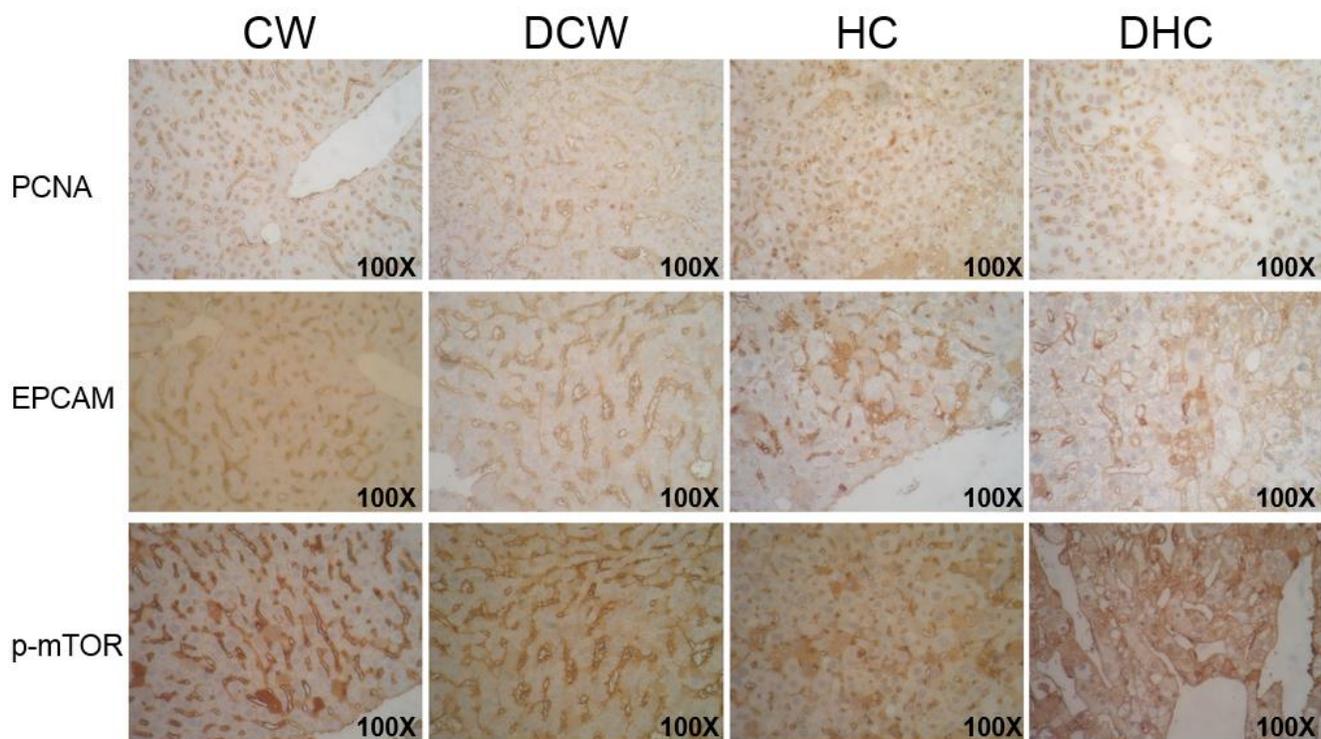
Las micrografías de las biopsias teñidas con hematoxilina eosina muestran que los tumores en los ratones DHC de 8 meses tienen una estructura trabecular y que están altamente vascularizados en comparación con los tumores de los ratones del grupo DCW de la misma edad (Fig. 7A). Las tinciones tricrómicas de las secciones hepáticas revelaron que la dieta HC genera fibrosis a los 8 meses la cual no se aprecia en las muestras CW ni DCW (Fig. 7B). En las muestras HC se pueden observar fibras de tejido conectivo que se extienden a lo largo del sinusoides hepático y rodean pequeños grupos de hepatocitos o uno sólo, lo cual es característico de la fibrosis pericelular. Las micrografías de los ratones DHC de 8 meses muestran fibrosis en puente que conecta venas portales y centrales.

Los resultados de la detección por inmunohistoquímica de marcadores de proliferación EpCAM (molécula de adhesión epitelial), PCNA (antígeno nuclear de proliferación) y p-mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos) confirman el proceso carcinogénico inducido por la dieta HC (Fig. 8). La detección inmunohistoquímica para PCNA muestra que existen más células positivas a PCNA en los tumores de los ratones DHC que en los tumores de los ratones del grupo DCW. Se aprecian más células positivas a EpCAM en la biopsia del tumor del ratón DHC; sin embargo, también la muestra del ratón alimentado con la dieta HC y sin DEN presenta células positivas a EpCAM. En la tinción para la proteína mTOR fosforilada se pueden apreciar más células positivas en el corte del tumor del ratón DHC que en las otras muestras. Todo esto indica que

los tumores de los ratones pertenecientes al grupo DHC tienen mayor proliferación que los tumores de los ratones DCW.



**Figura 6. Morfología microscópica de los tumores.** A) Tinciones con hematoxilina-eosina de las microscopías de los tumores en los ratones de 8 meses con dieta balanceada y con dieta HC. B) Tinciones tricrómicas de Masson de secciones hepáticas de ratones de 8 meses de tratamiento con dieta CW o HC y con DEN (+DEN) o sin (-DEN).



**Figura 7. El proceso carcinogénico se encuentra acelerado por la dieta hipercolesterolémica.** Tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos contra EpCAM, PCNA y p-mTOR de secciones hepáticas de muestras de ratones CW, DCW, HC, DHC tratados por 8 meses. Las muestras presentadas en éste panel de los ratones DCW y DHC corresponden a cortes de tumores.

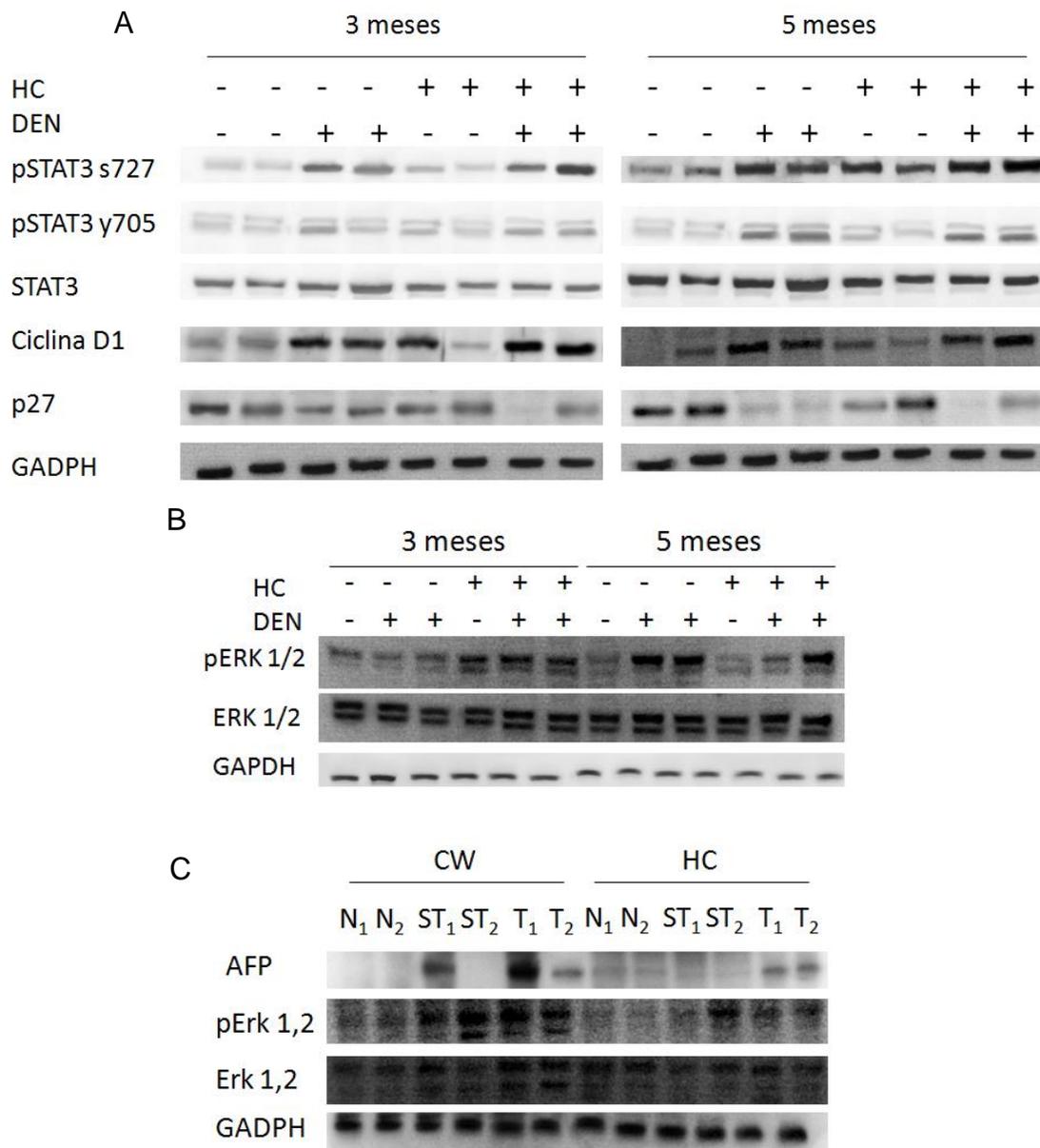
## **La dieta hipercolesterolémica promueve la proliferación de células tumorales por medio de la vía STAT3.**

El transductor y activador de señal STAT3 es un factor de transcripción que puede ser activado por citocinas y factores de crecimiento, por lo que juega un papel muy importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Wang y col., 2011). Estudios en muestras de pacientes han reportado que STAT3 se activa en el HCC y se considera un factor importante de la iniciación, el desarrollo y la progresión de este cáncer hepático (Naugler y col., 2007). Es por esto que se analizó la activación de STAT3 en este modelo de hepatocarcinogénesis.

Los resultados obtenidos en los Western blots revelan que la ruta de STAT3 se encuentra activada desde los 3 meses de tratamiento con DEN tanto en los ratones HC como en los ratones CW (Fig. 9A). A los 3 meses STAT3 se activa por medio de la fosforilación en serina 727, mientras que a tiempos más largos (5 meses) la fosforilación en tirosina 705 aumenta en los ratones tratados con DEN (Fig. 9A). La muestra de los ratones alimentados con la dieta HC por 5 meses presenta un incremento en los niveles de los niveles de STAT3 fosforilado en serina 727 (Fig. 9A).

STAT3 regula a varias proteínas que intervienen en el ciclo celular como ciclina D1 o p27. Los niveles de expresión de ciclina D1 se encuentran elevados desde los 3 meses después del tratamiento con DEN en los grupos DCW y DHC mientras que los de p27 se encuentran disminuidos, en conjunto esto es indicativo de aumento en la proliferación celular y es más notorio en los ratones 5 meses después del tratamiento con DEN en ambos grupos (Fig. 9A).

La cinasa ERK que puede fosforilar STAT3 en serina pero también puede activar otras rutas de proliferación se encuentra activada en los ratones HC a los tres meses, incluso en el ratón que no fue tratado con DEN (Fig. 9B). Sin embargo, a los 5 meses parecería que la ruta de ERK se encuentra mayormente involucrada en la progresión de los tumores de los ratones del grupo DCW que en los ratones con DHC (Fig. 9B). De igual forma, los tumores de los ratones DHC presentan menor expresión de cinasas ERK activas que los tumores de los animales control (Fig. 9C). Los tumores de los ratones de 8 meses expresan alfa-fetoproteína (AFP) lo cual es una característica de los tumores generados por la DEN (Fig. 9C).



**Figura 8. La dieta hipercolesterolémica promueve el proceso carcinogénico inducido por el DEN activando la vía de STAT3.** A y B) Western blots representativos de lisados celulares de hígados de ratones de 3 y 5 meses y C) de muestras de tumores de ratones de 8 meses. N<sub>n</sub>: ratón normal n, ST<sub>n</sub>: tejido circundante del ratón n y T<sub>n</sub>: tumor del ratón n.

## DISCUSIÓN

El HCC representa la tercera causa de mortalidad relacionada con cáncer a nivel mundial (McGlynn y London, 2011). En los últimos años se ha asociado la manifestación del HCC con factores como la obesidad y su manifestación hepática la NAFLD (Calle y col., 2003), lo cual es alarmante debido a la alta prevalencia global de esta última condición. Nuestro grupo de investigación ha comprobado que una dieta rica en colesterol genera esteatosis en tan solo dos días en ratones adultos. En México la ingesta de colesterol es mucho mayor a la recomendada (ENURBAL, 2007). Además, se ha visto que el colesterol brinda resistencia ante la quimioterapia a las células tumorales (Montero y col., 2008); sin embargo, el efecto del colesterol en el inicio y en la progresión de cáncer hepático aún se desconoce.

Diferencias entre los pesos corporales de ratones de distintos grupos de estudio son muy comunes lo que hace complicada la comparación entre el peso de los órganos. Es por esta razón que se evaluaron los cambios en el cociente del peso del hígado entre el peso corporal para evaluar el peso relativo del hígado y poder comparar entre los grupos de estudio. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el consumo de la dieta HC por 14 días aumenta significativamente el peso del hígado en ratones en crecimiento. El tratamiento con DEN no mostró cambios significativos generados por la inyección de éste agente ya que no aumenta o disminuye el peso del hígado comparado a su grupo control que consumió la misma dieta y al que se le administró únicamente SS (Fig. 1). Por lo tanto, el cambio de peso se observa únicamente por la esteatosis que genera la dieta HC de los 14 días hasta los 8 meses de tratamiento.

Al ver las micrografías de las secciones hepáticas teñidas con hematoxilina eosina de la figura 2, se confirma el aumento de peso del hígado a partir de los 14 días ya que se observa esteatosis en los hepatocitos de los ratones HC de 14 días y de 1 mes. El daño pericentral que se aprecia en las muestras de los ratones tratados con DEN es característico de las agresiones con agentes químicos debido a que es en ésta zona donde se encuentra más expresado el CYP2E1 (Jeong y col., 2000). En el grupo DCW el daño pericentral ya no es visible un mes después de la administración de la DEN mientras que en la muestra DHC del mismo tiempo sigue apreciándose. Esto sugiere un mecanismo de reparación deficiente en los ratones que tienen previamente a la administración de la DEN, una agresión con la dieta HC.

La dieta HC induce no solo la acumulación de colesterol en los hepatocitos sino también genera síntesis y almacenamiento de triglicéridos que se sintetizan para exportar el colesterol de la célula (Mari y col., 2006). Esta acumulación de lípidos genera estrés oxidante en los hepatocitos (Wei y col., 2006). Asimismo, el CYP2E1 oxida a la DEN a productos reactivos generando estrés oxidante (Kang y col., 2007). El estrés oxidante es común en las enfermedades que preceden el desarrollo de tumores hepáticos. Debido a esto es importante evaluar la respuesta antioxidante del hígado frente a la agresión con DEN y con la dieta HC.

La enzima antioxidante que se evaluó en este estudio fue la SOD1 debido a que varios estudios han mostrado que existe una relación entre niveles bajos de SOD1 y la severidad del HCC (Casaril y col., 1994; Liaw y col., 1997). Los resultados de esta tesis (Fig. 3A) muestran que la respuesta inicial del hígado frente a la agresión

con DEN, con la dieta HC o ambos es incrementar los niveles de la SOD1 para contrarrestar el estrés oxidante; sin embargo, a los 14 días y al mes de tratamiento los niveles de SOD bajan a tal punto que se vuelven inferiores en las muestras tratadas con respecto al control CW. La muestra DHC es la que presenta niveles más bajos de SOD1 tanto a los 14 días como al mes de tratamiento lo cual sugiere que los ratones inyectados con la DEN y tratados con dieta HC son más susceptibles a desarrollar un cáncer más severo que los ratones del grupo DCW.

La vía de señalización de ERK participa en procesos celulares como la proliferación, la sobrevivencia, la diferenciación y la motilidad. Esta vía se encuentra frecuentemente sobreactivada en tumores humanos (Kohn y Pouyssegur, 2006). Se ha reportado que en el HCC humano la activación aberrante de ésta vía se relaciona con un fenotipo maligno (Chen y col., 2011), por lo que resultó interesante investigar si esta vía se encuentra involucrada en el proceso carcinogénico de este modelo. A tiempos cortos es comprensible que la fosforilación de ERK se abroge ya que el hígado sigue dañado por las ROS generadas por la biotransformación de la DEN y necesita repararse antes de proliferar.

Se sabe que la cantidad de AgNORs es mayor en las neoplasias que en los tejidos benignos que les corresponden (Derenzini y col., 1993) debido a que la cantidad de AgNORs en la interfase es indicativa de proliferación, por lo que a mayor número de AgNORs haya en el núcleo de una célula durante la interfase, mayor será la proliferación celular (Derenzini y col., 1990). Durante la interfase el volumen del núcleo celular se duplica (Maeshima y col., 2011). Los núcleos de mayor tamaño y con mayor número de AgNORs se encontraron en la muestra DHC (Fig. 5). Los

resultados de las biopsias teñidas con plata muestran que desde los tres meses de tratamiento con DEN y con dieta HC hay mayor proliferación que en los demás grupos del mismo tiempo. Se ha reportado que una cantidad alta de AgNORs en los hepatocitos se asocia a una mayor incidencia de HCC (Derenzini y col., 1993). Por lo que estos resultados sugieren que los ratones HC tienen una mayor predisposición a generar HCC en presencia de un carcinógeno, en este caso DEN. La DEN es un carcinógeno reconocido por generar lesiones en roedores que mimetizan los diferentes tipos de tumores hepáticos en humanos (Park y col., 2009). Dependiendo de la dosis a la que se administre se puede controlar la enfermedad hepática generada. La dosis de 10 mg/kg de peso induce únicamente la iniciación de la carcinogénesis (Kim y col., 2005); sin embargo, dosis mayores a 25-30 mg/kg de peso llevan a la promoción y progresión del cáncer hepático (Verna y col., 1996). Para realizar esta tesis se administró a los ratones una única dosis de 10 mg/kg de peso a los ratones infantiles. Esto se hizo para inducir la carcinogénesis y evaluar los efectos de la dieta HC en la promoción y progresión del cáncer hepático.

Los resultados encontrados muestran que la dieta HC incrementa la susceptibilidad a la hepatocarcinogénesis inducida por la DEN. En los ratones alimentados con la dieta HC los tumores se desarrollaron antes y fueron más grandes (Fig. 6A). El 80% de los ratones del grupo DHC desarrollo lesiones hepáticas a los 3 meses mientras que en el grupo DCW ningún ratón presentaba lesiones macroscópicas. A los 5 meses todos los ratones del grupo DHC presentaban nódulos (Fig. 6B). Esto sugiere que la dieta hipercolesterolémica acelera el proceso carcinogénico. El

número de neoplasias promedio por ratón visibles a simple vista fue significativamente diferente a los 5 meses entre el grupo DCW y DHC pero no a los 8 meses (Fig. 6C). Esto se debe a que los nódulos que se aprecian en los hígados a los 5 meses continúan proliferando y se unen para formar grandes tumores a los 8 meses de tratamiento.

La angiogénesis hepática patológica genera capilarización en los sinusoides hepáticos provocando su distorsión. Ésta capilarización sinusoidal es un proceso angiogénico que es común en el HCC (Yang and Poon 2008). La presencia de vasos sanguíneos más grandes en los tumores de los ratones que se alimentaron con la dieta HC (Fig. 7A) es índice de transformación maligna del tejido tumoral ya que la angiogénesis es imprescindible para el crecimiento invasivo tumoral y la diseminación de un cáncer, o metástasis. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor sólido determinado, entrar en un vaso sanguíneo, y trasladarse a un sitio distante, donde pueden implantarse y comenzar el crecimiento de un tumor secundario o metástasis. Como respuesta al daño crónico originado por la alta ingesta de colesterol durante 8 meses se genera fibrosis hepática. Éste es uno de los escenarios que no se ven en los ratones tratados solamente con DEN (Fig. 7B) y podría darle ventajas proliferativas a los tumores de los ratones HC y brindarles sostén estructural. La fibrosis puede activar proteínas proliferativas como el factor de crecimiento del tejido conectivo que promueve crecimiento de tumores, angiogénesis, migración e invasión (De Minicis y col., 2013). La fibrosis en puente que presentan los tumores de los ratones DHC va de la mano con la

generación de vasos sanguíneos que se aprecian en los septos de tejido conectivo (Paternostro y col., 2010).

Para determinar la actividad proliferativa en las muestras de 8 meses se realizaron tinciones inmunohistoquímicas para PCNA, el cual es una proteína nuclear que se sintetiza durante la fase G1 temprana y la fase S del ciclo celular. Sirve como cofactor para a ADN polimerasa delta en la fase S del ciclo celular y se encuentra involucrada en la reparación del ADN durante su síntesis (Gramantieri y col., 2003). Es este patrón temporal de su expresión que lo hace una muy buena herramienta para estudiar la proliferación celular ya que se expresa únicamente en células que se dividen. El PCNA se empieza a acumular en la fase G1, alcanza su nivel de mayor abundancia durante la fase S y disminuye durante G2/M (Tan y col., 1987). Los datos obtenidos muestran que existe mayor proliferación en las muestras de tumores de los ratones DHC (Fig. 8).

Para que las neoplasias inicien y proliferen se necesita una fracción de células con alto potencial de crecimiento que se llaman células madres cancerosas. Para identificar la presencia de estas células son necesarios marcadores de superficie que las discriminen de las otras. Estudios recientes han encontrado que el marcador EpCAM es de alta utilidad para la identificación de poblaciones de células con alta capacidad tumoral. En el hígado las células que expresan EpCAM son las células ovasales o las que recién derivadas de ellas (Yoon y col., 2011). Se ha demostrado que las células que expresan EpCAM en los tumores eventualmente dejan de expresarlo probablemente debido a la diferenciación celular (Kimura y col., 2010). Nuestros resultados muestran que las biopsias de los ratones alimentados

con dieta HC, tanto con DEN como sin él, muestran células positivas a EpCAM. En la muestra del tumor perteneciente a un ratón DCW no se aprecian células positivas a EpCAM. Existe un estudio que muestra que las líneas celulares de cáncer hepático que expresan EpCAM tienen más propiedades formadoras de tumores que las que no lo expresan (Kimura y col., 2010). Esto podría sugerir que los tumores de los ratones DHC son más agresivos que los tumores de los ratones DCW.

La cinasa mTOR juega un papel central en la regulación del crecimiento, de la proliferación y la sobrevivencia celular dependiendo del estado nutricional y energético de la célula (Kudo, 2011). El anticuerpo para mTOR fosforilado utilizado para las tinciones inmunohistoquímicas es específico para la fosforilación de mTOR en SER-2448. Esta fosforilación se lleva a cabo por la vía PI3K/AKT (Altomare y col., 2004). La vía PI3K/AKT/mTOR se encuentra frecuentemente alterada en el cáncer hepático debido a su papel central en la regulación de la proliferación, migración, sobrevivencia celular y angiogénesis (Engelman, 2009). Los resultados muestran que la biopsia del tumor DHC presentaba más células positivas a mTOR fosforilado que las demás muestras corroborando que existe más proliferación en ésta muestra.

Una de las rutas que se encuentra activada en el proceso carcinogénico tanto de los ratones DCW como de los DHC es la ruta de STAT3 (Fig. 9A). La activación inapropiada de la ruta de STAT3 ocurre en varios tipos de cáncer incluyendo en el HCC (Yu, 2009). La fosforilación de STAT3 en la tirosina 705 (Y705) resulta en la formación de un dímero que se une al DNA e induce la expresión de genes

específicos. STAT3 también puede activarse por mecanismos independientes de la fosforilación en Y705. La fosforilación en serina 727 (S727) maximiza la actividad transcripcional de STAT3 (Miyakoshi, 2012). Se ha encontrado que en tiempos tempranos después del tratamiento con DEN la fosforilación por la cual se lleva a cabo la activación de STAT3 es la de S727 y a tiempos más largos la que participa es la de Y705 (Miyakoshi y col., 2012) por lo que nuestros datos concuerdan con eso tanto en los ratones DCW como en los DHC. Los ratones HC de 5 meses de dieta presentaron niveles altos de STAT3 S727 además las muestras de 8 meses muestran células positivas a EpCAM, esto indica que la dieta HC por si sola induce proliferación celular.

Existen varios estudios que indican que existen varias alteraciones en los reguladores del ciclo celular que se pueden observar en el HCC. La sobreexpresión de ciclina D1 ha sido reportada en varios tumores humanos y se ha señalado que su activación es un evento que ocurre en la hepatocarcinogénesis temprana y que juega un papel importante en la diferenciación del tumor (Joo y col., 2001). La proteína p27 posee la habilidad de unirse e inhibir los complejos ciclina/CDK llevando a un arresto en la fase G1 del ciclo celular. La disminución en la expresión de p27 se han implicado en la génesis y progresión del HCC (Guo y col., 2013). Tanto en los ratones de 5 meses y de 8 meses la expresión de las cinasas ERK se ve más elevada en las muestra de los ratones del grupo DCW que en los ratones DHC, lo cual sugiere que en los ratones DHC ERK no es la única que fosforila a STAT3 en serina 727. Terapias contra el HCC enfocadas a inhibir esa ruta, como el sorafenib (Abdel-Rahman and Fouad 2014), podrían no ser efectivas para el

tratamiento del HCC en hígado con esteatosis. Una de las proteínas que puede estar compensando la falta de la cinasa ERK es mTOR debido a que esta proteína se encuentra en su forma activa particularmente en los tumores de los ratones DHC.

## CONCLUSIÓN

En nuestro laboratorio hemos probado que la dieta hipercolesterolémica produce estrés oxidante en los hepatocitos debido a la acumulación de lípidos. Los datos mostrados en el presente trabajo revelan que el consumo constante y prolongado de la dieta hipercolesterolémica promueve la enfermedad hepática generando fibrosis.

Se sabe que el colesterol brinda resistencia ante la quimioterapia a células de HCC, sin embargo, no se ha estudiado el efecto del alto consumo de colesterol en la progresión del cáncer hepático. Los resultados de esta tesis dejan claro que el daño constante que recibe el hígado por una alimentación con alto nivel de colesterol acelera y promueve el efecto carcinogénico inducido por la N-dietilnitrosamina.

Las vías de señalización que se analizaron en este trabajo y que parecen jugar un papel importante en el desarrollo del cáncer hepático cuando hay una dieta rica en colesterol son las rutas de STAT3 y de mTOR las cuales son comunes en tumores agresivos y con mal pronóstico.

A pesar de que se evaluó de manera muy general el efecto de la dieta hipercolesterolémica sobre la progresión del cáncer hepático, los resultados obtenidos permiten poner las pautas sobre las rutas de señalización que participan en el proceso carcinogénico y los tiempos de tratamiento con dieta hipercolesterolémica para futuras investigaciones.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdelmalek, M. F. y A. M. Diehl (2007). "Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance." Med Clin North Am **91**(6): 1125-1149.

Abdel-Rahman O, Fouad M. 2014. Sorafenib-based combination as a first line treatment for advanced hepatocellular carcinoma: A systematic review of the literature. Crit Rev Oncol Hematol **24**(2): 94-97.

Altomare, D. A., H. Q. Wang, K. L. Skele, A. De Rienzo, A. J. Klein-Szanto, A. K. Godwin y J. R. Testa (2004). "AKT y mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth." Oncogene **23**(34): 5853-5857.

Ascha, M. S., I. A. Hanouneh, R. Lopez, T. A. Tamimi, A. F. Feldstein y N. N. Zein (2010). "The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **51**(6): 1972-1978.

Baffy, G., E. M. Brunt y S. H. Caldwell (2012). "Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace." J Hepatol **56**(6): 1384-1391.

Blonski, W., D. S. Kotlyar y K. A. Forde (2010). "Non-viral causes of hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **16**(29): 3603-3615.

Calle, E. E., C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond y M. J. Thun (2003). "Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults." N Engl J Med **348**(17): 1625-1638.

Casari, M., F. Corso, A. Bassi, F. Capra, G. B. Gabrielli, A. M. Stanzial, N. Nicoli y R. Corrocher (1994). "Decreased activity of scavenger enzymes in human hepatocellular carcinoma, but not in liver metastases." Int J Clin Lab Res **24**(2): 94-97.

Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Wang YL, Dai GH. 2011. Expression and prognostic role of pan-Ras, Raf-1, pMEK1 and pERK1/2 in patients with hepatocellular carcinoma. Eur J Surg Oncol **37**: 513-20

De Minicis, S., C. Rychlicki, L. Agostinelli, S. Saccomanno, C. Candelaresi, L. Trozzi, E. Mingarelli, B.

Facinelli, G. Magi, C. Palmieri, M. Marzoni, A. Benedetti and G. Svegliati-Baroni (2013). "Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury." Hepatology.

Derenzini, M., A. Pession y D. Trere (1990). "Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells." Lab Invest **63**(1): 137-140.

Derenzini, M. y D. Trere (1994). "AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation." Zentralbl Pathol **140**(1): 7-10.

Derenzini, M., D. Trere, F. Oliveri, E. David, P. Colombatto, F. Bonino y M. R. Brunetto (1993). "Is high AgNOR quantity in hepatocytes associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in chronic liver disease?" J Clin Pathol **46**(8): 727-729.

Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." Nat Rev Cancer **9**(8): 550-562.

Encuesta urbana de alimentación y nutrición (Enurbal). México 2007

Eriksson, S., K. F. Eriksson y L. Bondesson (1986). "Nonalcoholic steatohepatitis in obesity: a reversible condition." Acta Med Scand **220**(1): 83-88.

Fabregat, I., C. Roncero y M. Fernandez (2007). "Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer." Liver Int **27**(2): 155-162.

Farazi, P. A. y R. A. DePinho (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." Nat Rev Cancer **6**(9): 674-687.

Farber, J. L. y R. J. Gerson (1984). "Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals." Pharmacol Rev **36**(2 Suppl): 71s-75s.

Fausto, N. y J. S. Campbell (2010). "Mouse models of hepatocellular carcinoma." Semin Liver Dis **30**(1): 87-98.

Gramantieri, L., D. Trere, P. Chieco, M. Lacchini, C. Giovannini, F. Piscaglia, A. Cavallari y L. Bolondi (2003). "In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair." J Hepatol **39**(6): 997-1003.

Guo, J., Q. Ma, X. Zhou, P. Fan, T. Shan y D. Miao (2013). "Inactivation of p27kip1 promotes chemical hepatocarcinogenesis through enhancing inflammatory cytokine secretion and STAT3 signaling activation." J Cell Physiol **228**(10): 1967-1976.

Haslam, D. W. y W. P. James (2005). "Obesity." Lancet **366**(9492): 1197-1209.

- Jeong, K.-S., Y. Soh, J. Jeng, M. R. Felder, J. P. Hardwick y B. J. Song (2000). "Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)-Dependent Production of a 37-kDa Acetaldehyde-Protein Adduct in the Rat Liver." Archives of Biochemistry and Biophysics **384**(1): 81-87.
- Joo, M., Y. K. Kang, M. R. Kim, H. K. Lee y J. J. Jang (2001). "Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma." Liver **21**(2): 89-95.
- Kang, J. S., H. Wanibuchi, K. Morimura, F. J. Gonzalez y S. Fukushima (2007). "Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo." Cancer Res **67**(23): 11141-11146.
- Kim, M. R., H. S. Kim, M. S. Lee, M. J. Lee y J. J. Jang (2005). "Cell cycle protein profile of the hepatic stellate cells(HSCs)in dimethylnitrosamine-induced rat hepatic fibrosis." Exp Mol Med **37**(4): 335-342.
- Kimura, O., T. Takahashi, N. Ishii, Y. Inoue, Y. Ueno, T. Kogure, K. Fukushima, M. Shiina, Y. Yamagiwa, Y. Kondo, J. Inoue, E. Kakazu, T. Iwasaki, N. Kawagishi, T. Shimosegawa y K. Sugamura (2010). "Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines." Cancer Sci **101**(10): 2145-2155.
- Kohno, M. y J. Pouyssegur (2006). "Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy." Ann Med **38**(3): 200-211.
- Kudo, M. (2011). "mTOR inhibitor for the treatment of hepatocellular carcinoma." Dig Dis **29**(3): 310-315.
- Lazo, M. y J. M. Clark (2008). "The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective." Semin Liver Dis **28**(4): 339-350.
- Liaw, K. Y., P. H. Lee, F. C. Wu, J. S. Tsai y S. Y. Lin-Shiau (1997). "Zinc, copper, and superoxide dismutase in hepatocellular carcinoma." Am J Gastroenterol **92**(12): 2260-2263.
- Maeshima, K., H. Iino, S. Hihara y N. Imamoto (2011). "Nuclear size, nuclear pore number and cell cycle." Nucleus **2**(2): 113-118.
- Mari, M., F. Caballero, A. Colell, A. Morales, J. Caballeria, A. Fernandez, C. Enrich, J. C. Fernandez-Checa y C. Garcia-Ruiz (2006). "Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis." Cell Metab **4**(3): 185-198.
- McGlynn, K. A. y W. T. London (2011). "The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future." Clin Liver Dis **15**(2): 223-243, vii-x.

- Menendez, J. A. y R. Lupu (2007). "Fatty acid synthase y the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis." Nat Rev Cancer **7**(10): 763-777.
- Miyakoshi, M., M. Yamamoto, H. Tanaka y K. Ogawa (2012). "Serine 727 phosphorylation of STAT3: An early change in mouse hepatocarcinogenesis induced by neonatal treatment with diethylnitrosamine." Mol Carcinog.
- Moller, H., A. Møllegaard, K. Lindvig y J. H. Olsen (1994). "Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study." Eur J Cancer **30a**(3): 344-350.
- Montero, J., A. Morales, L. Llacuna, J. M. Lluís, O. Terrones, G. Basanez, B. Antonsson, J. Prieto, C. Garcia-Ruiz, A. Colell y J. C. Fernandez-Checa (2008). "Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma." Cancer Res **68**(13): 5246-5256.
- Naugler, W. E., T. Sakurai, S. Kim, S. Maeda, K. Kim, A. M. Elsharkawy y M. Karin (2007). "Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production." Science **317**(5834): 121-124.
- Park, D. H., J. W. Shin, S. K. Park, J. N. Seo, L. Li, J. J. Jang y M. J. Lee (2009). "Diethylnitrosamine (DEN) induces irreversible hepatocellular carcinogenesis through overexpression of G1/S-phase regulatory proteins in rat." Toxicol Lett **191**(2-3): 321-326.
- Park, E. J., J. H. Lee, G. Y. Yu, G. He, S. R. Ali, R. G. Holzer, C. H. Osterreicher, H. Takahashi y M. Karin (2010). "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression." Cell **140**(2): 197-208.
- Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. 2010. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. World J Gastroenterol **16**: 281-8.
- Powell, E. E., J. R. Jonsson y A. D. Clouston (2005). "Steatosis: Co-factor in other liver diseases." Hepatology **42**(1): 5-13.
- Rafiq, N., C. Bai, Y. Fang, M. Srishord, A. McCullough, T. Gramlich y Z. M. Younossi (2009). "Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver." Clin Gastroenterol Hepatol **7**(2): 234-238.
- Regimbeau, J. M., M. Colombat, P. Mognol, F. Durand, E. Abdalla, C. Degott, F. Degos, O. Farges y J. Belghiti (2004). "Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma." Liver Transpl **10**(2 Suppl 1): S69-73.

- Rocchini, A. P. (2002). "Childhood obesity and a diabetes epidemic." N Engl J Med **346**(11): 854-855.
- Schulze-Bergkamen, H., D. Brenner, A. Krueger, D. Suess, S. C. Fas, C. R. Frey, A. Dax, D. Zink, P. Buchler, M. Muller y P. H. Kramer (2004). "Hepatocyte growth factor induces Mcl-1 in primary human hepatocytes and inhibits CD95-mediated apoptosis via Akt." Hepatology **39**(3): 645-654.
- Starley, B. Q., C. J. Calcagno y S. A. Harrison (2010). "Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection." Hepatology **51**(5): 1820-1832.
- Stickel, F. y C. Hellerbrand (2010). "Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for hepatocellular carcinoma: mechanisms and implications." Gut **59**(10): 1303-1307.
- Sun, B. y M. Karin (2012). "Obesity, inflammation, and liver cancer." J Hepatol **56**(3): 704-713.
- Tan, C. K., K. Sullivan, X. Y. Li, E. M. Tan, K. M. Downey y A. G. So (1987). "Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA polymerase delta." Nucleic Acids Res **15**(22): 9299-9308.
- Tokushige, K., E. Hashimoto, S. Yatsuji, M. Tobar, M. Tani, N. Torii y K. Shiratori (2010). "Prospective study of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis in comparison with hepatocellular carcinoma caused by chronic hepatitis C." J Gastroenterol **45**(9): 960-967.
- Tsuboi, Y., T. Ichida, S. Sugitani, T. Genda, J. Inayoshi, M. Takamura, Y. Matsuda, M. Nomoto y Y. Aoyagi (2004). "Overexpression of extracellular signal-regulated protein kinase and its correlation with proliferation in human hepatocellular carcinoma." Liver Int **24**(5): 432-436.
- Unger, R. H., G. O. Clark, P. E. Scherer y L. Orci (2010). "Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome." Biochim Biophys Acta **1801**(3): 209-214.
- Uribe M., G. M., Chávez N., Román J. (2010). "Carcinoma hepatocelular." Revista de gastroenterología de México **75**(2): 168-176.
- Venook, A. P., C. Papandreou, J. Furuse y L. L. de Guevara (2010). "The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective." Oncologist **15** Suppl 4: 5-13.
- Verna, L., J. Whysner y G. M. Williams (1996). "N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation." Pharmacol Ther **71**(1-2): 57-81.

Vesselinovitch, S. D., M. Koka, N. Mihailovich y K. V. N. Rao (1984). "Carcinogenicity of diethylnitrosamine in newborn, infant, and adult mice." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **108**(1): 60-65.

Wang, H., F. Lafdil, X. Kong y B. Gao (2011). "Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target." Int J Biol Sci **7**(5): 536-550.

Wei, Y., D. Wang, F. Topczewski y M. J. Pagliassotti (2006). "Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(2): E275-281.

Yang ZF, Poon RTP. 2008. Vascular Changes in Hepatocellular Carcinoma. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology **291**: 721-34

Yoon SM, Gerasimidou D, Kuwahara R, Hytioglou P, Yoo JE, Park YN, Theise ND. 2011. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* **53**: 964-73.

Yoshida, T., T. Hisamoto, J. Akiba, H. Koga, K. Nakamura, Y. Tokunaga, S. Hanada, H. Kumemura, M. Maeyama, M. Harada, H. Ogata, H. Yano, M. Kojiro, T. Ueno, A. Yoshimura y M. Sata (2006). "Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors." Oncogene **25**(45): 6056-6066.