



**“La sobrecarga de colesterol en el hígado induce el daño oxidante al ADN  
y acelera la hepatocarcinogénesis”**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Presenta**

**Mtra. Biol. Exp Gloria Cristina Enríquez Cortina**

**Co directores de tesis:**

**Dra. Leticia Bucio Ortiz**

**Dr. Diego Fernando Calvisi**

**Asesora:**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz**

**Diciembre del 2017**



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00097

Matrícula: 2133801753

LA SOBRECARGA DE COLESTEROL EN EL HIGADO INDUCE DAÑO OXIDANTE AL ADN Y ACELERA LA HEPATOCARCINOGENESIS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de diciembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ROGELIO HERNANDEZ PANDO  
DR. CARLOS PEREZ PLASCENCIA  
DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA  
DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: GLORIA CRISTINA ENRIQUEZ CORTINA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar


Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.





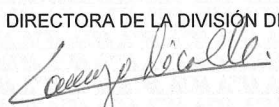
GLORIA CRISTINA ENRIQUEZ CORTINA  
ALUMNA

REVISÓ



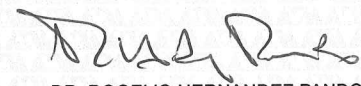
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



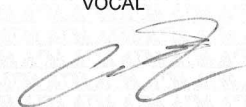
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



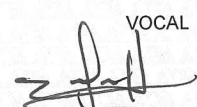
DR. ROGELIO HERNANDEZ PANDO

VOCAL



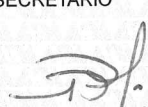
DR. CARLOS PEREZ PLASCENCIA

VOCAL



DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA

SECRETARIO



DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

**CO-DIRECTORES:**

**Dra. Leticia Bucio Ortiz.**

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana.

CDMX.

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

**Dr. Diego Fernando Calvisi**

University of Greifswald

Institute of Pathology

Greifswald, Germany

[dcalvisi@uni-greifswald.de](mailto:dcalvisi@uni-greifswald.de)

**ASESORA:**

**Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.**

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana.

CDMX.

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

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. Leticia Bucio Ortiz.

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

El proyecto fue apoyado por CONACyt en el fondo Fronteras de la Ciencia #1320, otorgado al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, contó con apoyo de SEP-PRODEP 913026–14612111. Agradezco la beca otorgada por CONACyt durante el periodo de duración del programa de Doctorado.



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: “**La sobrecarga de colesterol en el hígado agrava el daño oxidante al ADN y acelera la hepatocarcinogénesis**”, con fecha de examen 06 de Diciembre de 2017.

### **MIEMBROS DEL JURADO**

---

**PRESIDENTE**

**Dr. Rogelio Hernández Pando**  
**Patología Experimental**  
**INCMSZ**

---

**SECRETARIO**

**Dr. Pedro G. Damián Matzumura**  
**Biología de la reproducción**  
**UAM-Iztapalapa**

---

**VOCAL**

**Dra. Nadia J. Jacobo Herrera**  
**Bioquímica**  
**INCMSZ**

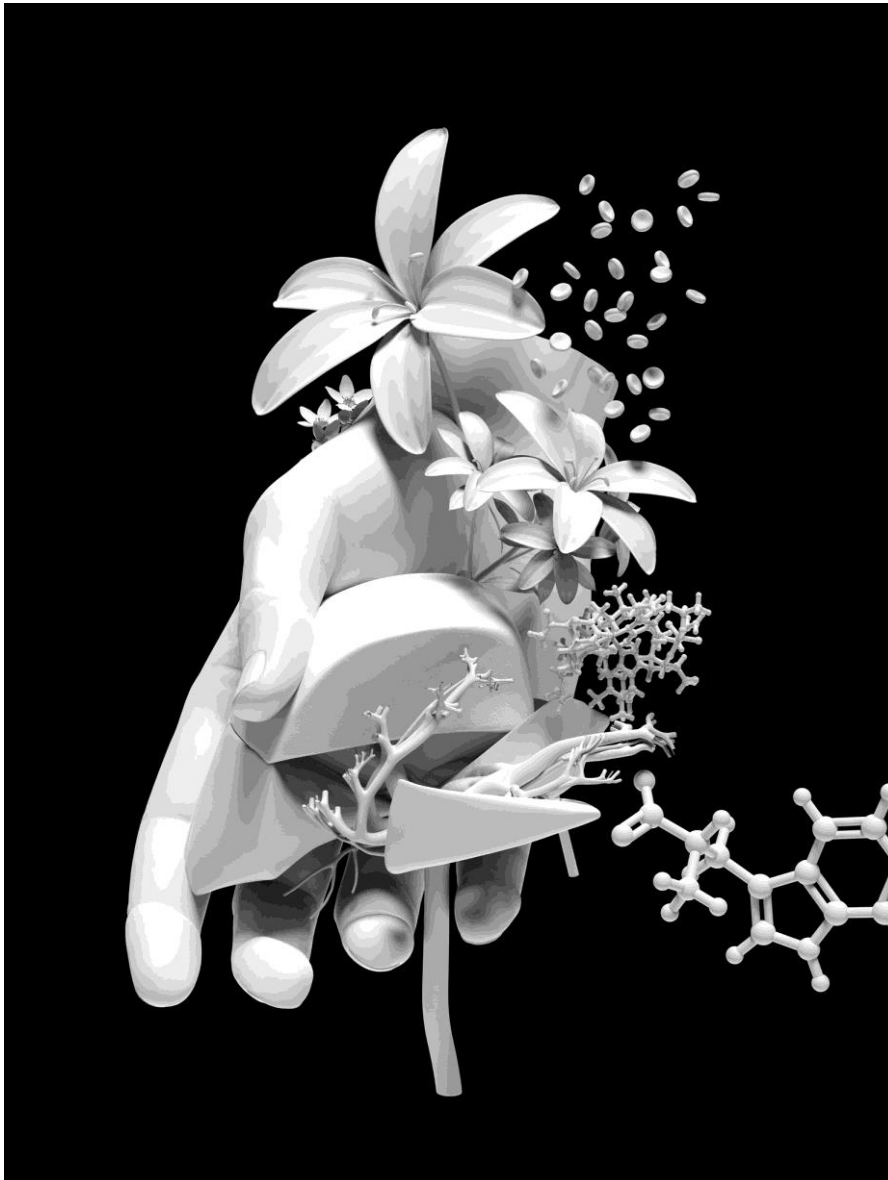
---

**VOCAL**

**Dr. Carlos Pérez Plascencia**  
**Universidad de Biomedicina**  
**UNAM**

*Las verdades de la naturaleza son de una belleza que  
Inspira amor y veneración, y se nos ofrecen  
Tanto más bellas cuanto más penetramos  
En sus detalles y particularidades.*

-KONRAD LORENZ-



## Agradecimientos

A mis padres:  
Francisco Enríquez Lizaola (1941-2015)  
Gloria Cortina Herrera *presente*

Hoy se cierra una etapa de mi vida, que inicié el 19 de septiembre de 1999, cuando entré por primera vez a la UAM-I. Entonces tenía 19 años. Estudiar biología experimental fue una suerte de casualidad, que hoy agradezco.

Turbulentamente y en tiempos desfasados terminé la licenciatura. En los últimos trimestres fue que conocí al Dr. Luis, en clase de biología molecular. Lo que también agradezco, pues fue él con quien me acerqué por primera vez a la ciencia y quizá por el que no la dejé durante estos años. En el laboratorio de Fisiología celular, también conocí a la Dra. Conchita, a la Dra. Lety y a la Dra. Vero. Dra. Conchita le agradezco infinitamente todas sus enseñanzas, su paciencia, pero sobre todo, por su ayuda, orientación y más paciencia, durante uno de los periodos más tristes de mi vida: la muerte de mi padre. Agradezco que ese tiempo lo haya pasado cerca de ustedes, pues fue más sencillo afrontar lo inevitable.

Agradezco infinitamente a mi padre, el Dr. Francisco Enríquez, que me hizo una persona crítica, que me orientó a la literatura y a la ciencia desde que era una niña. Cuando en los viajes a Jalisco que empezaban de madrugada, nos despertaba apenas salía el sol con la frase distintiva: “despiértense, se están perdiendo el paisaje”. Entonces, nos contaba anécdotas en las que describía toda clase de árboles y animales de la región por la que pasábamos. Mi papá encendió mi imaginación y mi amor por todo lo vivo. Me duele profundamente que el día de hoy no esté aquí, pues estoy segura que estaría feliz y daría un discurso mucho más elocuente de lo que yo puedo escribir. Hasta pronto papá. Ojalá estés disfrutando este momento tanto como nosotros.

Y a pesar de esta pérdida tan grande, no puedo más que volver a sentirme afotuanda, por la vida de mi madre. Que ha sido el pilar maravilloso, inquebrantable y cálido bajo el que todavía hoy, mis hijos se sienten protegidos. Gracias por mi hermana, gracias por unir nuestra familia, gracias por ser tan paciente, gracias por amarnos tanto y por estar a nuestro lado cuando te necesitamos. Te extraño mucho.

Afortunada también por que soy una mujer plena y feliz. Por que encontré a mi mejor amigo, sentado del lado derecho de la orquesta. Mi esposo, Sergio. Gracias por ser mi centro, por tu forma de ser. No sabes amor todo lo que tu vida significa para mí. Me das paz, me das confianza, comprensión y paciencia. Eres más que un compañero de vida y quiero que sepas que este tiempo sin ti, simplemente no hubiera sido posible. Te adoro esposo.

Espero que en unos años, mis hijos Ronnie y Eduardo, puedan ya leer estas líneas, por que les quiero decir, que son lo más hermoso que me ha pasado en la vida, los adoro. Ronnie, gracias por tus ocurrencias, eres maravilloso y estoy orgullosa de todo lo que has logrado. Gracias por el amor que le tienes a tu hermano. Gracias por quererme incondicionalmente. Acuérdate siempre que te amo y que siempre voy a buscar tu bienestar hijo.

Gracias Eduardo, estoy terriblemente enamorada de ti hijo. Eres un tesoro. Tu sonrisa, tus bailes y tus cantos han sido mi motor para seguir, aunque la vida se torne complicada.

Gracias a mi nueva familia “Los Ruiz”. No saben de verdad lo bien que me la paso con ustedes. Me encanta ver a mis hijos con sus abuelos Amalia y Lorenzo. Gracias cuñadas, Amalia, Angélica, Cristina, ¿qué haría sin ustedes?.

Agradecida estoy también por que me llevo grandes amig@s. Natalia, Paty, Mayra, Óscar, Ileana. Me han dado mucho. Su tiempo, su conocimiento y estoy segura de que, aunque nuestros caminos se diversifiquen, siempre tendrán un espacio en mi corazón.

“Si eres afortunado, una fantasía solitaria puede transformar totalmente un  
millón de realidades”  
Maya Angelou

## **RESUMEN**

El cáncer hepático es la 3er causa de muerte a nivel mundial. La etiología de esta enfermedad es diversa, entre las que destacan, las infecciones virales por el virus de la hepatitis B y C, la infección por la aflatoxina B1 tras la ingestión de cereales contaminados por el hongo *Aspergillus flavus*. Además, el incremento la ingesta de lípidos en varios países alrededor del mundo, induce la acumulación de este lípido en el hígado, lo que genera hígado graso no alcohólico (NALD), que a pesar de ser una condición reversible, puede generar inflamación en el órgano, a lo que se le conoce como esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La presencia constante de citosinas pro-inflamatorias se ha relacionado con la evolución de la NASH hacia el desarrollo del hepatocarcinoma (HCC), el principal cáncer hepático primario. Mediante diversos modelos experimentales, se ha llegado a la conclusión de dependiendo de la naturaleza del lípido, será la respuesta fisiología. Por ello los efectos de la sobrecarga de colesterol, han sido ampliamente investigados mediante el uso de diversos modelos experimentales, con el fin de entender su posible participación en el desarrollo del cáncer hepático. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual el colesterol pudiera participar como un co-carcinógeno todavía no es dilucidada. En México, desde hace más de una década, la obesidad ha ido en aumento, afectando con mayor proporción a jóvenes y niños. Interesantemente, el número de casos nuevo de HCC parecen incrementar con la misma tendencia, sugiriendo una relación estrecha entre los efectos de la obesidad en el hígado con el desarrollo de HCC , lo que representa un problema de salud realmente grave, es por ello que es urgente entender los efectos directos de la sobrecarga hepática de colesterol sobre la hepatocarcinogénesis, así como la identificación

de blancos terapéuticos que permitan un diagnóstico temprano y un efectivo para que disminuya la mortalidad causada por esta patología. Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar cambios fisiológicos, celulares y moleculares en el hígado, bajo un modelo de carcinogénesis inducida paralelo al consumo crónico de una dieta hipercolesterolémica. Para lograr este objetivo, ratones machos neonatos (14 días de edad) de la cepa C57BL/6, fueron o no tratados con una dosis única de N-dietilnitrosamina (DEN, 10 $\mu$ g/g, i.p) por diferentes tiempos y se alimentaron o no con una dieta hipercolesterolémica (HC, 2% colesterol, 0.5% colato de sodio) que se ofreció *at libitum*. Los resultados demostraron que el daño hepático se incrementó en los ratones tratados con la DEN y la dieta HC, con respecto a los animales que sólo se trataron con la DEN, por un periodo de 7 días. La sobre generación de ROS acompañada de una drástica disminución de las enzimas de respuesta antioxidante y detoxificación hepática, fueron las causantes del daño observado. Las ROS inducidas por la DEN y potenciadas por la dieta HC, promovieron la oxidación de lípidos y daño oxidante al ADN. Estos efectos fueron revertidos exitosamente a través de la suplementación la N-acetilcisteína (NAC) por 7 días ya que disminuyó la presencia de ROS, la oxidación lipídica y el daño oxidante al ADN. La NAC es un potente antioxidante ya que permite el restablecimiento del “pool” de glutatión reducido, necesario ante un ambiente celular oxidante, por lo que este resultado, sugiere fuertemente que el mecanismo por el cual, el colesterol potencia el daño inducido por la DEN en el hígado, es la sobre generación de ROS. Tras la respuesta hepática aguda observada, inducida por el carcinógeno y la sobrecarga de colesterol, disminuyó tras 14 días de iniciados los tratamientos, sugiriendo una respuesta hormética del hígado ante ambas agresiones.

Sin embargo, la sobrecarga de colesterol disminuyó la actividad de las principales proteínas involucradas en la reparación del daño al ADN, lo que representa el primer paso hacia la carcinogénesis. Consecuentemente, luego de 3 meses de iniciados los tratamientos, se observó transformación celular determinada por parámetros histológicos como, núcleos gigantes, incremento de la actividad metabólica, mayor número de nucléolos e incremento mitogénico en hígados de animales tratados con DEN y HC.

Finalmente tras 5 y 8 meses de tratamiento, en la fase de progresión tumoral, se observó que la incidencia de tumores, el tamaño y el fenotipo agresivo, fue mayor en los animales tratados con la DEN y la dieta HC, en comparación con los inducidos solo por el carcinógeno, lo que podría ser resultado de la sobreexpresión de Bcl-2 con respecto a BAX, observada durante la fase de respuesta aguda. La caracterización molecular de los tumores resultantes del DEN y la dieta HC, mostró expresión incrementada del factor de transcripción STAT3 con respecto a los tumores inducidos sólo por el carcinógeno y la expresión diferencial de Mcl-1, siendo detectable solamente en los tumores inducidos por la DEN y la dieta HC.

Para determinar la participación del colato de sodio presente en la dieta (0.5%) en los procesos observados se utilizaron dos dietas control, una que solamente contenía colesterol (2%) y otra que solamente estaba enriquecida con colato de sodio (0.5%). Los datos demostraron que no hay participación del colesterol en ninguno de los eventos analizados. Por lo que nuestro estudio sugiere que es el colesterol es un co-carcinógeno en la oncogénesis inducida por la DEN, por lo que, el consumo excesivo de colesterol en la dieta, se puede considerar como un importante factor de riesgo para el desarrollo del HCC

## ABSTRACT

Primary liver cancers represent the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Diverse etiological factors include chronic viral hepatitis, aflatoxin and alcohol exposure as well as aberrant liver lipid overload. Cholesterol has been identified as a key inducer of metabolic impairment, oxidative stress and promoter of cellular dysfunction. The aim of this work was to address the oxidative stress-mediated DNA damage induced by cholesterol overload, and its role in the development of hepatocellular carcinoma. C57BL/6 male mice were fed with a high cholesterol diet, followed by a single dose of N-diethylnitrosamine (DEN, 10  $\mu\text{g/g}$ , i.p). Reactive oxygen species generation, DNA oxidation, antioxidant and DNA repair proteins were analyzed at different time points. Diet-induced cholesterol overload caused enhanced oxidative DNA damage in the liver and was associated with a decrease in key DNA repair genes as early as 7 days. Interestingly, we found a cell survival response, induced by cholesterol, judged by a decrement in Bax to Bcl2 ratio. Importantly, N-acetyl-cysteine supplementation significantly prevented DNA oxidation damage. Furthermore, at 8 months after DEN administration tumor growth was significantly enhanced in mice under cholesterol diet in comparison to control animals. Together, these results suggest that cholesterol overload exerts an oxidative stress-mediated effects and promotes the development of liver cancer.



# Índice

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>I. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
• <b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>24</b>
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
• <b>OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO.....</b>	<b>27</b>
• <b>DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASAS HEPÁTICAS.....</b>	<b>28</b>
• <b>DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL COLESTEROL.....</b>	<b>29</b>
• <b>INMUNOANÁLISIS (WESTERN BLOT).....</b>	<b>30</b>
<i>Criocortes.....</i>	<i>31</i>
<i>Microscopía confocal.....</i>	<i>31</i>
• <b>DETECCIÓN DE DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO in situ (ROS)....</b>	<b>32</b>
• <b>DETERMINACION DE LA OXIDACION DEL ADN POR HPLC.....</b>	<b>32</b>
<i>Extracción de ADN por la técnica de Yoduro de Sodio (NaI).....</i>	<i>32</i>
<i>Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).....</i>	<i>34</i>
• <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>35</b>
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
1. <b>La dieta HC induce fenotipo esteatótico hepático.....</b>	<b>37</b>
2. <b>La dieta HC induce una respuesta hepática aguda.....</b>	<b>38</b>
3. <b>El fenotipo esteatótico inducido por la dieta HC es debido a la acumulación hepática de colesterol.....</b>	<b>41</b>
5. <b>La dieta HC induce estrés oxidante mediante el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....</b>	<b>42</b>
6. <b>La dieta HC induce daño al ADN mediante el incremento de ROS en hepatocitos.....</b>	<b>43</b>
7. <b>La dieta HC inhibe la expresión y actividad de enzimas relacionadas con la reparación del ADN.....</b>	<b>44</b>
8. <b>La dieta HC tiene un efecto anti-apoptótico durante la fase de respuesta aguda.....</b>	<b>45</b>
<b>II. EL CO-TRATAMIENTO CON N-ACETILCISTEÍNA (NAC) PROTEGE ANTE EL DAÑO INDUCIDO POR LA DIETA HC.....</b>	<b>46</b>
1. <b>La NAC inhibe el daño hepático agudo inducido por la dieta HC.....</b>	<b>46</b>
2. <b>El co-tratamiento con NAC inhibe el daño inducido por la dieta mediante el incremento del contenido de enzimas antioxidantes y relacionadas con la síntesis de glutatión.....</b>	<b>49</b>

3. <i>El co-tratamiento con NAC previene el daño oxidante al ADN inducido por la dieta HC</i> .....	50
<b>III. EL COLATO DE SODIO NO TIENE EFECTO EN LA FASE DE RESPUESTA HEPÁTICA AGUDA INDUCIDA POR LA DIETA HC</b> .....	51
1. <i>El colato de sodio no induce daño en el tejido hepático</i> .....	51
2. <i>El colato de sodio no induce la generación de ROS</i> .....	52
3. <i>El colato de sodio no modifica la expresión de enzimas antioxidantes</i> .....	52
4. <i>El colato de sodio no induce daño oxidante del ADN</i> .....	53
<b>IV. EFECTO HEPÁTICO HORMÉTICO EN RESPUESTA AL DAÑO INDUCIDO POR LA DIETA HC</b> .....	54
1. <i>Tras 14 días de tratamiento, el hígado presenta Disminución del daño inducido por la dieta HC</i> .....	54
2. <i>La generación de ROS observada durante la fase de respuesta aguda disminuye, en la fase de adaptación</i> .....	55
1. <i>La ingesta prolongada de la dieta HC induce la tumorigénesis</i> .....	56
1. <i>La dieta HC acelera la progresión tumorigénica inducida por la DEN</i> .....	58
<b>VII. CARACTERIZACIÓN DEL TUMOR INDUCIDO POR EL CARCINÓGENO EN PRESENCIA DE LA DIETA HC</b> .....	60
1. <i>La dieta HC promueve más tumores de mayor tamaño en el hígado</i> .....	60
2. <i>La dieta HC induce un fenotipo tumoral menos diferenciado</i> .....	61
.....	62
3. <i>La dieta HC incrementa la actividad de mTOR</i> .....	62
<b>XIII. PARTICIPACIÓN DEL COLATO DE SODIO EN LA FASE DE PROGRESION TUMORAL</b> .....	66
<b>XIV. DISCUSIÓN</b> .....	67
<b>XV. CONCLUSIÓN</b> .....	75
<b>XVII. REFERENCIAS</b> .....	77

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **Obesidad**

La obesidad es un problema de salud pública grave a nivel mundial con una prevalencia que ha va en incrementando dramáticamente en las últimas décadas [1]. Su diagnóstico se realiza, cuando un individuo excede el índice de masa corporal (IMC) de 30 kg/m<sup>2</sup> [2]. Esta patología es considerada como una epidemia mundial, ya que la padecen más de 600 millones de personas, es decir, el 13% de la población mundial, según los datos registrados hasta 2014 (OMS, 2015). La Asociación Médica Americana, reconoció esta condición fisiológica, como una enfermedad en 2013. Además al menos 3.6% de los casos nuevos de diversos tipos de cáncer, son atribuibles al exceso de tejido adiposo y al menos el 63% del cáncer de colón correlaciona con altos índices de masa corporal (IBM) [3].

El excedente de peso también ha incrementado la mortalidad por cáncer de 14% al 20% en hombres y mujeres. Particularmente, el incremento de la obesidad infantil a, ha preocupado a instituciones internacionales, como la Organización Mundial de Salud (OMS) [4], mientras que en México la Secretaría de Salud estima que el 70% de la población general, 31% de adolescentes y el 26 % de los niños entre 5 y 11 años en México, son obesos[5].

El exceso de acumulación de grasa en el cuerpo debido a la ganancia de peso tiene un impacto negativo en la salud, como el incremento del riesgo a desarrollar diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. Además está asociada al riesgo de mortalidad de diversos tipos de cáncer. Un estudio

epidemiológico demostró que la reducción del exceso de peso, reduce también el riesgo de padecer algunos tipos de cáncer, sugiriendo la pérdida de peso como un tratamiento terapéutico [6].

### ***Obesidad e inflamación***

La obesidad es un estado crónico de inflamación subclínica; la inflamación sostenida incrementa la prevalencia del cáncer y su mortalidad y representa un componente central del desarrollo y progresión tumoral, debido a los productos de células inflamatorias que pueden actuar como inductores de la proliferación, activando la angiogenesis, migración y metástasis[7] .

Las infecciones por *Helicobacter pylori*, virus de papiloma humano y la hepatitis B y C, promueven un estado de inflamación crónica, que ha permitido la relación con al menos 18% de los casos por cáncer gástrico, cérvico uterino y hepático, respectivamente [8].

Una de las alteraciones fisiológicas más importantes derivadas de la obesidad es la inflamación, que aunque moderada se mantiene constante por lo que acelera la evolución del NAFLD hacia la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y más adelante hacia el HCC. La obesidad induce inflamación a través del estrés oxidante causado por el incremento excesivo de lípidos, incluyendo ácidos grasos libres y colesterol libre, resultando en la activación de las células de Kupffer, que a su vez, favorecen el proceso inflamatorio mediante la liberación de citosinas pro-inflamatorias [9]. Asimismo, las llamadas proteínas obeso-génicas modulan los patrones de señalización que inducen lipogénesis y generación de ROS, lo que deriva en citotoxicidad. Además, de actuar como

efectores de citosinas pro-inflamatorias como la IL-6, que induce el incremento de la expresión del factor de transcripción STAT3 [10].

La inflamación aguda se caracteriza por la acumulación de células T CD8 y células “natural killer” (NK), sin embargo, son menos abundantes en zonas de inflamación baja, por lo que la inflamación asociada a obesidad podría ser un marcador de riesgo para desarrollar cáncer. La obesidad con presencia de inflamación, se caracteriza por alteraciones metabólicas como, resistencia a la insulina, dislipidemia e hiperglucemia, incrementando el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer. La inflamación asociada a la obesidad incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan la mitocondria y el ADN. Las células tumorales y las que se encuentran circundando el tejido transformado, expresan diversas citosinas pro-inflamatorias, tales como, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y prostaglandina E2, que pueden inducir la progresión tumoral. La expresión de IL-6 en células tumorales y estromáticas es elevada, en diversos tipos de tumores y puede inducir la transcripción de genes que dirigen la transición epitelio-mesénquima migración e invasión, reclutamiento de células madre. Estableciendo una conexión entre los niveles de expresión de la IL-6 con la sobrevivencia del paciente [11].

.STAT3 es un potente efector de la señalización de IL-6 y regula genes que median la proliferación celular del cáncer. La activación aberrante de STAT3 es frecuentemente asociada con varios cánceres incluyendo el HCC. De esta manera, la inhibición de la señalización de STAT3 puede disminuir el riesgo de oncogénesis mediada por la inflamación crónica [10]

Por otro lado, aunque la NAFLD es una manifestación hepática de la obesidad e incluye esteatosis no alcohólica y cirrosis, su etiopatogenia parece ser multifactorial. La obesidad, diabetes tipo II y la hipertrigliceridemia son asociados a esteatosis hepática, y aunque no necesariamente induce NASH, el hígado graso es vulnerable al daño hepatocelular iniciado por ROS [1]. Es crítico entender no solo los desencadenantes de la hepatitis (daño e inflamación) en NASH, sino cómo esto desencadena una enfermedad crónica en el hígado. Previos reportes han mostrado que la resistencia a insulina es un factor patogénico de NASH, esto favorece la acumulación de ácidos grasos libres en el hígado y predispone al estrés oxidativo por la estimulación de peroxidasas de lípidos microsomales y por el directo efecto de altos niveles de insulina en la disminuida beta oxidación mitocondrial [7, 11, 13].

Por lo tanto, se puede concluir que la disfunción lipogénica tiene un impacto negativo en muchas patologías, como el síndrome metabólico y la obesidad, que se ha relacionado con la prognosis en el desarrollo tumoral. Fisiológicamente, los lípidos son biomoléculas indispensables para la síntesis de membrana celular, aporte energético y para llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular, como Ras o proteínas G heterotriméricas [2, 3].

### ***Colesterol***

La Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (Enurbal), menciona que el consumo de colesterol entre los capitalinos, ronda entre los 374 a 452 mg/día, cuando lo recomendado por la OMS es de 240 a 260 mg/día. Algunos estudios epidemiológicos sugieren una

asociación positiva entre los niveles de colesterol sérico y el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer. Además de que se ha demostrado que el uso de estatinas disminuye el riesgo de padecer melanoma, linfoma no Hodking, endometrial y cáncer de mama. Sin embargo, a pesar de que la ingesta elevada de este lípido puede determinar un estilo de vida poco saludable y por lo tanto propensa a desarrollar diversas enfermedades, no existe hasta la fecha, asocian directa entre el colesterol y coa oncogénesis. Los niveles de colesterol intracelular, fluctúan a través del ciclo celular tanto en homeostasis como en las células de diferentes tipos de cáncer, lo que incrementa la posibilidad de considerar al colesterol como un indicador para la clasificación de estadios patológicos. Fisiológicamente, el colesterol participa activamente en la regulación de la homeostasis celular, además de ser un precursor de hormonas esteroideas, componente de la membrana celular y de los dominios de señalización celular, conocidos como balsas lipídicas. La síntesis de colesterol se lleva a cabo en el hígado y se transporta a través del plasma hacia tejidos extra-hepáticos unido con lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL son endocitadas en la célula y transportadas a los lisosomas, donde se hidrolizan para liberar colesterol libre que es transportado a la membrana celular y a otros organelos membranosos [12]. La homeostasis del colesterol se lleva a cabo mediante diferentes procesos que involucran su importe, síntesis, exportación, metabolismo y esterificación. El factor de transcripción de la proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroides (SREBPF2) y los receptores hepáticos X (LXR) son los principales reguladores de la homeostasis del colesterol. Los niveles intracelulares de colesterol, son censados en el retículo endoplásmico; la síntesis de colesterol es mediada por SREBP2 y regulada por la activación de

receptores LXR mediada por oxiesteroles, para promover su exportación. El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) ha dado a conocer los perfiles transcripcionales y el grado de mutaciones existentes en diversos tumores. En sarcoma, leucemia mieloide aguda y melanoma, 7 genes que participan en la síntesis de colesterol, se encuentran sobre-expresados y correlacionan negativamente con la supervivencia del paciente. Sin embargo, en gliomas de bajo grado, el incremento de la síntesis de colesterol, mostró incrementó del tiempo de supervivencia esperado. Por lo que se puede concluir que solamente algunos tipos de cáncer se podrían asociar con la activación de la vía de la síntesis del colesterol. La activación constitutiva de la vía de señalización PI3K/AKT incrementa la biosíntesis e importación de colesterol e inhibe la exportación mediada por ABCA-1, lo que contribuye al crecimiento celular. La sobre-activación de AKT se ha visto relacionada con el incremento de la agresividad y metástasis en hueso, en cáncer de próstata [13].

Otro gen que participa en la regulación de la homeostasis de colesterol es TP53. La pérdida de TP53 modifica la síntesis de colesterol en cáncer de mama, lo que es suficiente para dañar la arquitectura del tejido mamario. El mantenimiento de este fenotipo depende de la prenilación proteica. La activación de la síntesis de colesterol inducida por TP53 induce la proliferación y regeneración en células de cáncer de mama mediante la prenilación de la GTPasa Rho. Por otra parte, los niveles elevados de colesterol en la mitocondria, inducen resistencia a la señalización apoptótica. Las proteínas STAR y STARD3 regulan la importación mitocondrial de colesterol. STARD3 está asociado con la pérdida de adhesión celular en cáncer de mama, lo que induce la metástasis. La disminución de la



actividad de ABCA-1 promueve la supervivencia de las células transformadas, mediante el incremento de los niveles de colesterol mitocondrial[14, 15].

El citocromo P450, residente mitocondrial, se encarga de metabolizar el colesterol para sintetizar esteroides y oxisteroides. Los oxisteroides son metabolitos que inhiben la síntesis de colesterol, mediante el incremento de la actividad de los LXRs. Se han detectado al menos 15 proteínas involucradas en la vía de la síntesis de colesterol con potencial terapéutico. El tratamiento con estatinas demostró efectos anti-tumorigénicos que incrementan su efectividad junto con el uso de otros agentes quimioterapéuticos. Los bifosfonatos y tocotrienoles, también inhiben la síntesis de colesterol y su uso en estudios pre-clínicos, suprimió el crecimiento celular *in vitro*. Otra vía secundaria de la síntesis del colesterol, involucra la geranyl-geranilación proteica, que parece ser esencial para mantener el estado “stemness” en células de cáncer de mama. La inhibición de la absorción intestinal de colesterol, también ha sido propuesta como tratamiento para el cáncer. El fármaco Ezetimiba, disminuyó el crecimiento tumoral en cáncer de próstata, mediante la inhibición de la absorción del colesterol en el intestino. Estos antecedentes muestran evidencia del efecto del colesterol con el desarrollo del cáncer. La expresión alterada y los niveles de mutación de los genes involucrados en la homeostasis del colesterol han sido ya identificados en diversos tipos de cáncer. Esto se debe al incremento en el número de copias de los genes de biosíntesis, importe y exportación del colesterol, lo que promueve niveles intracelulares elevados de este lípido facilitando la proliferación de las células transformadas[6, 16]

### ***Hepatocarcinoma y colesterol***

El carcinoma hepatocelular (HCC) es la neoplasia primaria del hígado más frecuente, constituye del 80-90% de los tumores hepáticos malignos primarios con mortalidad de medio millón de personas por año. Su incidencia es mayor en hombres que mujeres (4:2), de 35 a 65 años. El HCC es una patología compleja, debido a su heterogeneidad fenotípica y molecular. Los factores de riesgo más importantes son las infecciones virales (hepatitis B y C) [17]. No obstante que la infección por hepatitis B ha disminuido (<5 casos/100,000 individuos) debido a los regímenes de inmunización mandatorios para recién nacidos y que los tratamientos contra la hepatitis C, son cada vez más efectivos, el HCC ha incrementado progresivamente su incidencia en países industrializados, por lo que hoy en día, es la tercera neoplasia más frecuente, la segunda causa de muerte por cáncer y la número uno en pacientes con cirrosis hepática a nivel mundial, lo que hace evidente que existen otros factores de riesgo para el desarrollo de HCC [18]. Uno de ellos es la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) y el síndrome metabólico, principalmente[18]. La NAFLD puede clasificarse como esteatosis simple o como esteatohepatitis no alcohólica, que se caracteriza por la presencia de inflamación y fibrosis. La NAFLD, es la manifestación clínica del síndrome metabólico y la causa más común de enfermedad hepática crónica. De acuerdo con la teoría de múltiples “hits” o daños, el síndrome metabólico, el estrés oxidante, las citosinas pro-inflamatorias, las endotoxinas y la resistencia a insulina se asocian directamente con la progresión de NASH hacia el HCC [19 ,20]

La patogénesis del HCC es dirigida por dos mecanismos: la cirrosis asociada con regeneración del tejido hepático tras daño tisular, inducida por infecciones virales (hepatitis B o C), alcohol, aflatoxina, esteatosis hepática no alcohólica

(NASH) y/o factores metabólicos, como la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2 y la obesidad así como las mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumores y la disfunción de las vías de señalización que dirigen eventos oncogénicos. El estudio y entendimiento de las vías de señalización involucradas en la oncogénesis son la clave para la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento del HCC, que pudieran incluirse como parte de análisis clínicos de rutina, para la detección de tumores. Actualmente, el HCC se diagnostica mediante técnicas tomográficas, resonancia magnética y biopsias, en algunos casos. Entre los tratamientos con mejores resultados se encuentran la ablación percutánea, la cirugía de resección, y el trasplante de hígado, según la etapa de desarrollo en la que se encuentre del tumor, y el nivel de funcionalidad hepática [21].

Desgraciadamente, estos tratamientos, incrementan la esperanza de supervivencia del paciente, por 5 años, máximo. Además, en etapas avanzadas, el HCC no es sensible a embolización o quimioterapia, dada la particularidad de un tumor con respecto a otro. Es por ello que, el trasplante hepático se considera la mejor opción de tratamiento, pues incrementa significativamente la supervivencia del paciente; sin embargo, el 70% del diagnóstico del HCC se hace de manera tardía, debido a la ausencia de síntomas, cuando los tumores miden más de 5cm de diámetro, por lo que esta opción no es viable [22, 23].

El hepatocarcinoma (HCC), es uno de los cánceres más frecuentes a nivel mundial. Para su mantenimiento, los tumores de HCC dependen principalmente de la síntesis lipídica [4]. Además, la agresividad de esta patología se asocia positivamente con los niveles de expresión de enzimas lipogénicas, tanto de

ácidos grasos como de colesterol. Existen varios reportes que demuestran que enzimas como la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la mevalonato cinasa (MVK), la esqualeno sintasa (SQS) y la 3-hidroxil-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR) pueden dirigir los procesos tumorigénicos, incrementar la agresividad tumoral y así, disminuir el tiempo de supervivencia del paciente [5-7].

Varios reportes señalan que el exceso de ácidos grasos libres tiene un efecto importante en el desarrollo del cáncer [8], sin embargo se desconoce el aporte dietario del exceso de colesterol en este contexto. Recientemente, se ha demostrado que en el HCC humano la expresión de HMGCR y la MVK es significativamente mayor que en el tejido circundante al tumor y que en el tejido hepático normal [6]. Adicionalmente, análisis de hígados de pacientes que padecen de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) han revelado un incremento de colesterol libre, debido al aumento en la expresión de la proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP) 2 así como de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (StAR) [9], ambas involucradas con el desarrollo y la progresión del HCC [10].

Nuestro equipo de investigación ha demostrado previamente que la sobrecarga de colesterol en el hígado induce desbalance en el estado redox celular que provoca la complicación de diferentes enfermedades hepáticas crónicas [11-14], mediante alteraciones en la homeostasis del ciclo del glutatión (GSH) [15, 16]. Debido al incremento de las especies reactivas de oxígeno, los sistemas de defensa celular antioxidante se ven rebasados, lo que genera estrés oxidante celular, un evento indispensable para producir daño al ADN y por lo tanto, carcinogénesis [17]. Es por esta razón que el exceso de colesterol tiene la

capacidad de incrementar los efectos carcinogénicos de inductores de daño al ADN como los observados tras el tratamiento con la N-dietilnitrosamina (DEN) [18]. Debido a las propiedades biológicas y químicas del colesterol, así como sus efectos en el estado redox celular, nuestra hipótesis fue que el colesterol podría estar participando en los procesos oncogénicos, particularmente como segunda agresión, potenciando el daño al ADN como evento temprano durante la hepatocarcinogénesis.

### ***Vías de señalización que participan en la oncogénesis y desarrollo del HCC***

Las de señalización celular, que se relacionan con la oncogénesis y el desarrollo del HCC son diversas. Entre ellas, las más relevantes son p53, WNT/ $\beta$ -Catenina, EGFR, c-MYC, HGF/c-Met, STAT3, sin embargo, todavía no se conoce con detalle la relevancia de éstas y su contribución durante del desarrollo de la enfermedad. La oncogénesis, sin embargo, no es sólo un proceso que involucra, sino además, la acumulación de modificaciones genéticas y epigenéticas, que derivan del daño al microambiente hepático, lo que permite la formación de nódulos y, acumulativamente culminan en el cáncer avanzado. Por desgracia, este campo sigue siendo un campo poco estudiado [24, 25]

Uno de los principales factores de transcripción estudiados por sus posibles funciones oncológicas es STAT3. Modelos murinos y tumores humanos han demostrado sobre expresión de STAT3. En células no transformadas la activación de STAT3 es transitoria, incluso en presencia de citosinas. Sin embargo, las células cancerígenas han desarrollado un mecanismo de retroalimentación positiva para asegurar la activación persistente de STAT3. Las consecuencias fisiológicas de la activación persistente de STAT3 son la

proliferación tumoral, supervivencia, angiogénesis y metástasis, entre otras. STAT1 es un antagonista de STAT3, que actúa como un supresor de tumores. STAT1 se encuentra disminuido en tumores de HCC y variedad de patologías asociadas al desbalance en la activación de STAT1 y STAT3 [26]. Además, los tumores establecidos expresan STAT3 no sólo en las células que conforman el tumor, sino en las células inflamatorias y células del estroma tumoral. Esta doble activación, es necesaria para establecer interacciones tumor-estroma, promoviendo la tumorigénesis. Muchas citosinas, quimosinas y factores de crecimiento como IL-6, son producidas en un mecanismo dependiente de STAT3. Estos factores a su vez, activan STAT3 en células del estroma, que también producen citosinas activadoras de STAT3, estableciendo una retroalimentación positiva entre las células tumorales y las células del microambiente. En el HCC, la IL-17, amplifica esta retroalimentación que induce la producción en un mecanismo que depende de la activación de AKT y STAT3 [64]. La función de promoción tumoral de STAT3 en el microambiente del tumor, está mediada por diversos mecanismos moleculares y celulares. Existe además entrecruzamiento entre STAT3 y NF $\kappa$ B, otro de los factores de transcripción importantes que asocia la inflamación con el desarrollo del cáncer [68]. RelA (p65) la unidad más importante del complejo de NF $\kappa$ B, interactúa físicamente con STAT3 [69], por lo que estos dos factores de transcripción regulan en conjunto diversos genes blanco. STAT3 es requerido para la activación constitutiva de NF $\kappa$ B en células tumorales y en célula del estroma hematopoyético. La fosforilación en Tyr-705- y Ser-727 de STAT3 promueve la acetilación de RelA, lo que permite localización nuclear prolongada y constitutiva de NF $\kappa$ B [69]. Particularmente en el 60% de los tumores de HCC, STAT3 se

encuentra constitutivamente activado como resultado de la inflamación, estrés oxidante, estimulación de factores de crecimiento y silenciamiento epigenético de SOCS, así como la expresión disminuida de algunas fosfatasa [11].

La IL-6 y STAT3 son esenciales para el proceso tumorigénico en el hígado del ratón. Ratones deficientes de IL-6- o STAT3 presentan reducción significativa de carcinogénesis inducida por la N-dietilnitrosamina (DEN) en comparación con los ratones “wild type”. Recientemente, se ha observado que el fármaco Sorafenib inhibe la fosforilación de STAT3 en Tyr705 en una gran variedad de células tumorales como, meduloblastoma, colangiocarcinoma [14] y HCC. La inhibición de la señalización de STAT3 induce la disminución de la expresión de Mcl-1 que a su vez tiene una función fundamental en la inducción apoptótica de estas células. El mecanismo por el cual el Sorafenib inhibe la activación de STAT3 ha sido dilucidado por Gores y colaboradores en células de colangiocarcinoma. El estudio muestra que el Sorafenib promueve la desfosforilación de STAT3 en Tyr705 mediante la activación de la fosfatasa SHP2. De la misma forma, la inhibición química de la cinasas Raf, también resulta en la desfosforilación de STAT3 en Tyr705, por lo que se concluyó que el Sorafenib promueve la desfosforilación de STAT3 en Tyr705 mediante la inhibición de Raf-1 en colangiocarcinoma.

## **JUSTIFICACIÓN**

En México la población adulta e infantil se encuentra gravemente afectada por la obesidad derivada de una dieta inadecuada, con exceso en lípidos, principalmente colesterol. La hipercolesterolemia presente en la población mexicana además, tiene una relación directa con la predisposición genética al desarrollo del síndrome metabólico, lo que incrementa la prevalencia de NAFLD. Además la dieta que se consume a nivel nacional, contiene el doble de colesterol del que presentan dietas saludables, como las ingeridas en países Europeos, principalmente, en las costas del Mediterráneo.

La acumulación de lípidos en el hígado producida por la alta ingesta de estos, induce a un estado de inflamación crónica, que se sabe, es indispensable para el desarrollo del hepatocarcinoma (HCC) y lleva a una progresión muy lenta (20-30 años) del daño, lo que obstaculiza su detección y dificulta el estudio de la relación existente entre los estados tempranos de NAFLD y el HCC. La inflamación sostenida que se observa en la NAFLD acelera el avance hacia el HCC, mientras que el colesterol promueve un estado redox celular desregulado. Estas características combinadas, han sido determinadas como la causa principal por lo que se incrementarán los casos nuevos de HCC anuales, afectando cada vez más a las poblaciones de jóvenes e infantes. Por lo tanto, utilizando el modelo experimental de carcinogénesis, particularmente HCC, inducido por la N-dietilnitrosamina, se podrán dilucidar las vías de señalización involucradas y así como la determinación de posibles blancos terapéuticos que



puedan utilizarse para combatir esta enfermedad dolorosa, costosa y de consecuencias fatales.

### **I. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el efecto de la sobrecarga de colesterol en el hígado en la carcinogénesis y progresión del hepatocarcinoma inducido por la N-dietilnitrosamina?

### **II. HIPÓTESIS**

Si la concentración de colesterol hepática incrementa, debido a la ingesta de una dieta hipercolesterolémica, entonces se favorecerá un estado celular oxidante, que incrementará el daño al ADN, y acelerará el proceso carcinogénico y de promoción tumoral.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la participación del colesterol en las fases de: carcinogénesis, progresión y establecimiento del hepatocarcinoma inducido por N-dietilnitrosamina en un modelo experimental *in vivo*.

#### **• OBJETIVOS PARTICULARES**

1) Evaluar los efectos fisiológicos y/o morfológicos derivados de la ingesta crónica de una dieta hipercolesterolémica en un modelo de carcinogénesis química *in vivo*.

2) Definir el efecto de la sobrecarga de colesterol hepática en las fases de inicio y progresión de la carcinogénesis inducida por la N-dietilnitrosamina.

- 3) Definir los cambios celulares y moleculares que sean dirigidos específicamente por la sobrecarga de colesterol, en la fase inicial de la carcinogénesis química.
- 4) Identificar las vías de señalización y proteínas involucradas en los procesos de proliferación y supervivencia celular en la fase carcinogénica y aquellas expresadas en el tumor derivadas de la ingesta crónica de altas cantidades de colesterol en un modelo de carcinogénesis química.
- 5) Reconocer e identificar las proteínas expresadas diferencialmente en presencia de altas concentraciones celulares de colesterol, como blancos terapéuticos potenciales en un modelo de carcinogénesis química.

#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS

- *Ratones*

Los animales experimentales se obtuvieron en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco en condiciones SPF con macro ambiente filtrado (filtros HEPA) y controlado (19-23°C, humedad relativa 45-55% y 15-18 vca/h, control de luz 12:12 y ruido < 85db). El encamado fue de importación Aspen Chip autoclaveado y fueron alimentados con alimento de importación de Purina PMI, Lab Diet fórmula 5001 (Dieta Chow) y agua ozonizada, baja en sales suministrados *ad libitum*. Los animales se encontraron libres de antibióticos. Las instalaciones cumplen con la NOM-062-Z00-1999. Se obtuvo certificado de calidad genética y microbiológica (Charles River Laboratories). Los animales se encontraron libres de enfermedades. Se utilizaron 150 ratones sanos, nacidos y criados en el Banco Genético de la UPEAL-Bioterio de sexo masculino de la cepa

C57BL/6J con 14 días de edad y se trataron acorde al diseño experimental **(Tabla 1)**.

- Modelo experimental y tratamientos

Los tratamientos, se clasificaron según los cambios histológicos observados en: **“fase aguda” (7 días), “fase adaptativa” (14 días), “fase de iniciación tumoral” (1 y 3 meses), “fase de progresión tumoral” (5 y 8 meses) y “caracterización de los tumores inducidos por el carcinógeno en presencia de la dieta HC” (8 meses)**.

El modelo de carcinogénesis inducida se indujo mediante la admimnistración intraperitoneal (ip) de una dosis única de N-dietilnitrosamina (DEN, 10 $\mu$ g/kg de peso), a los 14 días de edad. Dos días después, los animales se alimentaron con las siguientes dietas: **1)** dieta hipercolesterolémica (HC, 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio) **2)** dieta hipercolesterolémica sin colato de (HC sin CS, 2% de colesterol) y **3)** dieta suplementada con colato de sodio (CS, 0.5% de colato de sodio).

GRUPOS	CW	DEN	HC			CS	N-acetilcisteína (NAC)	TIEMPOS
			HC	s/CS	CS			
CW	*						2, 7 y 14 días, 1, 3, 5 y 8 meses	
DCW	*	*					2, 7, 14 días, 1, 3, 5 y 8 meses	
HC			*				2, 7 y 14 días, 1, 3, 5 y 8 meses	
DHC		*	*				2, 7 y 14 días, 1, 3, 5 y 8 meses	
HC sin CS				*			2, 7, 14 días y 8 meses	
DHC sin CS		*		*			2, 7, 14 días, y 8 meses	
CS					*		2, 7, 14 días	
DCS		*			*		2, 7, 14 días y 8 meses	
NCW	*					*	7 días	
NDCW	*	*				*	7 días	
NHC			*			*	7 días	
NDHC		*	*			*	7 días	

- OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO.***

Se administraron 0.5 ml de avertina (2-2-2 tribromoetanol, Sigma, EUA) vía intraperitoneal como anestésico. Se obtuvo el peso de cada animal y se procedió con la desinfección del área abdominal con alcohol (70%). Para obtener el hígado, se realizó una incisión vertical y se recuperó el órgano que fue

segmentado en cuatro secciones que se utilizaron para: **i)** inclusión en parafina (previa fijación en etanol absoluto o paraformaldehído (PFA, 4%), **ii)** preservación a -80°C y **iii)** inclusión en O.C.T para cortes congelados (Tissue Tek®), y **iv)** determinación de ROS *in situ*.

- **DETERMINACIÓN DE TRANSAMINASAS HEPÁTICAS**

Sangre capilar se centrifugó a 842xg/15 min para sedimentar la fracción celular y se obtuvo el plasma sanguíneo como sobrenadante. La muestra (30µl) se colocó en tiras reactivas para AST (ROCHE, Alemania), y se determinó su actividad mediante el medio automatizado de REFLOVET plus (ROCHE).

### **EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA**

Se homogeneizó tejido hepático mecánicamente. La suspensión celular se centrifugó a 13201xg/20 seg, el botón celular se resuspendió en buffer de lisis [(M-PER, Pierce, EUA), ditioneitol (DTT, Sigma, EUA) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma, EUA), e inhibidores de fosfatasas y proteasas (ROCHE, Alemania)]. Se centrifugó nuevamente a 15493xg/10min y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso.

La muestra de proteína (2µl-5µl) se cuantificó en el equipo fotométrico NanoDrop y se obtuvo la medición espectral utilizando el software asociado al equipo (Start--Programs---Nanodrop---ND-1000 3.3.0) según las indicaciones del fabricante.

### **OXIDACIÓN DE LÍPIDOS**

**CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)** Tejido hepático (0.1g) se homogeneizó con 1ml de PBS, de los que se

utilizaron 20 $\mu$ l para su cuantificación espectrofotométrica (NanoDrop) y 900 $\mu$ l se colocaron en tubos de ensayo de vidrio y se añadieron 2ml de la solución reactiva TCA-TBA-HCL [ácido tricarbóxico (TCA) 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.37% y ácido clorhídrico (HCL) 0.24N]. Los tubos se taparon y se agitaron en el vortex durante 10 seg. Después se sumergieron en agua a 100°C/30min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente/15min. Se liberó la presión, retirando las tapas de los tubos y posteriormente se volvieron a tapar. Se centrifugaron a 895xg a temperatura ambiente 7 10min. 1.5ml de la solución se tomó evitando tomar el precipitado, y se colocaron en tubos de ensayo limpios. De esta suspensión, se tomaron 500 $\mu$ l del sobrenadante y se determinó la absorbancia a 535nm en microceldas de vidrio. La solución TCA-TBA-HCL se utilizó como blanco y fue tratada de igual manera que los tubos que contenían las muestras. La concentración de MDA fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

- **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL COLESTEROL**

Se utilizó la prueba comercial SPINREACT para el análisis de las muestras de: 1) plasma sanguíneo y 2) tejido hepático completo, que se trataron según indicaciones del fabricante. Se utilizaron 10 $\mu$ l de la muestra y se adicionaron 10 $\mu$ l del reactivo R (PIPES pH 6.9 90mmol/L, fenol 26mmol/L, colesterol esterasa (CHE) 1000 U/L, colesterol oxidasa (CHOD) 300 U/L, peroxidasa (POD) 650 U/L y 4- aminofenazona (4-AF) 0,4 mmol/L); se incubó durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 505nm en cubetas de 1.0 cm de paso de luz. La solución blanco (patrón primario acuoso de colesterol) utilizada en este protocolo fue

suplementada por el fabricante. La prueba contó con una sensibilidad analítica de 1mg/dL = 0.0015 (A).

- **INMUNOANÁLISIS (WESTERN BLOT)**

Extractos de proteína se trató conforme el protocolo de electroforesis para geles de poliacrilamida de diferentes gradientes (4-20%) y fue transferida a una membrana de polivinildenedifluoruro (PVDF) (Bio-Rad) a 120V por 2 h. El bloqueo se realizó usando leche descremada al 5% en TBS-Tween (Sigma, EUA) por 45 min en agitación constante. Se realizaron lavados (2X) con TBS-T durante 10 min y se incubaron con los anticuerpos primarios específicos durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Los anticuerpos utilizados fueron contra:  $\gamma$ -glutamil cisteinil sintetasa (GCS), actina, y contra las isoformas fosforiladas y totales de ATM, ATR, BRCA1, Chck1, Chck2, p53, H2AX, Aurora, Bax, Bcl-2, CYP450, HO-1, GSTM, HSP70, Gpx 1/2,  $\gamma$ -GCS, CDK2, CDK4, CDK6, Ciclina D1, ERK, STAT3, Mcl-1 (Tabla 2). Tras 12 h de incubación con los anticuerpos primarios, se lavó la membrana con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo, anti-ratón, anti-cabra) acoplado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EUA). La intensidad de la señal fue determinada mediante el uso de sustrato de alta sensibilidad (Millipore, USA). La detección de luminiscencia se llevó a cabo en el equipo Gel Logic 1500 imaging system, Kodak.

## **INMUNOHISTOQUÍMICA**

### *Cortes en parafina*

Para este ensayo inmunohistoquímico se utilizó el ensayo “Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cortes de tejido hepático 5µm fueron incluidos en PFA 4% y fijados en laminillas cargadas. Se desparafinaron, deshidrataron y se bloquearon los peróxidos de hidrógeno durante 10 min. Se realizaron lavados con PBS. Después se bloquearon las proteínas por 10 min a temperatura ambiente para evitar tinción inespecífica. Se lavó una vez más con PBS y se incubaron con los anticuerpos Mcl-1 o pmTOR por 12h. Se trató con peroxidasa de estreptavidina durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavó una vez más con PBS. Se agregaron 30µl cromógeno DAB en 1.5 ml del substrato DAB sobre la laminilla por 10 min a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y finalmente se realizó una tinción con hematoxilina durante 20 seg para el contraste nuclear. Finalmente los cortes fueron deshidratados una vez más y montados con resina para su visualización microscópica.

#### *Criocortes*

Se utilizaron criocortes de tejido hepático embebidos en O.C.T (TISSUE TEK®).

Los cortes se utilizaron para la determinación de la histona 2aX fosforilada, que fue detectada mediante microscopía confocal usando anti-PH2AX (Cell Signaling) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa 568 y para la detección de especies reactivas (ROS) *in situ*.

#### *Microscopía confocal*

Las imágenes analizadas de los experimentos en los que se utiliza fluorescencia para la detección de proteínas, fueron obtenidas en el microscopio confocal multifotónico Carl Zeiss LSM 780; los parámetros de apertura de pinhole (1 AU) fueron estandarizados para todas las tomas. La excitación de los fluorocromos fue mediante el láser entonable Camaléon que permite preservar la integridad del tejido analizado, disminuyendo así falsos positivos.



- **DETECCIÓN DE DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO *in situ* (ROS)**

La técnica de determinación de ROS *in situ* se llevó a cabo en criocortes frescos de tejido hepático que se incubó con 5 $\mu$ M de 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH) o 50 $\mu$ M de dihidroetidio (DHE). La DCFH es permeable a la membrana celular y se oxida por peróxidos intracelulares, esta reacción emite fluorescencia a 520 nm del espectro de luz (verde). Por otra parte el DHE que también es permeable a la membrana celular es oxidado y detectado a 560 nm en el espectro de luz (rojo). Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio de fluorescencia invertida (Zeiss)

- **DETERMINACION DE LA OXIDACION DEL ADN POR HPLC**

*Extracción de ADN por la técnica de Yoduro de Sodio (NaI)*

El DNA fue extraído usando el método de NaI (Wang et al., 1994). Para lo que se utilizaron 0.2 g de tejido que se homogenizó con 1000  $\mu$ L del amortiguador A [0.32M sacarosa (Merck, México), 5mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma, EUA), 10 mM Tris-HCl (Promega, EUA), 0.1 mM desferroxamina (Sigma, EUA), 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, EUA), pH = 7.5]. Esta suspensión celular se centrifugó a 1500xg por 10 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1000  $\mu$ L del mismo amortiguador. Se realizó una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido 1000  $\mu$ L de amortiguador B [10 mM Tris-HCl, 5mM EDTA-Na<sub>2</sub> (Sigma, EUA), 0.15 mM desferroxamina, pH = 8.0]. Se agregaron 100  $\mu$ L de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (Sigma, EUA), 40  $\mu$ L de RNasa T1 (Sigma, EUA) a una concentración de 20 U/ $\mu$ L, 60  $\mu$ L de RNasa A (Sigma, EUA) a una concentración 20 U/ $\mu$ L y se agitó por inversión. Los tubos se incubaron a 37°C por una hora en

baño de agua, para la activación de las RNasas. Pasado este tiempo, se adicionaron 50 µL de proteinasa K (Sigma, EUA) a una concentración de 30 U/µL y se incubó a 37°C por una hora. Las muestras fueron centrifugadas a 5000xg por 15 min a 4°C; se recuperó el sobrenadante que contenía el DNA y se colocó en hielo. Posteriormente se agregó 1 mL de solución de NaI [7.6 mM NaI (Reasol, México), 40 mM Tris-HCl, 20 mM EDTANa<sub>2</sub>, 0.5 mM desferroxamina, pH = 8.0] y 1 mL de isopropanol absoluto frío (JT Baker, México), se agitó por inversión y después se almacenó la muestra a -20°C, durante toda la noche. Al día siguiente, el DNA fue transferido a tubos Eppendorf estériles y se centrifugaron a 9000xg por 15 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y posteriormente se le agregó 1 mL de isopropanol frío al 60% (v/v) que fue resuspendió lentamente. Se centrifugaron las muestras a 9000xg por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de etanol (JT Baker, México) al 70% (v/v) frío, se resuspendió y centrifugó a 9000xg por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Por último se agregaron 200 µL de desferroxamina 0.1 mM y se resuspendió la pastilla de DNA. Finalmente se adicionaron 100 µL de desferroxamina 0.1 mM y se almacenaron las muestras a -20°C (Helbock et al., 1998). La concentración de DNA fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm utilizando la siguiente ecuación: **[ADN] en µg/mL = (Abs 260 nm X Factor de dilución X 50 µg ADN/ml)**. Mientras que la pureza fue determinada de acuerdo al cociente A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>**Hidrólisis enzimática de ADN.** La cuantificación del aducto 8-OHdG se realizó mediante una digestión enzimática del DNA, utilizando las nucleasas de ADN P1 y fosfatasa alcalina, para obtener nucleósidos puros. 100 µL de esta solución fue inyectada en el HPLC. La hidrólisis se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: por cada 100 µg de

DNA se adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio (Sigma, EUA) 1M, 2.5  $\mu\text{L}$  de nucleasa P1 (Sigma, EUA) a una concentración 0.4 U/ $\mu\text{L}$  y la cantidad de agua necesaria para completar un volumen de 100  $\mu\text{L}$ . Las muestras fueron incubadas por 30 min a 37°C; posteriormente se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 1M, pH 7.4 y 13.5  $\mu\text{L}$  de enzima fosfatasa alcalina 0.22 U/  $\mu\text{L}$  (Sigma, EUA), en amortiguador de fosfatasa [50% (v/v) de glicerol (Sigma, EUA), 50 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Sigma, EUA) y 0.1 mM de  $\text{ZnCl}_2$  (Sigma, EUA), pH = 7.5]. Para finalizar el proceso las muestras se incubaron 1 h a 37°C para centrifugarse una vez más. La fase acuosa fue obtenida para su análisis posterior en el equipo de HPLC.

#### *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC)*

Se utilizó cromatografía isocrática en fase reversa con flujo de 1mL/min; la separación se realizó en una columna supelcosil LC-18 (Supelco) con una fase móvil de fosfato monobásico de potasio (JT Baker) 50 mM pH=5.5 y metanol (Sigma grado HPLC) al 8%, con una bomba WATERS 600. El sistema cromatográfico estuvo acoplado a un detector UV/VIS WATERS 485, para la detección de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), a una longitud de onda de 254 nm debido a sus dobles enlaces conjugados y a un detector electroquímico (ANTEC LEYDEN, Intro), el cual permitió identificar el aducto 8-OdHG a 290 mV. La concentración de dG y de 8-OHdG se determinó integrando el área bajo la curva e interpolando ese valor con la curva patrón correspondiente para cada compuesto.

A continuación, la concentración de la molécula 8-OHdG se dividió entre la concentración de dG, y el cociente correspondió al número de bases dañadas que presentaron cada una de las muestras. La fase móvil consistió de 50 mmol L<sup>-1</sup>  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mmol L<sup>-1</sup>  $\text{KCl}$ , 2.5 % de acetonitrilo y 1 % de metanol

(pH 4.45). Antes de usarse, la fase móvil se pasó a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ . La elución se realizó de modo isocrático y la velocidad del flujo de 0.5 mL  $\text{min}^{-1}$ . 20  $\mu\text{L}$  de la solución estándar o de la muestra fueron inyectados en la columna analítica del HPLC.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes que fueron realizados por triplicado. Las comparaciones entre grupos se determinaron mediante las pruebas de *t* Student's, Mann Whitney y Tukey. Además se utilizó el software GraphPad Prism 6 para OSX para los análisis mencionados. Las diferencias se consideraron como significativas considerando una  $p \leq 0.05$ .

<b>Anticuerpo</b>	<b>Marca</b>	<b># Catálogo</b>
Actina	Sigma	A2228
Bax	Santa Cruz	6236
Bcl-2	Santa Cruz	783
ERK ½	Santa Cruz	135900
GPX4	Abcam	41787
GSTm	Santa Cruz	FL-218
HO-1	Santa Cruz	5141S
HSP70	Santa Cruz	1060
p-ATM (ser1981)	Cell Signaling	5883
(ser428)	Cell Signaling	2853
p-BRCA1 (ser1524)	Cell Signaling	9009
p-CHK1	Cell Signaling	2348
p-CHK2	Cell Signaling	2197
p-ERK ½	Cell Signaling	9101
p-H2AX	Cell Signaling	9718
p-P53	Cell Signaling	9286
p-STAT3 (ser727)	Abcam	30647
p-STAT3 (Y705)	Abcam	EP2147Y
Romo 1	ORIGENE Technologies	TA505580
STAT3	Abcam	E121-21
γ-GCS	Santa Cruz	22755

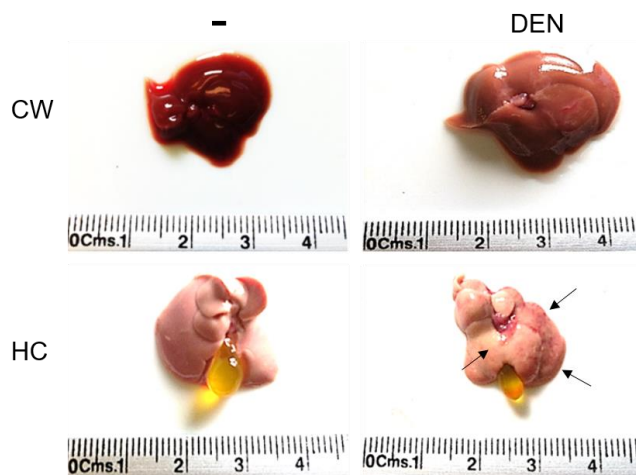
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en este proyecto

## VIII. RESULTADOS

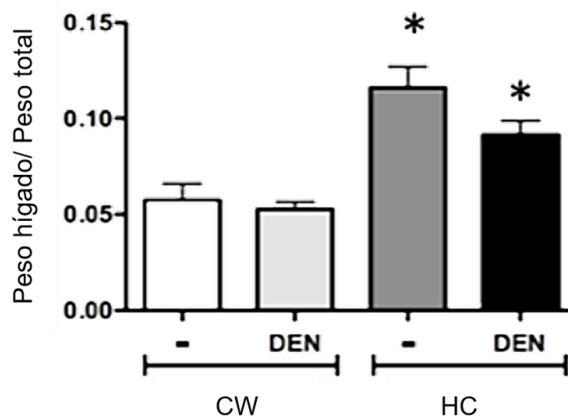
### 1. FASE AGUDA (7 días)

#### 1. La dieta HC induce fenotipo esteatótico hepático.

La fisiología normal del hígado (CW), se caracteriza por coloración roja intensa, bordes regulares y textura lisa. En cambio, los hígados que recibieron el carcinógeno DEN (DCW) mostraron un tenue cambio en la tonalidad normal del hígado. Los hígados que consumieron la dieta hipercolesterolémica (HC) mostraron un color rosa pálido y se detectaron litos vesiculares. Finalmente, en los hígados que recibieron el carcinógeno y que además se alimentaron con la dieta hipercolesterolémica (DHC) se observó esteatosis, hipertrofia vesicular y zonas necróticas en la superficie del órgano (↑), caracterizadas por su aspecto granuloso y rojizo (**Fig 1**). Se realizó el cociente del peso hepático/peso total, en donde sólo los hígados HC y DHC mostraron incremento significativo en su peso, respecto a sus controles, CW y DCW. (**Fig 2**).



**Figura 1. La dieta HC induce fenotipo esteatótico en el hígado.** Hígados obtenidos de animales alimentados con una dieta balanceada (CW) o hipercolesterolémica (HC), hígados que no recibieron una dosis de N-acetilnitrosamina (-) y aquellos que recibieron la inyección de este carcinógeno (DEN). Los ratones HC muestran un fenotipo esteatótico mientras que los hígados DHC muestran además de este fenotipo, lesiones necróticas (↑) Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación.

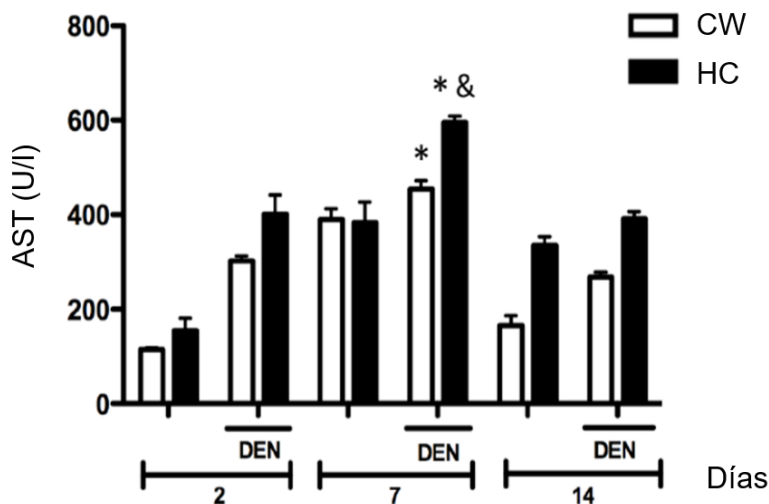


**Figura 2. La dieta HC incrementa el peso hepático.** Determinación del peso del hígado con respecto al peso total del animal. Los animales HC incrementaron su peso significativamente con o sin la aplicación de la dosis única de la N-dietilnitrosamina. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 10 animales \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW y HC respectivamente.

## 2. La dieta HC induce una respuesta hepática aguda

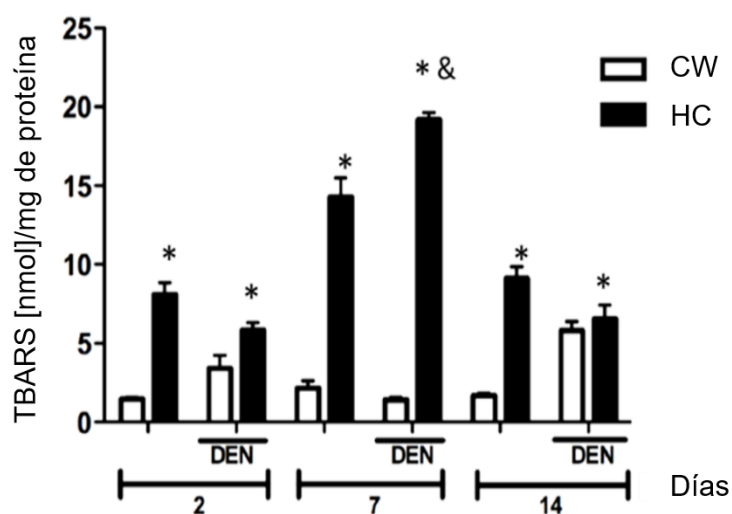
La cuantificación de la actividad de la transaminasa glutámico-oxaloacética sérica (AST) a los 2, 7 y 14 días de iniciados los tratamientos reveló que el incremento de la actividad de la AST inició desde los 2 días en los hígados DCW (1 vez), sin embargo los valores máximos (2 veces), se detectaron a los 7 días. En los hígados DHC el incremento fue mayor (4.5 veces). Por lo que se determinó que **la fase aguda** de respuesta hepática en nuestro modelo es a 7 días de tratamiento. A 14 días de tratamiento, la actividad de la AST disminuyó (1.5 veces) (**Fig 3**).

La determinación de lípidos oxidados se llevó a cabo mediante la cuantificación de la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a los mismos tiempos experimentales.



**Figura 3. La dieta HC promueve el daño hepático.** Cuantificación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa en la fracción sérica del suero a diferentes días de tratamiento. El tiempo de mayor actividad es de 7 días en los sueros HC y DHC. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW, &  $p \leq 0.05$  con respecto al DCW.

El contenido de TBARS en los hígados HC incrementó (3 veces) a partir de los 2 días; los hígados DHC tuvieron un incremento similar (2 veces). Sin embargo a los 7 días de tratamiento, se observó el contenido máximo de TBARS en los hígados HC y DHC de 4 y 4.5 veces, respectivamente. **(Fig 4).**

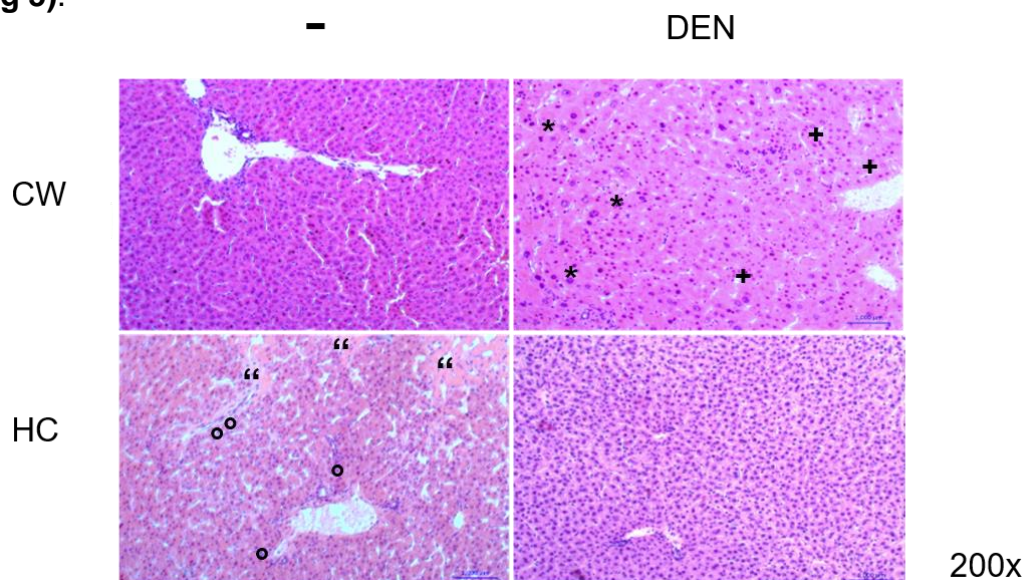


**Figura 4. La dieta HC incrementa la oxidación de lípidos celulares.** Los niveles de oxidación lipídica más elevados se registran en el día 7 en los tejidos HC y DHC. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW, &  $p \leq 0.05$  con respecto al DCW.



Los cambios celulares se determinaron mediante el análisis histológico de cortes con tinción de hematoxilina y eosina (H&E). La histología normal (CW) se caracteriza por células y núcleos regulares con proporciones fisiológica normales. Los cordones de hepatocitos (1 ó 2 hepatocitos de grosor) irradiaban desde la vena central hacia periferia del lobulillo clásico. Los sinusoides hepáticos, se observaron recubiertos por células endoteliales, con presencia de algunas células de Kupffer no activas (núcleos pequeños). En contraste, los hígados DCW exhibieron hepatocitos con núcleos atípicos y granulomas e infiltrado inflamatorio. Los hígados HC mostraron gran cantidad de células proinflamatorias (células mononucleadas) y esteatosis mixta (microvesicular y macrovesicular). Estos hallazgos se vieron incrementados en los hígados DHC, además de que se contaron mayor número de nucleolos/célula, que fueron distinguidos mediante su tinción basófila positiva. Finalmente, se observaron mayor número de células con anomalías histológicas por campo analizado

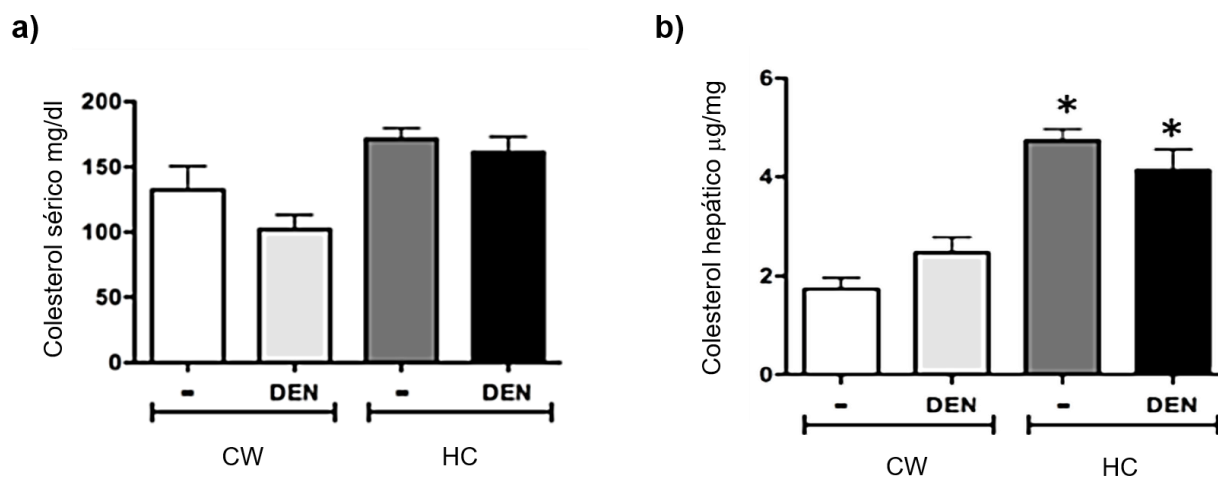
(Fig 5).



**Figura 5. La dieta HC induce alteraciones en los hepatocitos.** Cortes de tejido hepático (5µm) embebido en parafina y con tinción H&E tras 7 días de tratamiento (200x). Los cortes de los hígados DEN muestran hepatocitos con núcleos agrandados (\*) y esteatosis macrovesicular (+) mientras que los de los HC muestran zonas necróticas ( " ) que se distinguen por su coloración rosa pálido, infiltrado inflamatorio prominente ( ° ) y actividad mitótica elevada. Imágenes representativas de al menos 6 animales por grupo experimental

### 3. *El fenotipo esteatótico inducido por la dieta HC es debido a la acumulación hepática de colesterol*

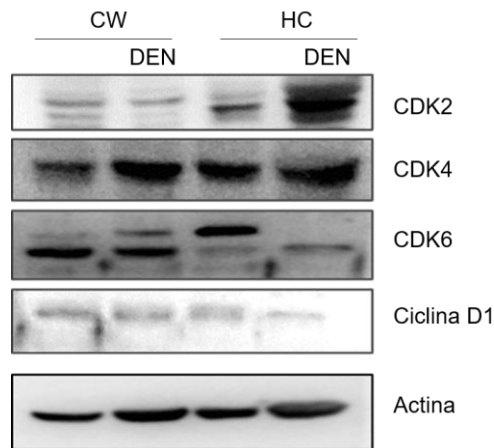
El contenido de colesterol en suero y en tejido hepático se cuantificó mediante el ensayo comercial (SPINREACT) (**Fig 6**). El contenido de colesterol sérico no reveló diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales (**Fig 6a**). En contraste, los hígados HC mostraron un incremento (~3 veces) de este lípido mientras que los hígados DHC tuvieron un incremento similar (2.5 veces) (**Fig 6b**).



**Figura 6.** La dieta HC provoca acumulación de colesterol en el tejido hepático. a) Colesterol sérico a 7 días de tratamiento. Los niveles de colesterol sérico no exhiben cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales b) Colesterol hepático. Los niveles de colesterol del hígado incrementaron significativamente en el grupo HC y DHC. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 10 animales \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW y HC respectivamente.

### 4. *La ingesta de la dieta HC modifica la expresión de enzimas involucradas en la regulación del ciclo celular*

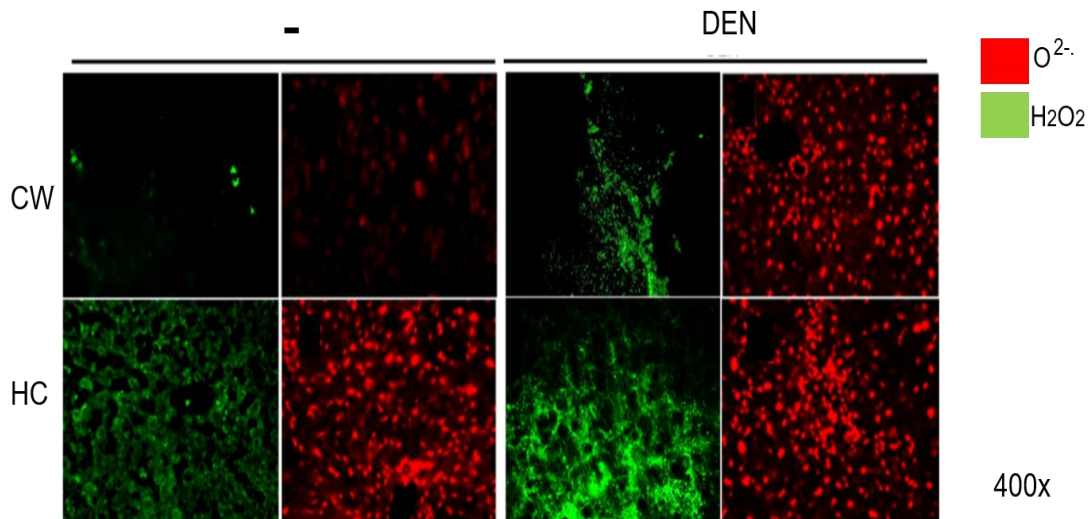
El inmunoanálisis contra las enzimas, CDK2, CDK4 y CDK6 y la ciclina D1 que participan en la transición de la fase G1-S en el ciclo celular, demostró que existe expresión diferencial de estas enzimas, entre los hígados DHC. Ya que se detectó incremento del contenido de CDK2 y CDK4 y disminución de la ciclina D1 (**Fig 7**).



**Figura 7. La dieta HC modifica la expresión de enzimas del ciclo celular.** Western Blot de proteína total hepática total contra CDK2/4/6 y Ciclina D1 a 7 días de tratamiento. Las muestras CW, DCW y HC no presentan cambios. Las muestras DHC muestran incremento del contenido de CDK2, CDK4 y la disminución de CDK6 y la Ciclina D1 comparado con su control. La imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

##### **5. La dieta HC induce estrés oxidante mediante el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

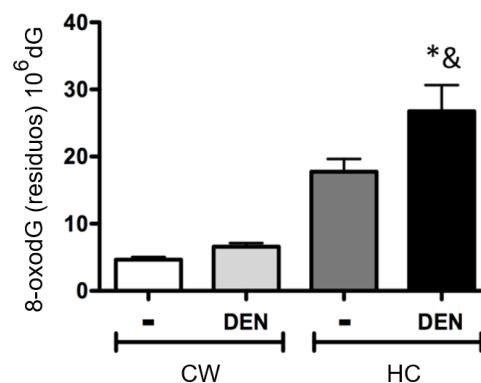
La detección de las especies reactivas de oxígeno (ROS), particularmente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, se llevó a cabo *in situ*, utilizando las sondas: 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) para la detección intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y dihidroetidio (DHE) para la detección intracelular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (rojo). Los hígados CW mostraron presencia discreta de ROS, mientras que, los hígados DCW incrementaron sustancialmente estas especies. Sorprendentemente, los observado en los hígados DCW. Por último, los hígados DHC revelaron hígados HC, exhibieron un patrón de generación de ROS muy siHC, exhibieron un patrón). de generación de ROS muy similar al incremento potenciado de generación de ROS (**Fig 8**)



**Figura 8. La dieta HC induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).** Detección de especies reactivas de oxígeno en criocortes de tejido hepático (5µm) se trataron con 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína para la detección intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y dihidroetidio para la detección intracelular de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (rojo) a 7 días de tratamiento. La presencia basal de ROS en los cortes CW incrementa en los cortes DCW. Mientras que los cortes HC exhiben generación de ROS similar a la inducida por el DEN. Las imágenes son representativas de al menos 3 cortes de animales diferentes.

### 6. La dieta HC induce daño al ADN mediante el incremento de ROS en hepatocitos

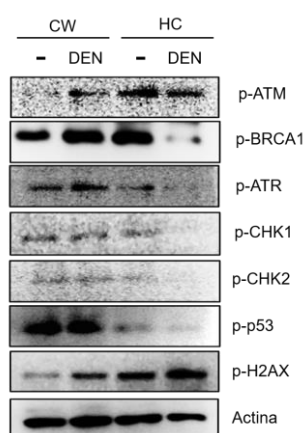
Se evaluó el efecto del incremento de generación de ROS, sobre la integridad del ADN mediante la cuantificación del aducto 8-OHdG por HPLC. Los resultados mostraron que la administración de la DEN (DCW), no fue suficiente para incrementar significativamente el aducto 8-OHdG, en comparación con su grupo control CW. Sin embargo, en los hígados HC la detección de este aducto aumentó (~3 veces) con respecto al control CW. Finalmente, los hígados DHC presentaron un incremento de 4 veces del 8-OHdG (Fig 9).



**Figura 9. La dieta HC incrementa el daño al ADN.** Detección del aducto 8-OHdG mediante HPLC. Se utilizó tejido fresco a 7 días de tratamiento. Los hígados DHC muestran un incremento significativo (2.5 veces) del aducto mientras que en los hígados DCW la detección del aducto no fue significativa. Las barras representan el promedio ± EE de al menos 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado \*p≤ 0.05 con respecto al CW, & p≤ 0.05 con respecto al DCW.

### 7. La dieta HC inhibe la expresión y actividad de enzimas relacionadas con la reparación del ADN

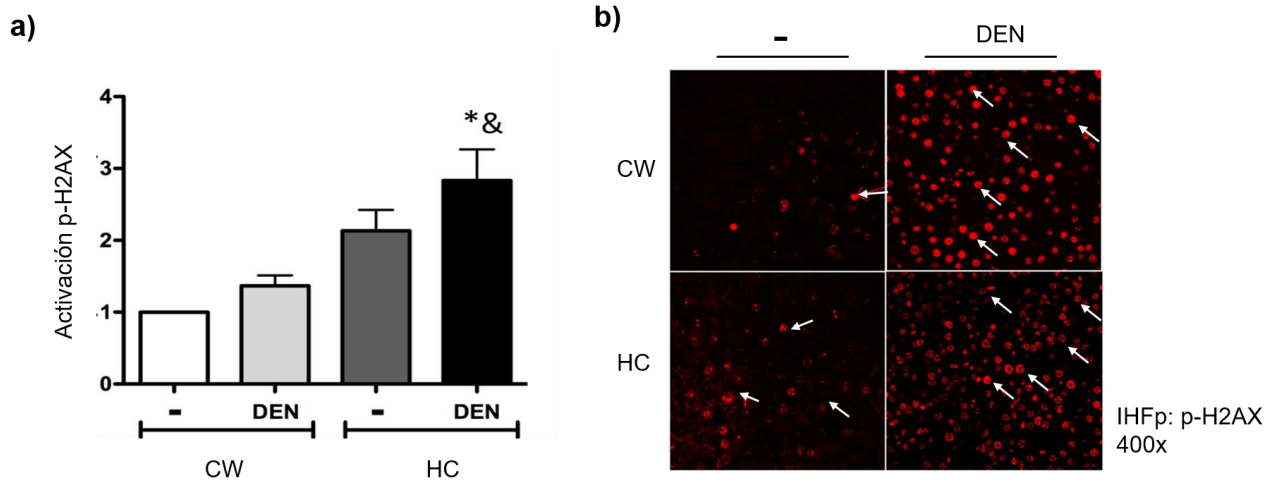
La actividad de las isoformas de las enzimas involucradas en la reparación del daño al ADN mostraron incremento en los hígados DCW (p-ATM, p-BRCA1, p-ATR, p-Chk1, p-Chk2, p-p53 y p-H2AX) mientras que, en los hígados HC disminuyó drásticamente (p-ATR, p-Chk1, p-Chk2, p-p53 y p-H2AX). Sorprendentemente, los hígados DHC mostraron abrogación completa, de las proteínas analizadas con excepción de p-H2AX (**Fig 10**).



**Figura 10. La dieta HC reduce la reparación del DNA.** Western blot de proteína total de tejido hepático a 7 días de tratamiento. Las muestras DCW muestran un cambio evidente en el contenido celular de p-H2AX cuando se compara con su control. Mientras que las muestras HC y DHC, el contenido de p-BRCA1, p-ATR, p-CHK1, p-CHK2 y p53 disminuye hasta ser indetectable. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

Se realizó un inmunoanálisis para detectar el contenido de la isoforma activa de la histona 2AX. El resultado mostró que la actividad de la H2AX incrementó (0.5 veces) tras 7 días de tratamiento los hígados DCW. Además, la dieta HC, incluso en ausencia del carcinógeno, incrementó la actividad de esta histona. Finalmente, se observó un efecto aditivo del carcinógeno DEN más la dieta HC en la actividad de la H2AX en los hígados DHC (**Fig 11a**). Este resultado fue

corroborado mediante una inmunofluorescencia donde se detectó la expresión de la pH2AX mediante microscopía confocal (**Fig 11b**).

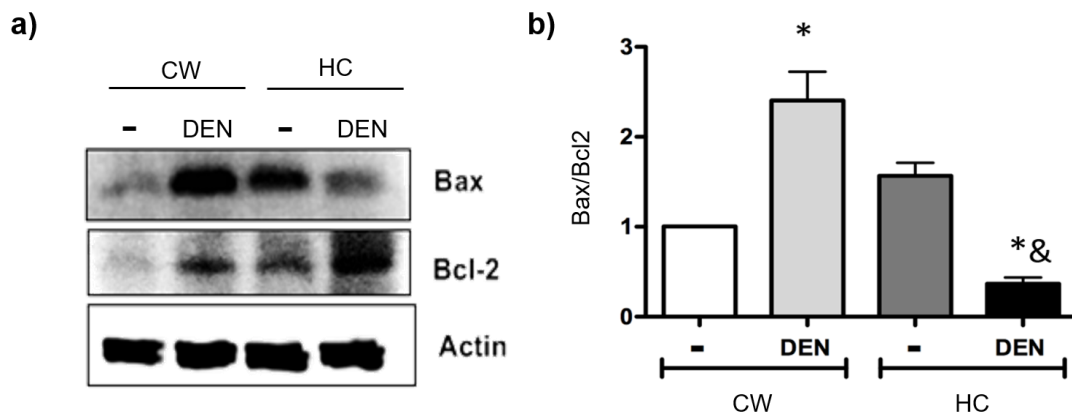


**Figura 11. La dieta HC induce la activación de la histona 2AX.** a) Densitometría de la pH2AX a 7 días de tratamiento. Las muestras HC y DHC inducen la activación de la histona 2AX, mientras que las muestras DCW no muestran activación significativa ; b) Inmunofluorescencia contra la pH2AX Cortes hepáticos (5µm) embebidos en parafina fueron tratados con anti pH2AX, los cortes DCW y DHC muestran la activación de la histona más elevada , con activación discreta en los cortes HC. Las barras representan el promedio ± EE de al menos 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado \*p≤ 0.05 con respecto al CW, & p≤ 0.05 con respecto al DCW.

### 8. La dieta HC tiene un efecto anti-apoptótico durante la fase de respuesta aguda

El cociente del contenido de Bcl2, una proteína antiapoptótica y Bax su contraparte antagónica, se calculó para determinar la tasa de sobrevivencia celular (**Fig 12**). Los hepatocitos de los hígados DCW presentaron un índice apoptótico mayor, mediado por la regulación positiva de Bax, mientras que los hepatocitos DHC evadieron la apoptosis al incrementar en la expresión de Bcl-2. Es importante señalar, que los hepatocitos HC y DCW muestran el mismo patrón de expresión de estas enzimas (**Fig 12a-b**).





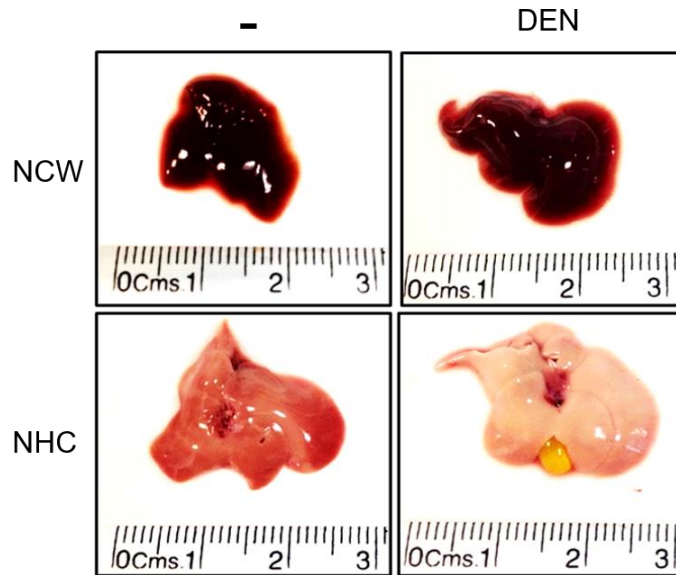
**Figura 12. La dieta HC promueve un efecto antiapoptótico en los hepatocitos.** a) Western blot de proteína a 7 días de tratamiento. Las muestras DCW contienen niveles más elevados de Bax con respecto a Bcl2, mientras que las muestras DHC exhiben un comportamiento contrario; b) Cociente de expresión de Bax/Bcl2 a 7 días de tratamiento. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW, &  $p \leq 0.05$  con respecto al DCW.

## II. EL CO-TRATAMIENTO CON N-ACETILCISTEÍNA (NAC) PROTEGE ANTE EL DAÑO INDUCIDO POR LA DIETA HC

### 1. La NAC inhibe el daño hepático agudo inducido por la dieta HC

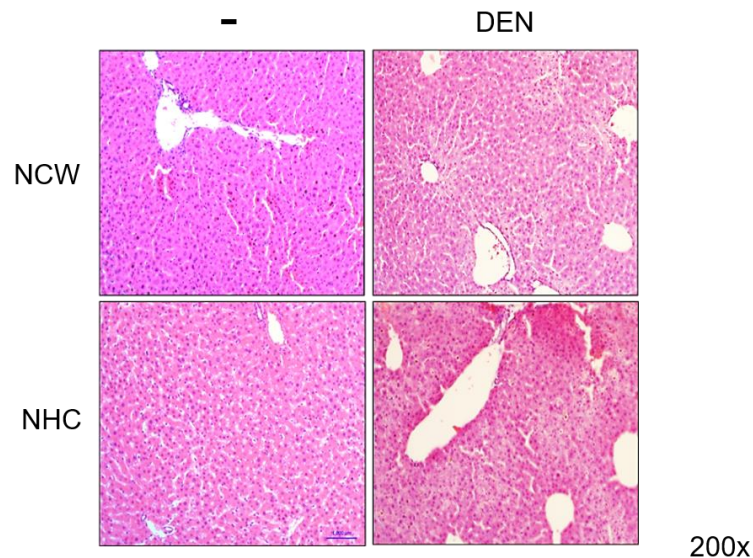
Se suplementó con NAC (80mmol/L) el agua de los animales experimentales y se ofreció *at libitum* durante 7 días. Las raciones diarias de agua suplementada con NAC, se preparaban diariamente para evitar oxidación del NAC y su máxima disponibilidad en el agua. Los resultados mostraron que los hígados de los animales a los que se les trató con el carcinógeno DEN y NAC más la dieta balanceada Chow (NDCW), no presentaron alteraciones evidentes comparados con los hígados DCW. Por otra parte, los hígados de los animales a los que se trató con NAC y la dieta HC (NHC), exhibieron el fenotipo esteatótico típico observado en los hígados HC. Finalmente, se observó que los hígados de los animales a los que se les trató con NAC, el carcinógeno y la dieta HC (NDHC)

también mostraron fenotipo esteatótico, sin embargo, no se observó daño evidente en la superficie del órgano (**Fig 13**).



**Figura 13. La N-acetilcisteína (NAC) mejora el fenotipo de los hígados HC.** Exploración hepática macroscópica. Los hígados NHC muestran el fenotipo esteatótico reconocido en los animales HC, sin embargo los hígados DNHC, no presentan daño macroscópico aparente. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación.

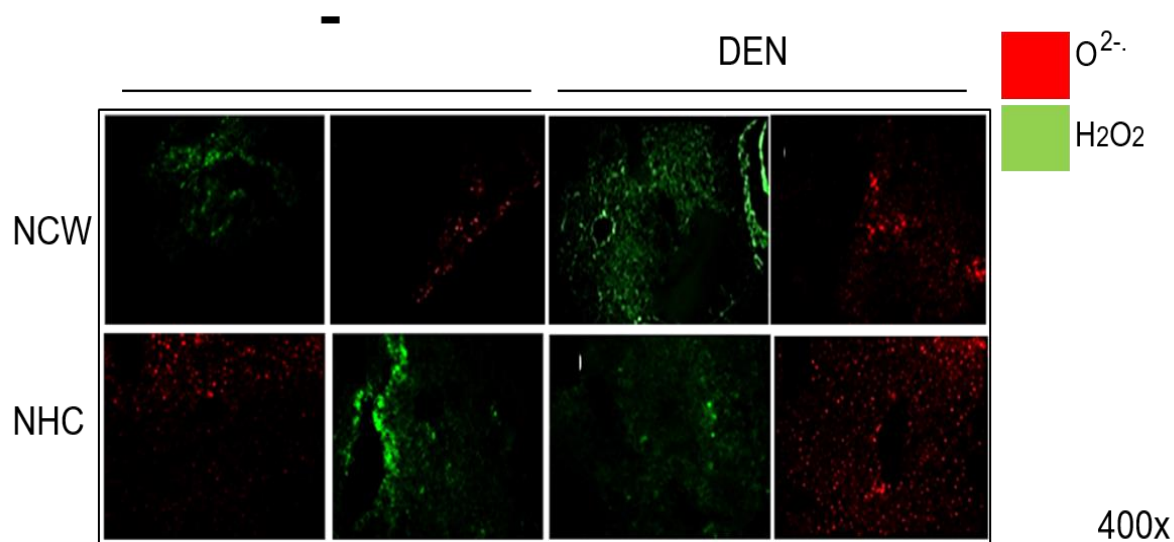
El análisis histológico en cortes de tejido embebido en parafina y con tinción H&E, mostró que en los cortes NDCW y NDHC el tejido muestra arquitectura muy similar a la de los hígados control NCW y NHC respectivamente (**Fig 14**).



**Figura 14. La N-acetilcisteína (NAC) reduce el daño hepático en los hígados HC.** Cortes de tejido hepático (5µm) incluido en parafina y posteriormente teñido con hematoxilina y eosina (200x) a 7 días de suplementación con N-acetilcisteína (80mmol/L) (NAC) en el agua de beber. Se puede observar la recuperación del tejido con respecto a las imágenes obtenidas de los hígados tratados sin la adición de NAC, sin embargo, el fenotipo inducido por la dieta HC, es decir, esteatótico se sigue presentando en todos los hígados analizados. Imágenes representativas de al menos 3 animales por grupo experimental.

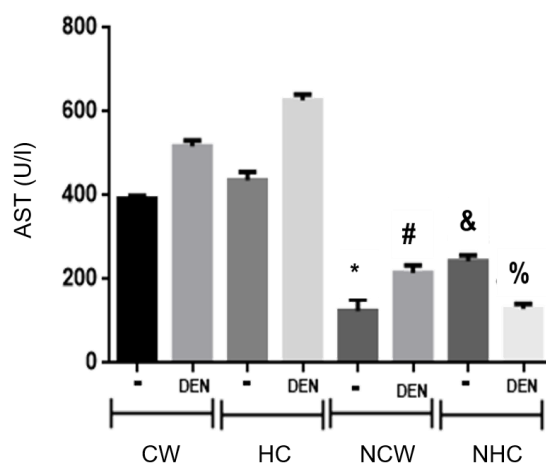


Se detectó también la generación de ROS *in situ* sobre los tejidos de los animales tratados con NAC, donde se observó disminución sustancial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> hasta niveles similares a los exhibidos por los hígados NCW. (Fig 15).



**Figura 15. La N-acetilcisteína (NAC) reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los hígados HC.** Cortes frescos de tejido hepático (5µm) se trataron con 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína para la detección intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y dihidroetidio para la detección intracelular de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (rojo) tras 7 días de tratamiento de todos los grupos experimentales más la administración de N-acetilcisteína (80mm/L). Las imágenes obtenidas muestran que todos los grupos experimentales que fueron tratados conjuntamente con NAC (NCD, NDCW, NHC y NDHC) disminuyeron la generación tanto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) como de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (rojo). Las imágenes son representativas de al menos 3 cortes de animales diferentes.

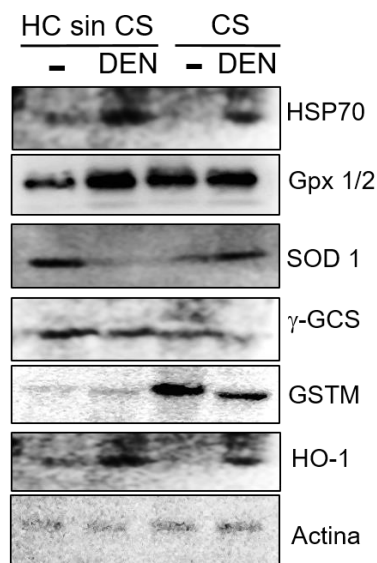
La actividad de la AST también disminuyó significativamente (3 veces) en los animales NDCW y NDHC y hasta 5 veces en los hígados NDHC. (Fig 16).



**Figura 16. la N-acetilcisteína (NAC) disminuye el daño hepático inducido por la dieta HC.** Cuantificación de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa en el suero. Los grupos CW, DCW, HC y DHC fueron además tratados con N-acetilcisteína (NAC) (80mmol/L) en el agua de beber *at libidum*. El resultado muestra que los grupos que fueron cotratados con NAC (NCW, NDCW, NHC, NDHC), disminuyeron significativamente los niveles de activación de la AST. Las barras representan el promedio ± EE de al menos 3 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado \*p ≤ 0.05 con respecto al CW, # p ≤ 0.05 con respecto al DCW, & p ≤ 0.05 con respecto al HC, % p ≤ 0.05 con respecto al DHC.

2. **El co-tratamiento con NAC inhibe el daño inducido por la dieta mediante el incremento del contenido de enzimas antioxidantes y relacionadas con la síntesis de glutatión**

Se realizó un inmunoanálisis contra el citocromo P450 (CYP450), que es una enzima encargada de realizar la biotransformación hepática de diversos agentes xenobióticos, entre ellos, la DEN. El contenido de CYP450 en las muestras NDCW, NHC y NDHC incrementó con respecto a sus controles. Así mismo, la subunidad catalítica o moduladora de la glutatión S-transferasa GSTm, una enzima determinante en el ciclo de reciclaje del glutatión, incrementó su contenido en los hígados NDCW; siendo el incremento más evidente el observado en las muestras NHC y NDHC. Otra de las enzimas relacionadas fue la enzima de detoxificación HO-1, que no mostró cambios de expresión en ninguno de los grupos experimentales (**Fig 17**).

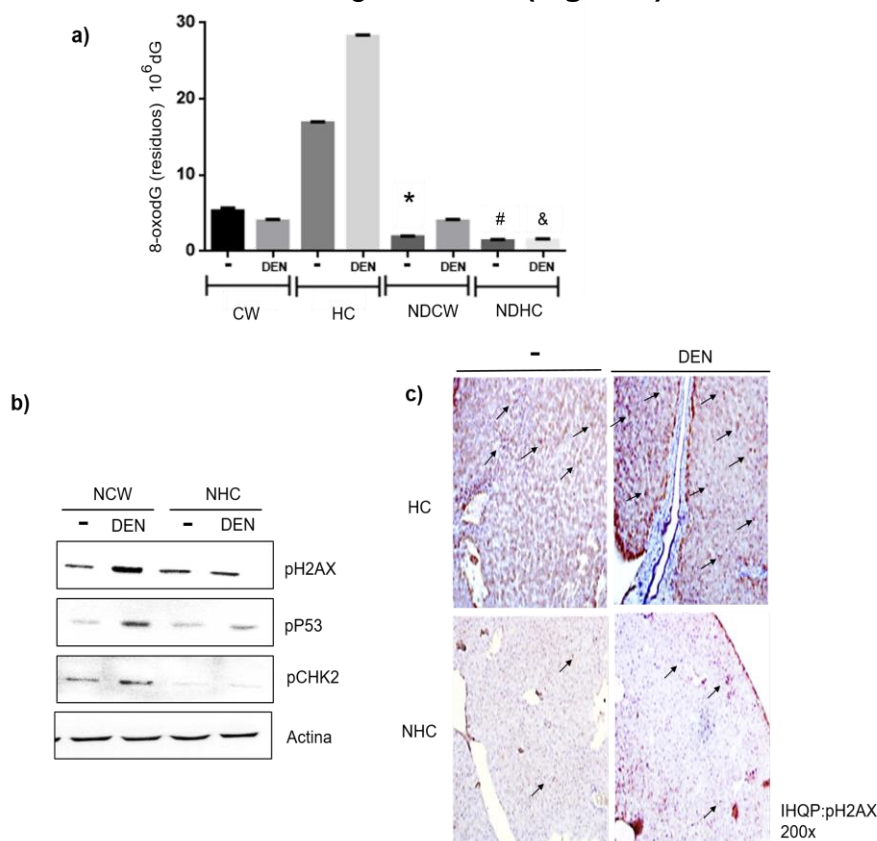


**Figura 17. La N-acetilcisteína (NAC) incrementa la expresión de enzimas de detoxificación y antioxidantes en los hígados HC.** Análisis por Western Blot del contenido de proteínas de respuesta antioxidante tras 7 días de tratamiento CYP450, HO-1 y GSTm. La administración de DEN causa decremento de la expresión de las enzimas analizadas, mientras que la dieta HC induce su restablecimiento.. La imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

### 3. El co-tratamiento con NAC previene el daño oxidante al ADN inducido por la dieta HC

El contenido del aducto 8-OHdG en los hígados NDCW, disminuyó significativamente en los grupos experimentales suplementados. Los hígados NHC mostraron un decremento de 9 veces del contenido de 8-OHdG, mientras que en los hígados NDHC la disminución registrada es de aproximadamente de 19 veces (Fig. 18a). Además, se determinó que en los hígados NDHC el contenido de la isoforma activa de Chk2, P53 y H2aX disminuyó en comparación con los hígados DHC (Fig. 18b). Finalmente se llevó a cabo una inmunohistoquímica contra la pH2aX que demostró la activación de esta histona

solamente en los cortes de los hígados DHC (Fig. 18c)



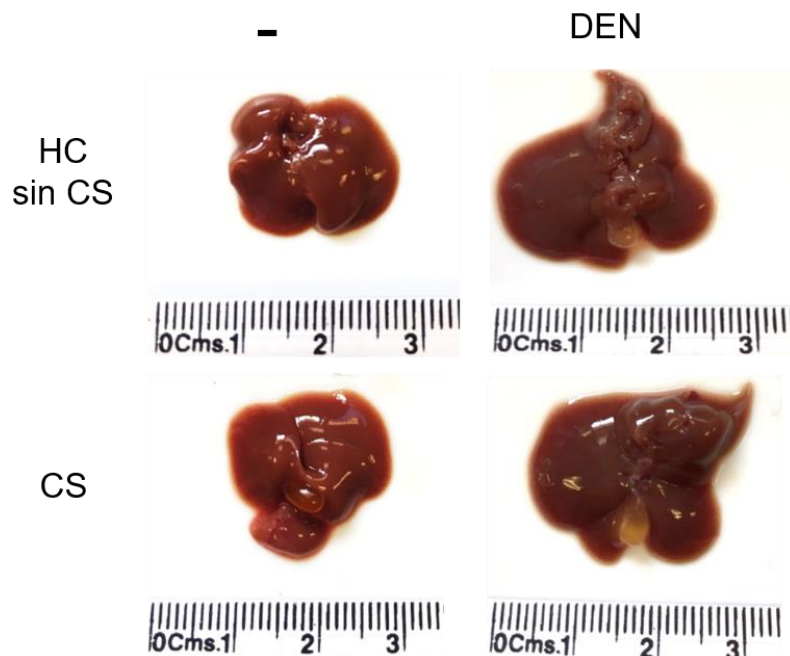
**Figura 18. La N-acetilcisteína (NAC) disminuye el daño al ADN inducido por la dieta HC. a) Detección del aducto 8-OHdG mediante HPLC.** Se determinó el daño al ADN en tejido hepático mediante la cuantificación del aducto 8-OHdG utilizando tejido hepático fresco tras 7 días de iniciado el tratamiento más la administración de N-acetilcisteína (NAC) (80mmol/L). Los tejidos obtenidos de todos los grupos experimentales que fueron suplementados con NAC, disminuyeron drásticamente la cantidad de 8-OHdG; **b) Western blot.** Proteína total de tejido hepático se analizó de animales tratados más la administración de N-acetilcisteína (NAC) (80mmol/L) tras 7 días de tratamiento. **c) Inmunohistoquímica en cortes embebidos en parafina** para la detección *in situ* de pH2AX cortes hepáticos (5 $\mu$ m) fueron tratados conforme al protocolo para inmunofluorescencia en donde es evidente la activación más elevada en los cortes de hígados DCW y DHC con activación discreta en los cortes HC. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 6 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW, #  $p \leq 0.05$  con respecto al HC y & $p \leq 0.05$  con respecto al DHC..

### III. EL COLATO DE SODIO NO TIENE EFECTO EN LA FASE DE RESPUESTA HEPÁTICA AGUDA INDUCIDA POR LA DIETA HC

Se alimentó a los animales experimentales con una dieta HC sin colato de sodio (HC sin CS) ó con una dieta balanceada, enriquecida con 0.5% de colato de sodio (CS) durante durante un periodo de 7 días *at libidum*, y se dividieron en diferentes grupos experimentales con o sin carcinógeno (Tabla 1).

#### 1. El colato de sodio no induce daño en el tejido hepático

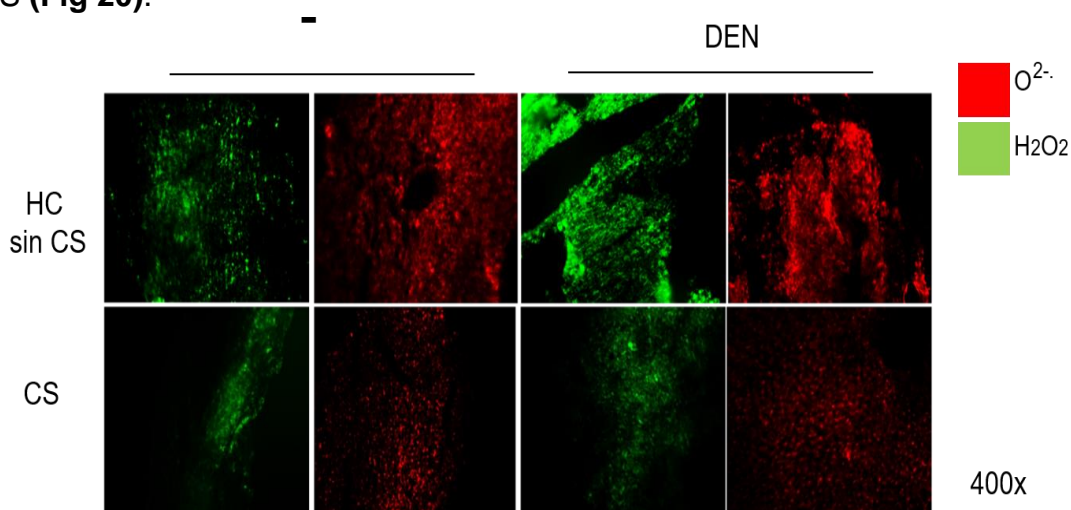
La inspección hepática macroscópica mostró que, los hígados HC sin CS y los hígados que además recibieron el carcinógeno DEN (DHC sin CS), no presentaron daño visible en la superficie del órgano; por otro lado, los hígados de los animales que fueron alimentados con la dieta CS y aquellos que además recibieron la dosis de DEN (DCS), también presentaron un fenotipo hepático normal (**Fig 19**).



**Figura 19. El colato de sodio no induce cambios en el fenotipo hepático**, Inspección macroscópica del tejido hepático. Los hígados de animales alimentados con una dieta hipercolesterolémica sin colato de sodio (HC sin CS) o una dieta balanceada suplementada con colato de sodio (CS), tratados o no con una dosis de N-acetilnitrosamina (DEN, 10 $\mu$ g/kg). Los hígados HC sin CS no exhiben fenotipo estatótico; los hígados CS no presentan alteraciones aparentes; los hígados DHC sin CS y DCS muestran un ligero incremento en talla. Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación.

## 2. El colato de sodio no induce la generación de ROS

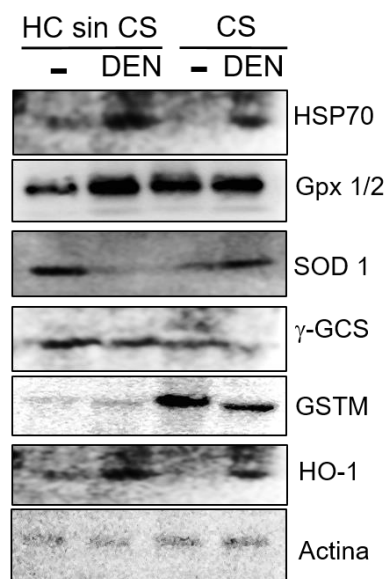
La determinación de ROS *in situ* en los cortes obtenidos de todos los animales experimentales tratados con las HC sin CS y CS. Las imágenes analizadas muestran que los hígados DHC sin CS incrementaron la generación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y O<sub>2</sub><sup>-</sup> (rojo), mientras que los hígados CS mostraron presencia basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y O<sub>2</sub><sup>-</sup> (rojo) con un ligero incremento cuando se agregó el carcinógeno DCS (Fig 20).



**Figura 20. El colato de sodio no induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).** Cortes frescos de tejido hepático (5µm) se trataron con 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína para la detección intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y dihidroetidio para O<sub>2</sub><sup>-</sup> (rojo) a 7 días de tratamiento. La dieta HC sin CS o la dieta (CS) no inducen la generación de ROS, únicamente en presencia de DEN. Las imágenes son representativas de al menos 3 cortes de animales diferentes.

## 3. El colato de sodio no modifica la expresión de enzimas antioxidantes

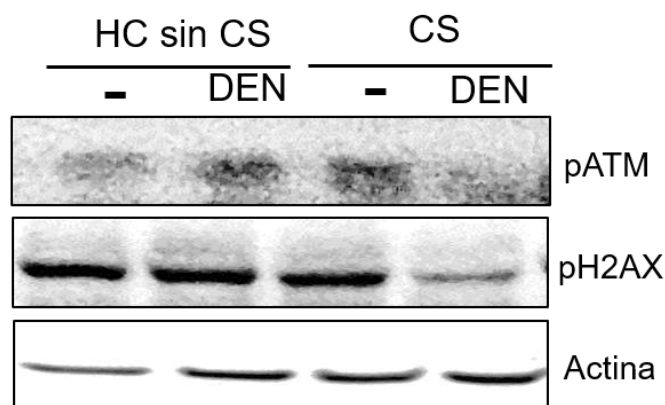
El inmunoanálisis contra las proteínas y enzimas que participan en la respuesta celular antioxidante mostró que disminuyó el contenido de la GPX 1/2, HSP70, GSTm y la HO-1 en los hígados HC sin CS con respecto a los hígados DHC sin CS. Así mismo, no se observó cambio significativo en la expresión de estas enzimas en los hígados CS. Sin embargo, en los hígados DCS, se observó incremento en la concentración de la HSP70, SOD1, HO-1, (Fig 21).



**Figura 21. El colato de sodio no modifica la expresión de enzimas antioxidantes.** Proteína total de tejido hepático se analizó por Western Blot tras 7 días de ingesta de las dietas HC sin CS o (CS). Las muestras obtenidas de hígados DHC sin CS muestran incremento en el contenido de enzimas antioxidantes al igual que las muestras CS tratadas con DEN. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

#### 4. El colato de sodio no induce daño oxidante del ADN

El daño oxidante generado por la ingesta de la dieta HC, afecta el ADN, por lo que se evaluó el efecto de las dietas HC sin CS y la dieta CS sobre esta biomolécula. El inmunoanálisis para la detección de la H2AX activa mostró que, sólo los hígados tratados con DEN (DHC sin CS y DCS) la actividad de esta histona incrementó (**Fig 22**).



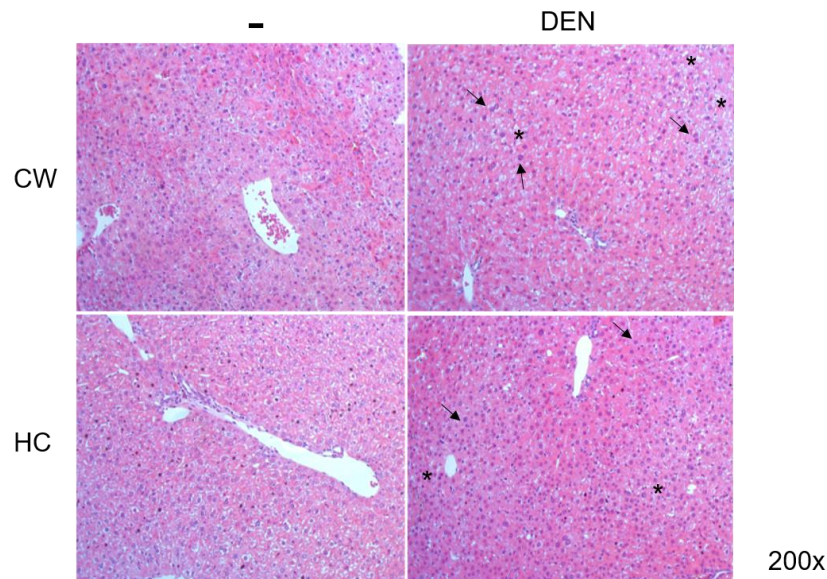
**Figura 22. El colato de sodio no induce daño al DNA.** Proteína total de tejido hepático se analizó por Western Blot tras 7 días de ingesta de la dieta hipercolesterolémica sin colato de sodio (HC) o la dieta balanceada suplementada con colato de sodio (CS). Las muestras obtenidas de hígados CS no muestran cambios en la expresión de las proteínas pATM y pH2AX. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.



#### IV. EFECTO HEPÁTICO HORMÉTICO EN RESPUESTA AL DAÑO INDUCIDO POR LA DIETA HC

##### 1. *Tras 14 días de tratamiento, el hígado presenta Disminución del daño inducido por la dieta HC*

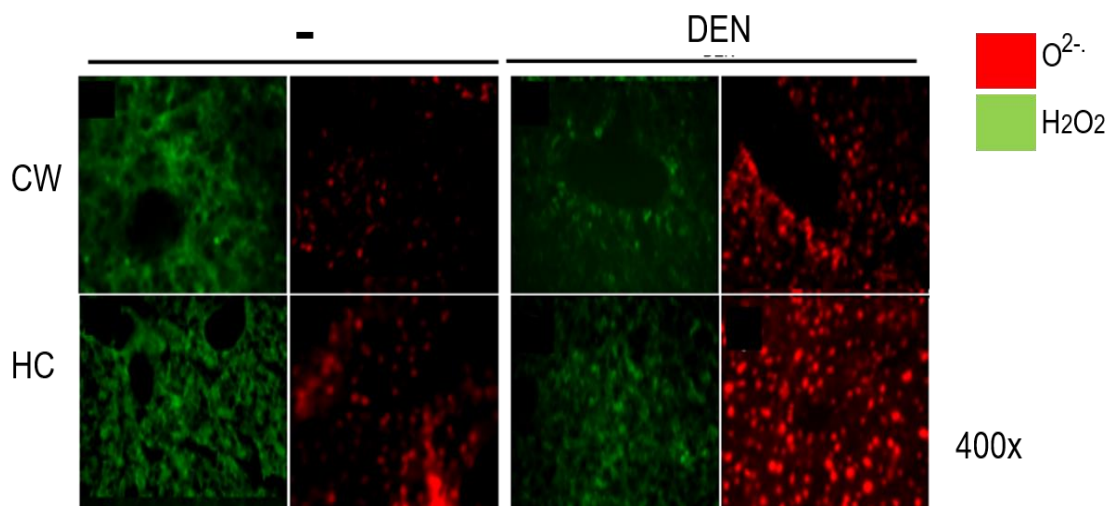
A los 14 días de iniciado el tratamiento, se analizaron histológicamente los hígados de los animales de los grupos experimentales, mediante la tinción con H&E. Los cortes DCW mostraron hepatocitos apoptóticos, acumulación lipídica - determinada por la tinción pálida de los citoplasmas- y esteatosis mixta (marcada con flechas negras). Sin embargo, los hígados HC mostraron recuperación en la arquitectura hepática con respecto a lo observado a 7 días, durante la fase de respuesta aguda inducida por la ingesta de la dieta HC. Del mismo modo, los hígados DHC exhibieron menos daño tisular, con poca presencia de hepatocitos picnóticos, con núcleos histológicamente apoptóticos, incremento de la tasa mitogénica, esteatosis multivesicular y activación de células de Kupffer, que se pueden distinguir por sus núcleos más prominentes y densos, así como un incremento importante del infiltrado celular que denota inflamación localizada **(Fig. 23)**.



**Figura 23. El tejido hepático se recupera de la fase aguda inducida por la dieta HC tras a los 14 días de tratamiento.** Cortes de tejido hepático (5µm) incluido en parafina y posteriormente teñido con hematoxilina y eosina (200x) a 14 días de tratamiento. Los cortes DCW presentan núcleos picnóticos de hepatocitos en apoptosis ( ), esteatosis mixta (\*), mientras que los cortes HC, recuperaron su arquitectura fisiológica normal, finalmente los cortes de los hígados DHC también exhibieron células apoptóticas así como esteatosis. Imágenes representativas de al menos 6 animales por grupo experimental.

## 2. La generación de ROS observada durante la fase de respuesta aguda disminuye, en la fase de adaptación

La detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub><sup>-</sup> *in situ*, reveló que en cortes DCW tras 14 días de iniciado el tratamiento, las ROS disminuyeron a niveles basales en los hígados DCW al igual que en los hígados HC y DHC. (Fig 24).



**Figura 24. Disminución de las especies reactivas de oxígeno (ROS) a 14 días de ingesta de la dieta HC.** Cortes frescos de tejido hepático (5µm) se trataron con 2'-7'- diclorodihidrofluoresceína para la detección intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verde) y dihidroetidio para la detección intracelular de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (rojo) a 14 días de tratamiento. Las ROS disminuyen en todos los grupos experimentales (DCW, HC y DHC) con respecto a lo observado a 7 días de tratamiento,. Las imágenes son representativas de al menos 3 cortes de animales diferentes.



Finalmente se determinó el daño hepático mediante la actividad de la AST, que también disminuyó drásticamente (~1.5 veces)

## **V. FASE DE INICIACIÓN TUMORAL**

### **1. La ingesta prolongada de la dieta HC induce la tumorigénesis**

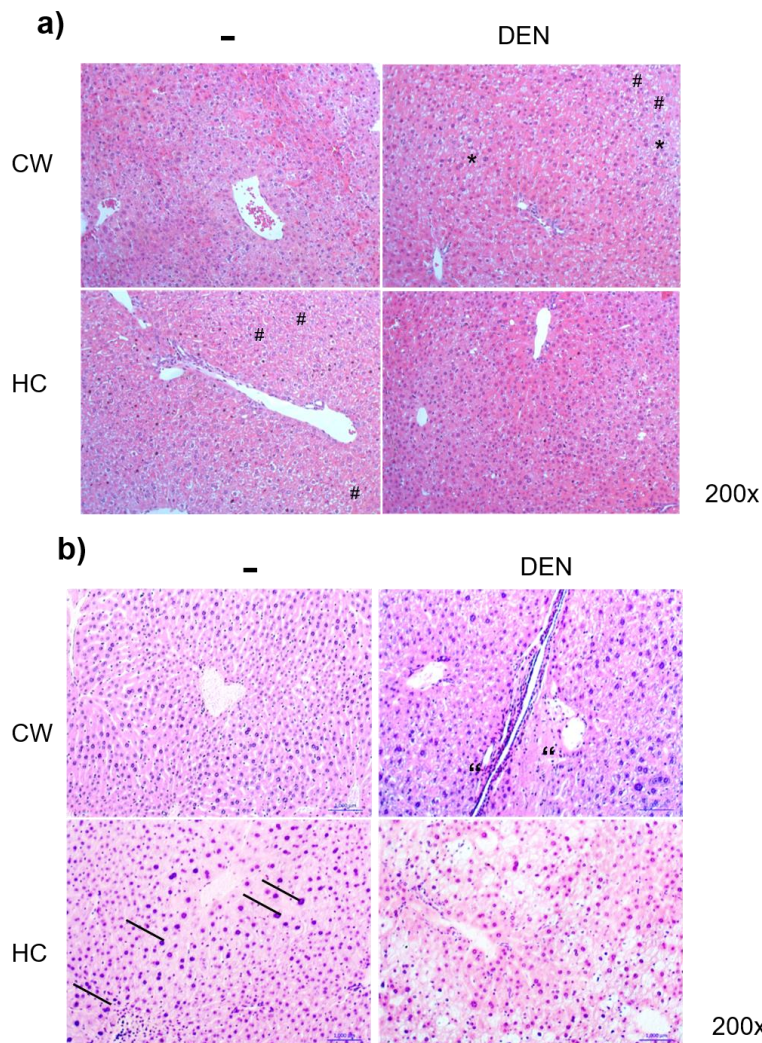
- **Cambios histológicos (1 mes)**

El análisis histológico de los hígados de los animales experimentales tras 1 y 3 meses de ingesta de la dieta mostró que los hígados DCW a 1 mes de tratamiento, presentaron un incremento en el número de células apoptóticas, hepatocitos con acumulación lipídica, diferenciados por la presencia de un citoplasma claro, sin tinción; los hígados HC presentaron esteatosis multivesicular, incremento en el número de núcleos picnoticos y un elevado índice mitótico, determinado por el incremento en el número de células binucleadas observadas por campo analizado, con respecto a los hígados CW. Además los hígados DHC mostraron incremento en la esterosis multivesicular y presencia de infiltrado inflamatorio (**Fig 25a**).

- **Cambios histológicos (3 meses)**

Los hígados DCW mostraron esteatosis mixta, infiltración celular con granulomas atípicos, (células polimorfonucleadas). Por otro lado, los hígados HC mostraron la histología típica del carcinoma difuso, en el que se puede observar la pérdida de la relación núcleo/citoplasma en los hepatocitos, con núcleos activos, alta actividad mitótica y metabólica que se denota por su tinción acidófila. Además se observó incremento en el infiltrado celular y la presencia de células transformadas neoplásicas, por primera vez en todos los tiempos analizados, lo

que indica displasia en el tejido. Se observó esteatosis microvesicular. El hallazgo más importante de este análisis fue la pérdida de la estructura histológica hepática normal, que es una característica inequívoca del cáncer. Finalmente los cortes DHC mostraron daño potenciado, en comparación con los hígados HC; esteatosis mixta, correspondiente a ambas agresiones, núcleos con cromatina distendida y nucléolos activos (+5) que hicieron evidente la clasificación de células aneuploides. Los hallazgos histológicos a este tiempo definen a un tumor maligno que proviene de las células epiteliales (**Fig. 25b**).



**Figura 25. La ingesta prolongada de la dieta HC induce transformación celular.** Cortes de tejido hepático (5µm) embebido en parafina y con tinción H&E (200x); a) Cortes de los hígados con 1 mes de tratamiento. Los cortes DCW muestran hepatocitos apoptóticos (#) esteatosis macrovesicular; los cortes HC muestran zonas esteatosis multivesicular (\*) y hepatocitos binucleados. Finalmente los hígados DHC muestran infiltrado inflamatorio; b) Los cortes DCW presentan infiltrado inmune (\*\*), mientras que los cortes HC exhibe células transformadas neoplásicas (l); los cortes DHC presentaron la histología propia de un carcinoma difuso. Imágenes representativas de al menos 6 animales por grupo experimental

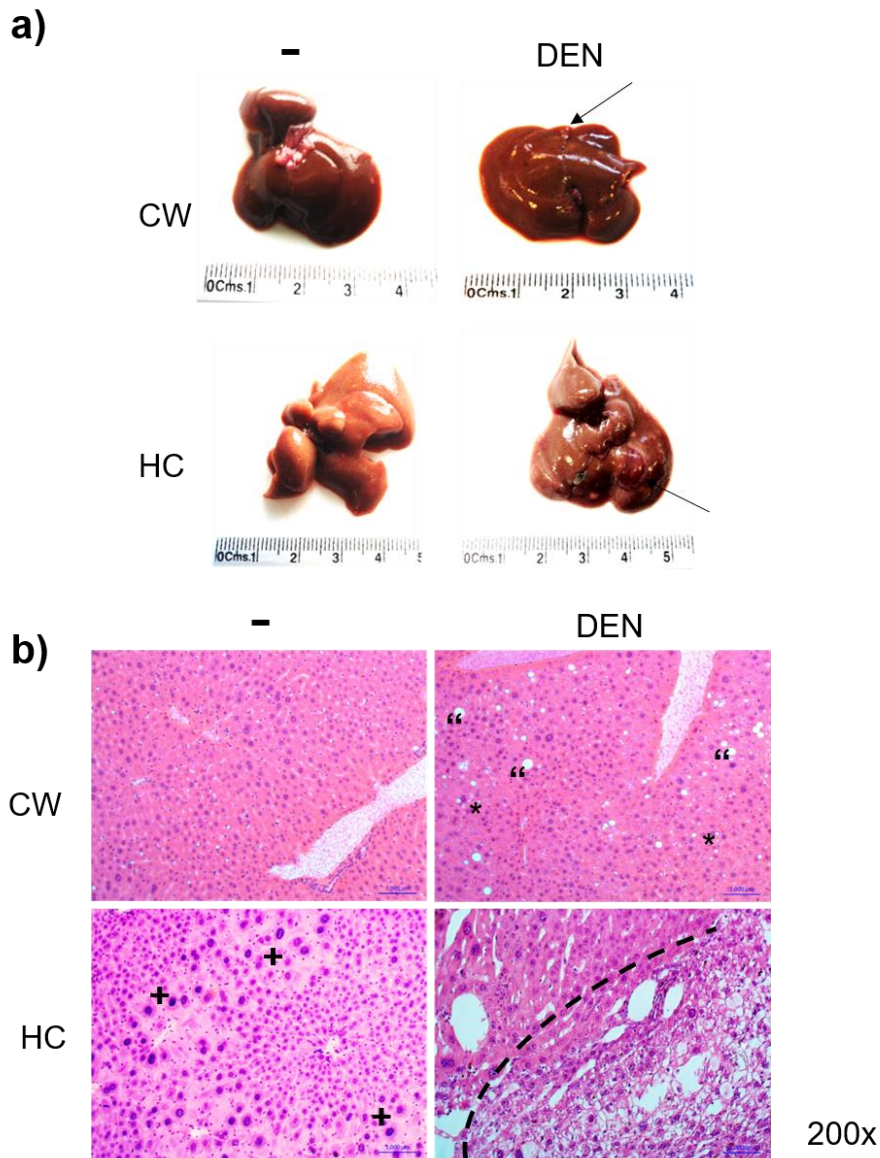
## VI. FASE DE PROGRESIÓN TUMORAL

### 1. *La dieta HC acelera la progresión tumorigénica inducida por la DEN.*

Tras 5 meses de tratamiento se llevó a cabo el análisis macroscópico de los órganos en donde se observó que los hígados DCW presentaron hipertrofia y varias zonas tumorales de forma redonda regular, que sobresalían del resto del tejido por ser de un color rosa pálido. Los hígados HC, presentaron el fenotipo esteatótico observado desde los primeros días de la ingesta de la dieta, con la adición de zonas de textura grumosa en la superficie, que contrasta con el aspecto de los hígados de condiciones fisiológicas normales (CW). Finalmente, los hígados DHC presentaron hipertrofia, sin embargo, el número de tumores encontrados incrementó significativamente con respecto a los observados en los hígados DCW (**Fig 26a**).

El análisis histológico de estos órganos reveló que los hígados DCW presentaron estatis macrovesicular principalmente, incremento en el número de núcleos picnóticos y anomalías celulares como, cambios en la proporción de núcleo/citoplasma, núcleos acidófilos y cromatinas distendidas. Los hígados HC mostraron un incremento de células atípicas, que se caracterizan por ser más grandes y con núcleos prominentes e irregulares, que representan características determinantes de las células transformadas. Todos los campos analizados de los cortes DHC, mostraron pérdida evidente de la histología hepática normal, que hizo posible la clasificación de zonas en el tejido. El tejido circundante (ST) presenta células histológicamente normales con estatis y la zona tumorigénica (T) está compuesta de células gigantes respecto al tamaño

de las células del tejido circundante; más de cinco nucleolos activos y estructuras mitóticas atípicas. Estas células transformadas predominan respecto a las células de fisiología típica. Estas características hicieron posible la identificación de un carcinoma poco diferenciado, que histológicamente sugiere, un proceso metastásico acelerado (Fig 26b).

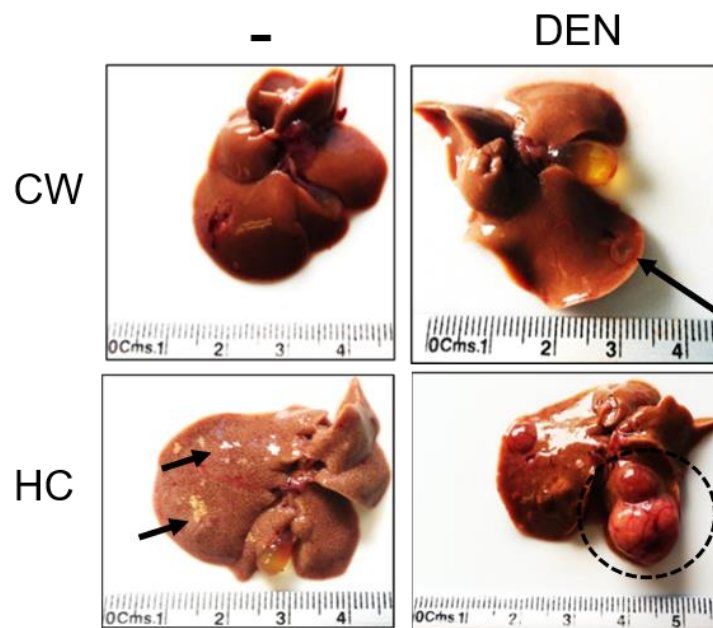


**Figura 26. La ingesta prolongada de la dieta HC induce formación de tumores.** a) Hígados obtenidos de animales alimentados con una dieta balanceada (CW) o hipercolesterolemica (HC) a 5 meses de tratamiento. Los hígados DCW presentan lesiones de color pálido y forma redonda (|). Los hígados HC muestran fenotipo esteatótico típico, mientras que los hígados DHC presentan tumores grandes (|). b) Análisis histológico correspondiente a los hígados a 5 meses de tratamiento. Los cortes DCW presenta estatois macrovesicular ("), núcleos picnóticos (\*), los cortes HC se pueden observar células atípicas (+), finalmente los cortes DHC presentan esteatosis multivesicular, con pérdida evidente de la histología hepática normal, establecimiento de bordes que circundan la zona tumorigénica (- - -). Imágenes representativas de al menos 10 animales por grupo experimental

## VII. CARACTERIZACIÓN DEL TUMOR INDUCIDO POR EL CARCINÓGENO EN PRESENCIA DE LA DIETA HC

### 1. La dieta HC promueve más tumores de mayor tamaño en el hígado

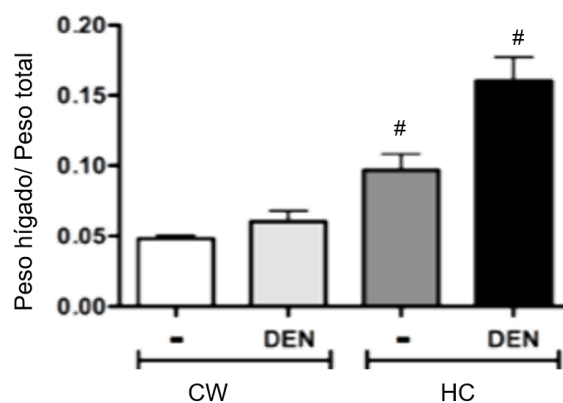
El análisis macroscópico mostró que tumores observados en los hígados DCW presentaron diversos tumores, que se observaron de forma circular, con un tono más pálido que la del resto del hígado, además, hipertrofia hepática y vesicular. Sin embargo, los hígados HC mostraron un fenotipo esteatótico y la presencia de mayor número de lesiones presentes en todos los lóbulos del órgano. Sorprendentemente, los hígados DHC mostraron varios tumores de gran tamaño y altamente vascularizados; además de lesiones más pequeñas distribuidas en todos los lóbulos del órgano (FIG 27).



**Figura 27. El colesterol promueve la formación de tumores en el hígado.** Inspección macroscópica del tejido hepático tras 8 meses de tratamiento. Los hígados DCW muestran lesiones en la superficie del tejido (↑); los hígados HC presentan mayor número de lesiones y fenotipo esteatótico; los animales DHC desarrollaron tumores grandes y vascularizados (----); los hígados HC sin CS no desarrollaron tumoraciones o lesiones aparentes, finalmente los hígados DHC sí desarrollaron tumoraciones semejantes a las observadas en los hígados DHC. Los hígados DCS no desarrollaron lesiones o tumoraciones visibles. El grupo CS no fue viable. Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación.



La neoplasias observadas en los órganos analizados tras 8 meses con los tratamientos, incrementaron el peso del hígado en los animales HC y DHC (**Fig 28**).

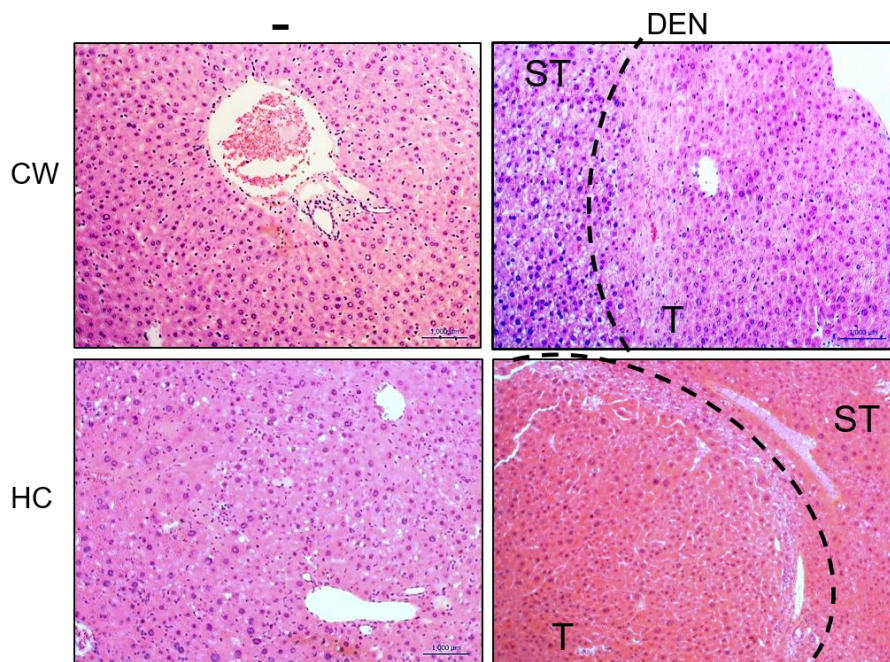


**Figura 28. La acumulación de colesterol incrementa el peso del hígado.** a) Determinación del peso del hígado con respecto al peso total del animal a 8 meses de tratamiento con la dieta HC. Se muestra un incremento en el volumen hepático de los animales HC y DHC. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 10 animales \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW y HC respectivamente.

## **2. La dieta HC induce un fenotipo tumoral menos diferenciado**

El análisis histológico que se realizó tras 8 meses de iniciados los tratamientos reveló que en los hígados CW, el parénquima hepático conservaba su arquitectura normal, sin esteatosis, mientras que en los hígados DCW se detectó neoplasia maligna, con patrón de crecimiento trabecular de límites irregulares, compuesto por hepatocitos de núcleos gigantes con cromatina en grumos y mitosis frecuentes. El parénquima residual presenta leve incremento en del tamaño nuclear, sin otras anormalidades. Los hígados HC presentaron Esteatosis multivesicular, núcleo picnóticos y alta actividad mitótica; inflamación peri lobular y peri portal. Importantemente todas las células observadas por campos fueron neoplásicas. Se encontró pérdida de la relación núcleo/citoplasma, citoplasmas granulares, indicativos de presencia masiva y aumentada de mitocondrias, nucléolos acidófilos (>5) y pérdida por completo de la estructura normal del hígado. Consecuentemente, los hígados DHC presentaron esteatosis multivesicular, alta tasa mitótica, alta tasa apoptótica, con identificación histológica de carcinoma diferenciado, nucléolos acidófilos (>5), activación de células

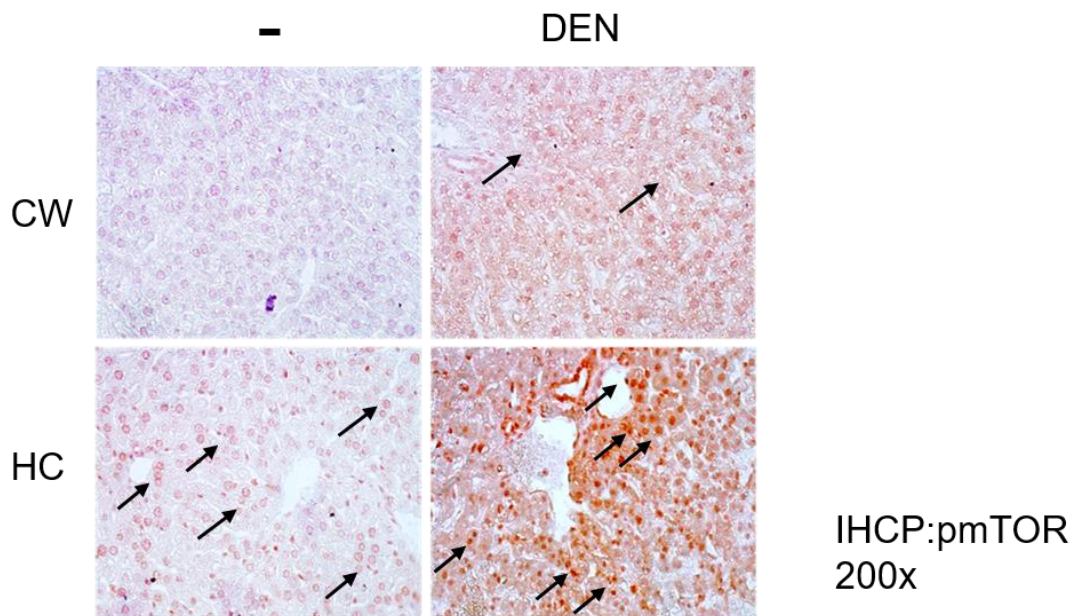
de Kupffer, pérdida de la estructura normal del hígado; inflamación perilobular y periportal. El daño tisular no pudo ser clasificado por zonación ya que todo el tejido se encontraba transformado.



**Figura 28. La acumulación de colesterol incrementa el peso del hígado.** a) Determinación del peso del hígado con respecto al peso total del animal a 8 meses de tratamiento con la dieta HC. Se muestra un incremento en el volumen hepático de los animales HC y DHC,. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 10 animales \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW y HC respectivamente.

### 3. La dieta HC incrementa la actividad de mTOR

Para determinar el efecto de la dieta HC de la vía de señalización de AKT, se realizó una inmunohistoquímica en cortes de hígado para la detección de mTOR activo. Los cortes de los hígados DCW y HC mostraron tinción positiva para mTOR incrementada en comparación con los cortes obtenidos de los hígados CW. Sin embargo, los hígados DHC mostraron mayor actividad de esta enzima, (Fig 30).

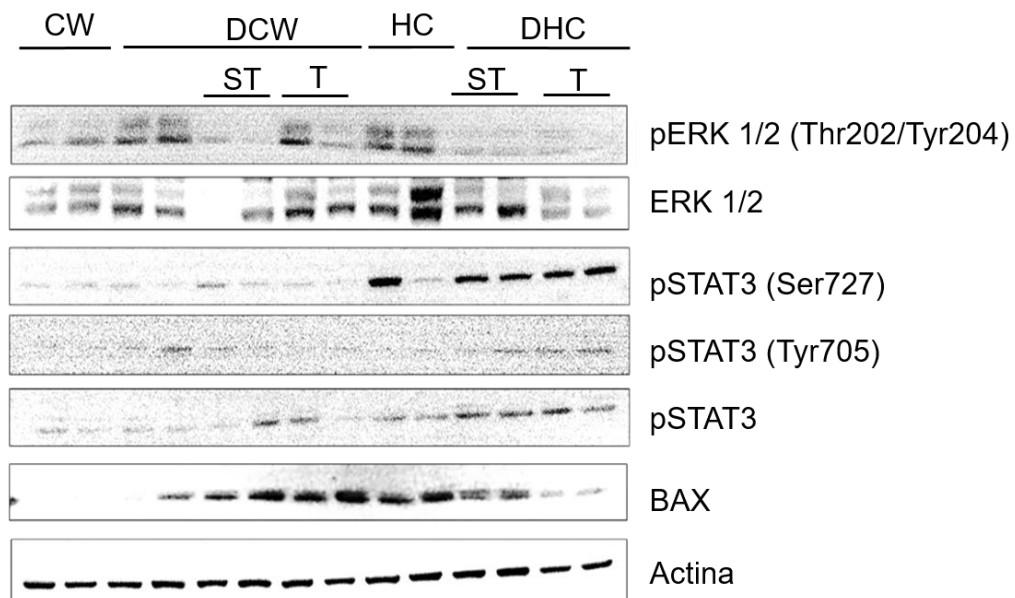


**Figura 30. La dieta HC incrementa la activación de mTOR. Inmunohistoquímica en cortes embebidos en parafina.** Cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) embebido en parafina se trataron con anti p-mTOR a 8 meses de tratamiento. Los cortes de hígados DCW, muestran activación de esta proteína, incrementando su expresión en los cortes de hígados HC y siendo aún más evidente en los cortes de los hígados DHC. Las imágenes son representativas de al menos 3 cortes de animales diferentes.

#### 4. *La dieta HC induce activación diferencial de STAT3 y ERK 1/2*

El inmunoanálisis realizado para determinar la participación de las principales vías de sobrevivencia celular, ERK y STAT3 mostraron que los tumores de los animales DCW, muestran la vía ERK1/2 activa, mientras que las isoformas activas de STAT3, p-STAT3 (Ser 727 y Tyr 705) se encuentran abrogadas. En contraste, los tumores DHC muestran activación de p-STAT3 (Ser 727 y Tyr 705) y abrogación de p-ERK 1/2. Así mismo, se puede observar que la expresión de BAX es inversa en los tumores DCW (incremento) comparados con los tumores DHC (abrogación) (**Fig 31**).

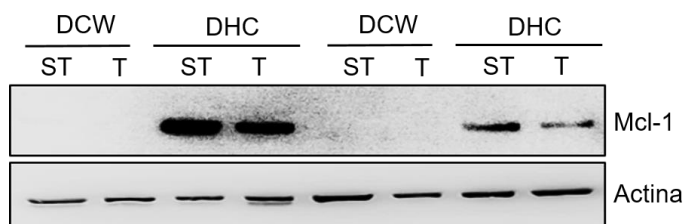




**Figura 31.** La dieta HC induce proliferación celular mediada por la vía de STAT3. Proteína total de tejido hepático se analizó por Western Blot tras 8 meses de la dieta HC. Las muestras DHC del tejido circundante (ST) y del tumor (T) no muestran activación de ERK 1/2, pero sí de STAT3. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

### VIII. *Mcl-1 incrementa su expresión únicamente en los tumores DHC*

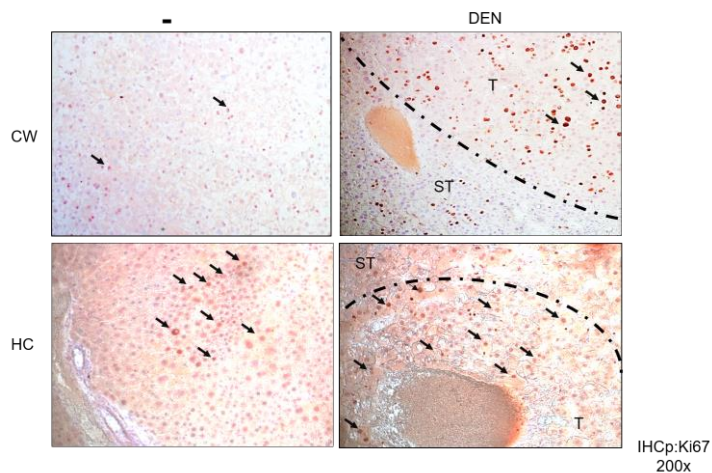
El inmunoanálisis contra Mcl-1 en los tumores DCW y DHC y sus respectivos tejidos circundantes mostró que, sorprendentemente, los tumores y tejidos circundantes DCW no expresan a Mcl-1 mientras que los tumores DHC así como sus tejidos circundantes presentan contenido significativo de esta proteína antiapoptótica (**Fig 32**).



**Figura 32.** Mcl-1 se expresa diferencialmente en los tumores DCW y DHC. Proteína total de tejido hepático se analizó por Western Blot tras 8 meses de ingesta de la dieta hipercolesterolémica. El tumor (T) de los animales DHC tiene una expresión significativamente más elevada que su respectivo tejido circundante (ST), mientras que los animales DCW no expresan esta proteína en el tumor o tejido circundante. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

### IX. **La dieta incrementa la actividad mitogénica tumoral**

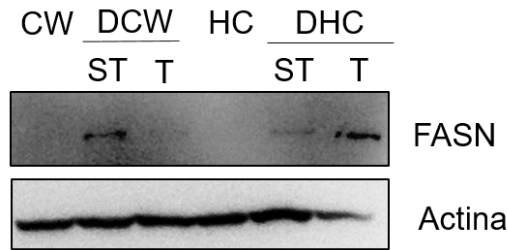
Se realizó una inmunofluorescencia en cortes de tumores DCW y DHC con sus respectivos tejidos circundantes para detectar a Ki67 tras 8 meses de tratamiento (**Fig 33**). En los cortes DCW, la región tumoral (T) hay tinción positiva para Ki67, sin embargo, es mayor en la región T de los cortes DHC. Es importante señalar que en los cortes HC, también se encontraron zonas con detección elevada de esta enzima mitogénica.



**Figura 33. La dieta HC induce la proliferación celular.** Cortes hepáticos (5µm) embebidos en parafina fueron tratados con anti Ki67, los cortes DCW y DHC muestran incremento en la expresión de esta proteína en las zona del tumor (T) con poca presencia en el tejido circundante (ST). Los cortes HC también muestran mayor expresión de Ki67 con respecto a los cortes CW:. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

### X. **Los tumores DHC y DCW expresan diferencialmente a FASN**

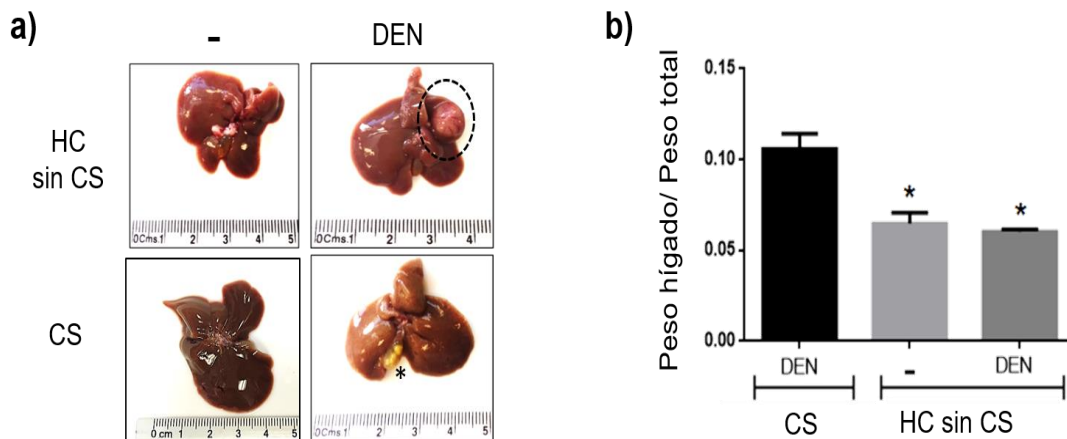
Al realizar un inmunoanálisis para la detección de FASN se pudo observar que esta enzima lipogénica, se encuentra activa en los tejidos circundantes de los tumores DCW y opuestamente, en los tumores DHC (**Fig 34**).



**Figura 34. FASN se expresa diferencialmente en los tumores DCW y DHC.** Proteína total de tejido hepático se analizó por Western Blot tras 8 meses de ingesta de la dieta hipercolesterolémica. El tumor (T) de los animales DHC tiene una expresión significativamente más elevada de FASN que su respectivo tejido circundante (ST), mientras que los animales DCW esta expresión es inversa. Las imágenes son representativas de al menos 3 muestras diferentes de 3 experimentos independientes.

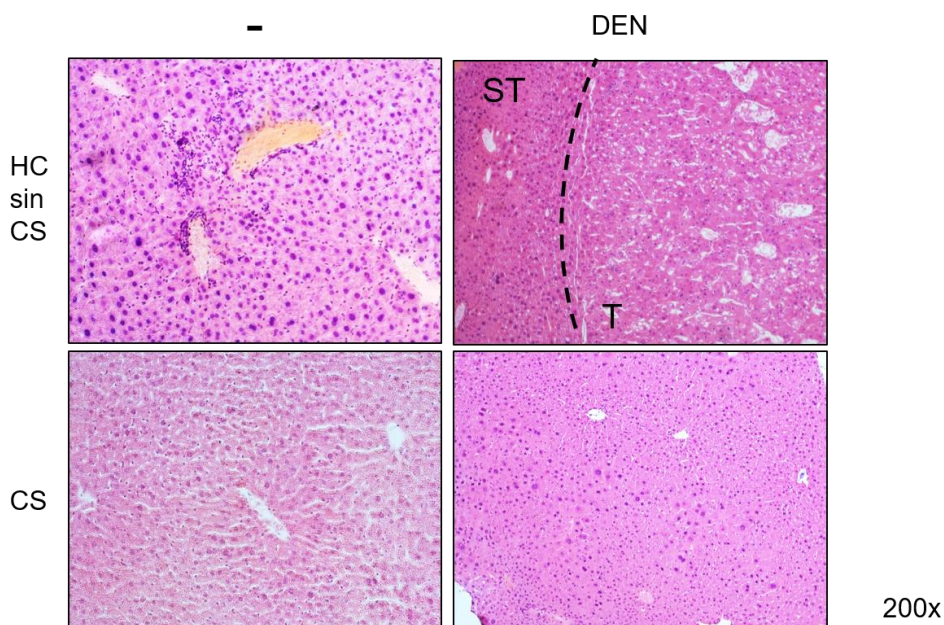
### XIII. PARTICIPACIÓN DEL COLATO DE SODIO EN LA FASE DE PROGRESIÓN TUMORAL

El análisis macroscópico de los hígados HC sin CS reveló algunas lesiones en el órgano, mientras que en los hígados DHC sin CS se observaron tumores grandes y vascularizados tras 8 meses de tratamientos. Por el contrario, los hígados DCS no mostraron evidencia de tumores, pero se hizo el hallazgo de litos vesiculares (Fig. 35a). El cociente del peso del hígado respecto al peso total del animal demostró decremento en los animales HC sin CS y DHC sin CS (Fig. 35b)



**Figura 35. La ingesta crónica de colato de sodio no participa en la formación tumoral.** a) Inspección macroscópica de los hígados de animales alimentados con la dieta HC sin CS y CS, sólo los órganos DHC desarrollaron tumores b) Determinación del peso del hígado con respecto al peso total del animal a 8 meses de tratamiento con la dieta HC sin CS y CS. Se muestra un incremento en el volumen hepático de los animales HC y DHC, mientras que la ingesta de la dieta de colesterol sin colato de sodio (HC sin CS) tiene un comportamiento inverso. Las barras representan el promedio  $\pm$  EE de al menos 4 animales \* $p \leq 0.05$  con respecto al CW y HC respectivamente; #  $p \leq 0.05$  con respecto al CS y HC sin CS.

El análisis histológico (H&E) de los hígados HC sin CS mostró incremento de células apoptóticas y células transformadas por campo analizado, mientras que los hígados DHC sin CS revelaron la presencias de un carcinoma diferenciado (**Fig. 36**)



**Figura 36. El colato de sodio no induce la formación de tumores.** Cortes de tejido hepático (5 $\mu$ m) incluido en parafina y posteriormente teñido con hematoxilina y eosina (200x) a 8 meses de tratamiento. Los cortes HC sin CS muestran tumores (T) grandes rodeados por el tejido circundante (ST), mientras que los cortes CS muestran algunas células apoptóticas, sin tumores. Imágenes representativas de al menos 3 animales por grupo experimental.

#### **XIV. DISCUSIÓN**

La regulación de la síntesis y oxidación del colesterol es un mecanismo altamente regulado, por lo que cualquier desbalance en este proceso puede alterar la fisiología celular[27] El hígado es el único órgano capaz de distribuir, transportar y excretar colesterol en caso de sobrecarga. Si el consumo de colesterol dietario excede los límites normales de ingesta, las células hepáticas, pueden modificar sus funciones al activar o inhibir vías de señalización fundamentales para el funcionamiento celular, conduciendo al desarrollo de

diversas enfermedades, entre ellas el cáncer hepático [28]. La sobrecarga hepática de colesterol, se asocia directamente con la incidencia de hígado graso no alcohólico (NAFLD), condición que puede evolucionar rápidamente a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que involucra inflamación crónica, uno de los factores definitivos en el desarrollo del cáncer hepático, particularmente del hepatocarcinoma (HCC)[29]. Una característica del NAFLD es precisamente la activación y sobreexpresión de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCoAR), la enzima limitante en la biosíntesis del colesterol, que se encuentra altamente relacionada con la fase y la severidad de la enfermedad [30, 31]. El uso de una dieta hipercolesterolémica ha permitido dilucidar que es el tipo de lípido y no la cantidad acumulada en el tejido, lo que afecta el desarrollo de la esteatosis hepática hacia la esteatohepatitis[32]. Por lo tanto, es determinante entender el papel que desempeña el colesterol tras la sensibilización hepática y determinar si es que afecta procesos de reparación mediados por factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) [32, 33, 34]. Además, se ha reportado también una asociación clara entre el contenido de colesterol en el hígado con la progresión de esteatohepatitis hacia HCC en especímenes humanos[33]. Sin embargo, la actividad carcinogénica del colesterol en la carcinogénesis hepática, no ha sido caracterizada hasta la fecha. Marí y colaboradores, demostraron también que dieta HC induce la sobre generación de ROS mitocondrial mediada por la disminución de glutatión (GSH) mitocondrial[32]. Esta disminución de GSH sensibiliza a la célula ante el daño por estrés oxidante. Asimismo, nuestro grupo de investigación demostró que la sobrecarga de colesterol en el hígado genera ROS y por lo tanto, estrés oxidante[33]. Como era de esperarse, la

administración de la DEN y la dieta HC tienen un efecto aditivo en la generación de ROS y en el daño celular. La ingesta de la dieta HC recrea la condición fenotípica de la esteatohepatitis, dada la acumulación de colesterol, la sobreproducción de ROS y la presencia persistente de infiltrado de células inmunes. Sorprendentemente, la dieta HC en combinación con el carcinógeno fue capaz de incrementar la expresión de los genes de respuesta antioxidante, tales como, la SOD1, GSTm,  $\gamma$ -GCS, GPx4 y de proteínas de detoxificación hepática como la HO-1, lo que sugiere un mecanismo protector inducido por la dieta HC. Además, la expresión de proteínas de supervivencia en los hígados DHC fue más alta que en los hígados HC y DCW, lo que revela que la dieta HC permite la evasión de la apoptosis en los hígados previamente sensibilizados con la DEN, como un mecanismo de respuesta aguda. Si bien este resultado, puede parecer controversial, ya que la hipercolesterolemia parece inducir un efecto benéfico y protector, las células que sobreviven estas agresiones o bien, la etapa de respuesta aguda ante las agresiones, son células que presentan daño genético intrínseco, ya que la dieta HC induce daño al ADN y al dividirse, perpetuaran en su progenie, estas anomalías génicas, promoviendo la desestabilización del genoma y promoviendo la oncogénesis, como se observó en los hígados DHC y HC.

La homeostasis lipídica es indispensable para el correcto desarrollo y división celular, por lo que, el incremento de la síntesis de lípidos está asociado a diversas enfermedades, como la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico. La manifestación hepática del síndrome metabólico es el hígado graso no



alcohólico (NAFLD) que se considera un factor etiológico de patologías crónicas y cáncer, específicamente, el hepatocarcinoma (HCC).

En México, la incidencia del HCC se ha incrementado paralelamente con el exceso en el consumo de colesterol en la ingesta dietaria, por lo que se considera una enfermedad relacionada con la sobrealimentación [35]. Todo tipo de cáncer, incluyendo el HCC, tiene como característica distintiva, la proliferación ilimitada y descontrolada de las células. La síntesis lipídica en una célula transformada, especialmente de colesterol incrementa, ante la necesidad de sintetizar nuevas membranas celulares y así asegurar la proliferación[36]. Esto ha sido demostrado por Calvisi et al, mediante el análisis de tumores hepáticos de pacientes con HCC y sus respectivos tejidos circundantes, en donde se comprobó que los pacientes con una sobrealimentación menor, presentaban tumores con sobreexpresión de proteínas lipogénicas, como FASN y SREB2, que participan en la síntesis de ácidos grasos y colesterol, respectivamente. Además, se ha demostrado que los tumores de HCC que se consideran más agresivos presentan aberraciones lipogénicas, por lo que es posible asociarlo con un diagnóstico reservado [37]. La expresión de proteínas clave involucradas en el proceso lipogénico se incrementa a medida que la patología progresa. La proteína ácido graso sintasa (FASN), la acetil coenzima A carboxilasa, así como la activación continua de SREBP 1, su factor de transcripción canónico se asocian con un diagnóstico reservado. Respecto a la vía de síntesis de colesterol, aquellas proteínas relacionadas con la vía del mevalonato se encuentran incrementadas, sugiriendo que el colesterol puede ser un elemento clave en la progresión del HCC. Nuestro equipo de investigación recientemente, describió cómo es que la sobrecarga de colesterol en los hepatocitos induce

daño mitocondrial y estrés oxidante. Estos cambios, promueven la regulación positiva de genes de respuesta antioxidante y de biosíntesis de glutatión, lo que les confiere resistencia a la apoptosis [34]. En el presente estudio se determinaron los efectos de la sobrecarga de colesterol en el hígado a diferentes tiempos en un modelo de hepatocarcinogénesis química. Es bien sabido que la DEN daña al ADN mediante el incremento de ROS, sin embargo, nuestros resultados muestran que la sobrecarga de colesterol induce también, generación excesiva de  $H_2O_2$  y  $O_2\cdot^-$ , por lo tanto, daño oxidante a lípidos intracelulares y al ADN, incluso en ausencia de la DEN, lo que señala al colesterol como un posible factor de riesgo para el desarrollo del hepatocarcinoma, ya que para el desarrollo de esta patología, es necesaria la desestabilización génica, mediada por el daño oxidante al ADN, sin embargo, los hepatocitos con sobrecarga de colesterol parecen evadir la muerte celular hasta ser retados con una segunda agresión que afecte la mitocondria y los niveles de glutatión mitocondrial [38]. Nuestros resultados muestran que los hígados de animales DHC, expresaban las enzimas relacionadas con la síntesis de glutatión, quizá como una respuesta hormética ante los bajos niveles de este tripéptido en los hepatocitos con sobrecarga lipídica, lo que puede indicar que la respuesta del hepatocito ante el colesterol y la DEN dispara diferentes vías de señalización para reestablecer el estado redox celular [39]. La enzima mitocondrial GPx4 se encarga de catalizar la reducción de hidroperóxidos orgánicos, peróxidos de hidrógeno e hidroperóxidos lipídicos, por lo que protege a la célula del daño oxidante y es de vital importancia para mantener el estado redox mitocondrial. Nuestros datos muestran que la GPX4 presenta expresión incrementada en el hígado DHC que corresponde a los datos de Guerriero y colaboradores que



muestran que la sobre-expresión de la GPx4 está relacionada con malignidad, especialmente en tumores de HCC humano de grado III [40]. Se conoce también que el estrés oxidante es el mecanismo por el que el colesterol induce daño hepático, sin embargo, el análisis de marcadores de muerte celular demostró que las células sobrecargadas de colesterol resisten a este mecanismo, mediante el incremento de Bcl-2, la disminución de Bax y la actividad de caspasa [41]. Finalmente, mitocondrias aisladas de muestras de tumores de HCC presentan membranas enriquecidas de colesterol y resistencia a la permeabilización de la membrana mitocondrial lo que inhibe la liberación de mediadores como el citocromo c y las proteínas pro-apoptóticas Smac/Diablo, lo que les confiere resistencia a la muerte inducida por Bax . En conjunto, estas características le confieren a los tumores un fenotipo agresivo, que contribuye con la resistencia al tratamiento quimioterapéutico. A pesar de que la sobrecarga de colesterol se ha asociado con la resistencia a la apoptosis, nuestros datos revelaron que esta respuesta, puede ser mediada por la regulación de la expresión de Bcl2 cuando el hepatocito también ha sido expuesto a la DEN, ya que disminuye el contenido de Bax, lo que dirige un mecanismo antiapoptótico, confirmado por el decremento de la actividad de la caspasa 3. La dieta hipercolesterolémica, la sobrecarga de colesterol mitocondrial interrumpe con el metabolismo y la dinámica de la membrana mitocondrial, lo que explica el efecto antiapoptótico. Por otra parte, es bien sabido que las ROS son las principales inductoras de daño al ADN y por lo tanto, la causante de diversas mutaciones. Las ROS generadas en la mitocondria, han sido relacionadas con la iniciación, progresión y agresividad de diversos tipos de cáncer. La cuantificación del aducto 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) en diversos especímenes

biológicos como suero, orina y fluidos cerebrospinales, es un marcador determinante para medir el daño al ADN. Adicionalmente, la formación de 8-OH-dG se ha ligado a la inestabilidad epigenética en los tumores de HCC, por lo que se considera como un factor de riesgo en el desarrollo del HCC en pacientes que además presentan la infección con el virus de la hepatitis C, por lo que se les monitorea rutinariamente. Es por ello que nuestros hallazgos indican que el daño inducido por la DEN se incrementan bajo un ambiente de sobrecarga lipídica. Sin embargo, existen sistemas de reparación del daño al ADN, lo que evita la apoptosis celular. La protein cinasa ataxia telangectasia (ATM) dirige las respuesta inmediata ante la ruptura de doble cadena del ADN activando a la histona H2aX y a p53 para marcar físicamente las secuencias dañadas y permitir el reclutamiento del resto de las enzimas de reparación [42, 43]. La activación de la histona H2AX, otra molécula confinable para medir el daño al ADN, confirmó el incremento del daño genómico promovido por la alta concentración de colesterol en el hígado que ha tenido un tratamiento previo con la DEN. Este daño induce también un mecanismo de reparación del daño al ADN (DDR), que se encarga de detectar y reparar los fragmentos de ADN dañado, induciendo arresto del ciclo celular para garantizar que solamente las células con un ADN íntegro pueden progresar hacia el ciclo celular. Algunos reportes indican que la activación de las proteínas de la vía de DDR se incrementan durante las etapas tempranas de la tumorigenesis, en un mecanismo dependiente de p53, que actúa como sensor del daño al ADN [44]. Nuestro modelo experimental muestra que en los hígados HC la fosforilación de p53 es prácticamente nula, lo que sugiere que la progresión al ciclo celular de células transformadas que colaboran con la

tumorigenesis. Nuestros resultados también indican que, a pesar de que ATM se activa en tejidos hepáticos HC, en los tejidos DHC disminuye su expresión.

Sorprendentemente, los hígados HC y DHC mostraron una dramática disminución de las proteínas que participan en esta importante vía de señalización, lo que indica reducción de la vigilancia de la integridad replicacional del ADN, permitiendo la carcinogénesis. Posteriormente, tras 14 días de tratamiento, el daño observado disminuyó significativamente, sugiriendo una respuesta hormética ante el daño inducido por la DEN y/o el colesterol, mediado principalmente por la regulación positiva de enzimas de respuesta antioxidante y detoxificación, como HSP70,  $\gamma$ -GCS, HO-1 en los hígados HC siendo mayor en los hígados DHC un efecto sinérgico del colesterol y el carcinógeno. Además, los hígados con sobrecarga de colesterol inhibieron la apoptosis mediada por BAX, evento indispensable y distintivo para el desarrollo carcinogénesis, ya que permite la división de células con el ADN dañado por la DEN y potenciado por la sobrecarga de colesterol [45]. El mecanismo por el cual la acumulación de colesterol en el hepatocito promueve daño al ADN es el estrés oxidante dado que la administración paralela de NAC con los tratamientos experimentales resultó en protección hepática, mediado por el incremento de GSTm, observado en los hígados NHC y NDHC. Por lo que, el hígado sobrecargado de colesterol, requiere de la síntesis de *de novo* glutatión, además del “*pool*” basal de este tripéptido, para neutralizar la sobregeneración de ROS inducida por el carcinógeno y potenciadas por la presencia del colesterol. El cotratamiento con NAC por 7 días induce la neutralización de ROS y la disminución del daño al DNA . Previamente, nuestro equipo de investigación ha

demostrado que la administración de NAC previene los efectos carcinogénicos del estrés oxidante [46], lo que se confirma en este trabajo. El daño oxidante reportado en células ATM<sup>-/-</sup> muestra un incremento en 8-OHdG, que es revertido con el tratamiento con NAC para prevenir la inestabilidad genética [39, 47].

Nuestro trabajo además muestra que el colesterol incrementa el daño hepático inducido por la DEN, ya que los tumores observados en los animales que consumieron de manera prolongada la dieta HC, presentan un fenotipo más agresivo y metastático, caracteriza que ya ha sido relacionada con el metabolismo lipídico [36]. Además, reportes recientes demuestran que la abrogación de la acetil CoA acetil transferasa inhibe la progresión tumoral y la metástasis en modelos de carcinogénesis pancreática [48].

## **XV. CONCLUSIÓN**

La sobrecarga de colesterol en el hígado, incrementa el efecto carcinogénico de la N-dietilnitrosamina, catalizando el proceso de formación y desarrollo de tumores con un fenotipo agresivo ya que se encontraron nódulos metastáticos en el pulmón, solo en los animales que se alimentaron con la dieta hipercolesterolémica. El metabolismo lipídico se ha vinculado con la migración celular. Varios modelos de cáncer de páncreas, han demostrado la función del colesterol en la metástasis de este tumor primario. La activación de las proteínas de reparación del AND como la ATM y la HA2X, así como el contenido de la enzima mitocondrial GPx4 y la GSTM en las lesiones observadas en las fases tempranas, podrían servir como marcadores de agresividad en el diagnóstico del HCC demostrando la importancia del análisis profundo de las terapias con

antioxidantes en el tratamiento del cáncer, ya que si bien existe información controversial respecto a los efectos, al menos durante la etapa de la carcinogénesis podrían ser esenciales, en particular, antioxidantes que sirvan como precursores endógenos de antioxidantes celulares como la NAC . Nuestros resultados confirman la participación del colesterol no solo en el HCC sino, en los eventos precedentes, como la transformación celular relacionada con el incremento de la generación de ROS, la evasión de la apoptosis a tiempos tempranos y el daño al ADN que induce la carcinogénesis. Finalmente, la expresión diferencial de Mcl-1 en los tumores con sobrecarga de colesterol, sugiere que el incremento de la proliferación celular y por lo tanto el fenotipo agresivo, pueden estar controlados por la activación de esta vía de señalización.

## ***XVI. PERSPECTIVAS***

Es necesario utilizar modelos murinos con diferentes concentraciones y tipos de lípidos que presenten inhibición hepática de la expresión de Mcl-1, para determinar si el colesterol promueve la expresión diferencial de esta proteína e induce el fenotipo agresivo que se observó en los tumores DHC. Así como determinar la resistencia a fármacos de las células cancerígenas sobrecargadas de colesterol.

El análisis genómico es indispensable para poder dilucidar las vías propuestas en este trabajo y establecer posibles blancos moleculares para el pronóstico de esta patología.

## XVII. REFERENCIAS

1. Sun, B. and M. Karin, *Obesity, inflammation, and liver cancer*. J Hepatol. **56**(3): p. 704-13.
2. Haslam, D.W. and W.P. James, *Obesity*. Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-209.
3. Meldrum, D.R., M.A. Morris, and J.C. Gambone, *Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will?* Fertil Steril, 2017. **107**(4): p. 833-839.
4. Rocchini, A.P., *Childhood obesity and a diabetes epidemic*. N Engl J Med, 2002. **346**(11): p. 854-5.
5. Hernandez-Cordero, S., et al., *Overweight and obesity in Mexican children and adolescents during the last 25 years*. Nutr Diabetes, 2017. **7**(6): p. e280.
6. Deng, T., et al., *Obesity, Inflammation, and Cancer*. Annu Rev Pathol. **11**: p. 421-49.
7. Sceneay, J. and S.S. McAllister, *The skinny on obesity and cancer*. Nat Cell Biol, 2017. **19**(8): p. 887-888.
8. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
9. Diehl, A.M., *Hepatic complications of obesity*. Gastroenterol Clin North Am, 2010. **39**(1): p. 57-68.
10. Mair, M., et al., *JAK-STAT signaling in hepatic fibrosis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 2794-811.
11. Grabner, B., et al., *Disruption of STAT3 signalling promotes KRAS-induced lung tumorigenesis*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6285.
12. Kuzu, O.F., M.A. Noory, and G.P. Robertson, *The Role of Cholesterol in Cancer*. Cancer Res. **76**(8): p. 2063-70.
13. Calvisi, D.F., et al., *Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2011. **140**(3): p. 1071-83.
14. Ribas, V., C. Garcia-Ruiz, and J.C. Fernandez-Checa, *Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism*. Clin Transl Med. **5**(1): p. 22.
15. Garcia-Ruiz, C., et al., *Mitochondrial Cholesterol and the Paradox in Cell Death*. Handb Exp Pharmacol. **240**: p. 189-210.
16. Kuzu, O.F., M.A. Noory, and G.P. Robertson, *The Role of Cholesterol in Cancer*. Cancer Res, 2016. **76**(8): p. 2063-70.
17. El-Serag, H. and J.R. Kramer, *Hepatitis C infection: dying with or from the infection?* J Hepatol, 2008. **48**(2): p. 183-4.
18. Lau, W.Y. and E.C. Lai, *Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2008. **7**(3): p. 237-57.
19. Kishida, N., et al., *Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine*. BMC Gastroenterol. **16**(1): p. 61.
20. Kishida, N., et al., *Development of a novel mouse model of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis using a high-fat, choline-deficient diet and intraperitoneal injection of diethylnitrosamine*. BMC Gastroenterol, 2016. **16**(1): p. 61.
21. Attwa, M.H. and S.A. El-Etreby, *Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma*. World J Hepatol, 2015. **7**(12): p. 1632-51.
22. Rampone, B., et al., *Current management strategy of hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(26): p. 3210-6.
23. Tateishi, R., et al., *Treatment strategy for hepatocellular carcinoma: expanding the indications for radiofrequency ablation*. J Gastroenterol, 2009. **44 Suppl 19**: p. 142-6.
24. Torres, D.M. and S.A. Harrison, *Nonalcoholic steatohepatitis and noncirrhotic hepatocellular carcinoma: fertile soil*. Semin Liver Dis. **32**(1): p. 30-8.
25. Perumpail, R.B., et al., *Pathogenesis of hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic nonalcoholic fatty liver disease: Potential mechanistic pathways*. World J Hepatol, 2015. **7**(22): p. 2384-8.
26. Grabner, B., et al., *Disruption of STAT3 signalling promotes KRAS-induced lung tumorigenesis*. Nat Commun. **6**: p. 6285.

27. Ikonen, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 125-38.
28. Siddiqui, M.S. and M. Charlton, *Liver Transplantation for Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pretransplant Selection and Posttransplant Management*. Gastroenterology, 2016. **150**(8): p. 1849-62.
29. MUSSO G, G.R., CASSENDER M, PAGANO G, *Meta-Analysis: natural history of non-alcoholic liver disease in Clinical Dilemmas in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* 2013, Wiley Bethesda MD, USA.
30. Min, H.K., et al., *Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease*. Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 665-74.
31. Kerr, T.A. and N.O. Davidson, *Cholesterol and nonalcoholic fatty liver disease: renewed focus on an old villain*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1995-8.
32. Mari, M., et al., *Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis*. Cell Metab, 2006. **4**(3): p. 185-98.
33. Gutierrez Ruiz, M.C., et al., *[High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]*. Gac Med Mex, 2012. **148**(3): p. 236-42.
34. Dominguez-Perez, M., et al., *Hepatocyte Growth Factor Reduces Free Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7960386.
35. Aguilar Salinas, C., et al., *Genética de las dislipidemias en México*. Mensaje Bioquímico, 2016. **60**(1): p. 125-142.
36. Luo, X., et al., *Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 76.
37. Li, L., et al., *Inactivation of fatty acid synthase impairs hepatocarcinogenesis driven by AKT in mice and humans*. J Hepatol, 2016. **64**(2): p. 333-341.
38. Tien Kuo, M. and N. Savaraj, *Roles of reactive oxygen species in hepatocarcinogenesis and drug resistance gene expression in liver cancers*. Mol Carcinog, 2006. **45**(9): p. 701-9.
39. Reliene, R., E. Fischer, and R.H. Schiestl, *Effect of N-acetyl cysteine on oxidative DNA damage and the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5148-53.
40. Guerriero, E., et al., *GPX4 and GPX7 over-expression in human hepatocellular carcinoma tissues*. Eur J Histochem, 2015. **59**(4): p. 2540.
41. Luna-Lopez, A., et al., *Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(7): p. 1192-204.
42. Nishida, N., et al., *Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis*. Dig Dis, 2013. **31**(5-6): p. 459-66.
43. Marechal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
44. Weber, A.M. and A.J. Ryan, *ATM and ATR as therapeutic targets in cancer*. Pharmacol Ther, 2015. **149**: p. 124-38.
45. Ishikawa, K., et al., *ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis*. Science, 2008. **320**(5876): p. 661-4.
46. Takami, T., et al., *Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9844-51.
47. Takao, N., Y. Li, and K. Yamamoto, *Protective roles for ATM in cellular response to oxidative stress*. FEBS Lett, 2000. **472**(1): p. 133-6.
48. Xie, F., et al., *Simvastatin blocks TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer cells*. Oncol Lett, 2016. **11**(5): p. 3377-3383.

## Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis

Cristina Enríquez-Cortina<sup>1,2</sup>, Oscar Bello-Monroy<sup>1,2</sup>, Patricia Rosales-Cruz<sup>1,2</sup>, Verónica Souza<sup>2</sup>, Roxana U. Miranda<sup>2</sup>, Rafael Toledo-Pérez<sup>1,2</sup>, Armando Luna-López<sup>3</sup>, Arturo Simoni-Nieves<sup>1,2</sup>, Rogelio Hernández-Pando<sup>4</sup>, María Concepción Gutiérrez-Ruiz<sup>2</sup>, Diego F. Calvisi<sup>5</sup>, Jens U. Marquardt<sup>6</sup>, Leticia Bucio<sup>2,\*</sup> and Luis Enrique Gomez-Quiroz<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México City, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Fisiología Celular, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México City, México

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Geriátría, S.S., México City, México

<sup>4</sup>Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México

<sup>5</sup>Institute of Pathology, University of Greifswald, Greifswald, Germany

<sup>6</sup>1st Department of Medicine, University Medical Center, Johannes Gutenberg University Mainz, Mainz, Germany

\*Shared senior authorship

**Correspondence to:** Luis Enrique Gomez-Quiroz, **email:** legq@xanum.uam.mx

**Keywords:** cholesterol; oxidative stress; ATM; DNA damage; carcinogenesis

**Received:** August 06, 2017

**Accepted:** September 20, 2017

**Published:** October 24, 2017

**Copyright:** Enríquez-Cortina et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**Primary liver cancers represent the second leading cause of cancer-related deaths worldwide. Diverse etiological factors include chronic viral hepatitis, aflatoxin and alcohol exposure as well as aberrant liver lipid overload. Cholesterol has been identified as a key inducer of metabolic impairment, oxidative stress and promoter of cellular dysfunction. The aim of this work was to address the oxidative stress-mediated DNA damage induced by cholesterol overload, and its role in the development of hepatocellular carcinoma.**

**C57BL/6 male mice were fed with a high cholesterol diet, followed by a single dose of N-diethylnitrosamine (DEN, 10 µg/g, ip). Reactive oxygen species generation, DNA oxidation, antioxidant and DNA repair proteins were analyzed at different time points. Diet-induced cholesterol overload caused enhanced oxidative DNA damage in the liver and was associated with a decrease in key DNA repair genes as early as 7 days. Interestingly, we found a cell survival response, induced by cholesterol, judged by a decrement in Bax to Bcl2 ratio. Importantly, N-acetyl-cysteine supplementation significantly prevented DNA oxidation damage. Furthermore, at 8 months after DEN administration, tumor growth was significantly enhanced in mice under cholesterol diet in comparison to control animals. Together, these results suggest that cholesterol overload exerts an oxidative stress-mediated effects and promotes the development of liver cancer.**



## INTRODUCTION

Aberrant lipogenesis has a major effect on many diseases, in addition to well-known metabolic disorders such as obesity and/or metabolic syndrome, lipid disorders also have crucial impact on tumor development. Lipids are essential building blocks, for new cellular membranes [1], but also are required for post-translational modifications in cell cycle-related proteins, such as Ras or heterotrimeric G proteins [2, 3], and are a major source of energy supply for cells [1]. Hepatocellular carcinoma (HCC), one of most frequent cancers globally, shows a remarkable dependence on sustained lipid synthesis [4]. Moreover, HCC aggressiveness is directly associated to the levels of lipogenic enzymes, related to fatty acid and cholesterol synthesis. Several reports have shown that increased activation of fatty acid synthase (FASN), ATP citrate lyase (ACLY), Acetyl-CoA carboxylase (ACC), mevalonate kinase (MVK), squalene synthase (SQS), and the 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), among others significantly drive the tumorigenic process and increases the aggressiveness of the tumors [5-7]. Although recent evidence supports the notion that exogenous free fatty acids play a major role in liver cancer development [8], the relevance of excessive dietary cholesterol in this context is less well understood. A recent report demonstrated that expression of HMGCR and MVK is significantly enriched in HCC human tissue when compared with the surrounding and normal liver tissue [6]. Furthermore, free cholesterol is increased in liver tissue from patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and this is associated to an increment in the expression of the sterol regulatory

element binding protein (SREBP) 2 and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) [9], both critically linked to HCC development and progression [10].

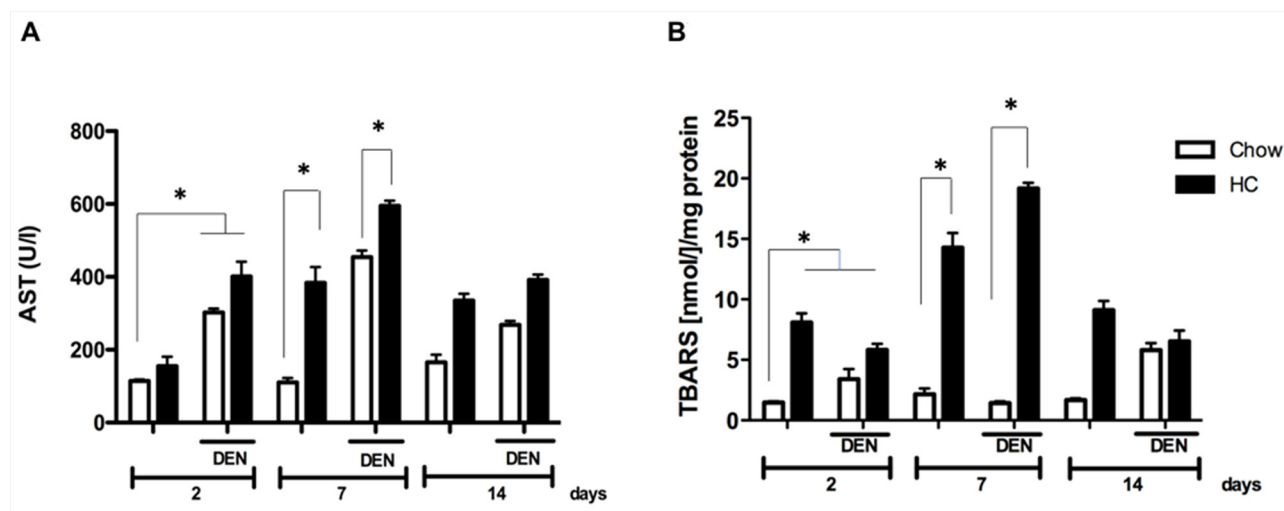
We and others have shown that cholesterol overload in the liver induces profound cellular redox imbalances, leading to the aggravation of different chronic liver diseases [11-14], predominantly by affecting mechanisms related to loss of glutathione (GSH) homeostasis in hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met dependent manner [15, 16]. Oxidative stress is a well-addressed mechanism for DNA damage and carcinogenesis [17]. Therefore, redox imbalance can also enhance the carcinogenic effects of canonical DNA damage inducers such as *N*-nitrosodiethylamine (DEN) [18].

Given the chemical and biological properties of cholesterol and its effect for redox, we hypothesized that cholesterol can participate in the carcinogenic process, particularly by aggravating DNA damage in early stages of hepatocarcinogenesis. In the present work, we investigated the contribution of dietary cholesterol overload in the liver on chemically-induced DNA damage, and its effects on the redox status, antioxidant and DNA repair enzymes, to characterize a possible role of cholesterol as a tumor promoter in the liver.

## RESULTS

### Cholesterol overload enhances DEN-induced oxidative liver damage

Given the well-known role of cholesterol as inducer of oxidative stress we, first addressed the extent of liver damage at 2, 7 and 14 days in all experimental groups.



**Figure 1: Cholesterol overload in the liver exacerbates the damage induced by *N*-nitrosodiethylamine.** Mice were subjected to both high cholesterol (HC) or Chow diet and two days later received, or not, a single dose of *N*-nitrosodiethylamine (DEN, 10  $\mu$ g/g body weight), serum and liver tissue were recovered at 2, 7 and 14 days after DEN treatment. (A) Serum aspartate aminotransferase (AST) activity, and (B) lipid peroxidation determination assayed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least five different mice. \*,  $p \leq 0.05$ .

HC fed mice displayed a transient increase in AST serum levels starting two days under the treatment, peaking at 7 days when compared with animals under the CW diet and treated with DEN (DCW, Figure 1A). Interestingly, AST activity decreased after 14 days of treatment, suggesting liver healing response after the acute damage.

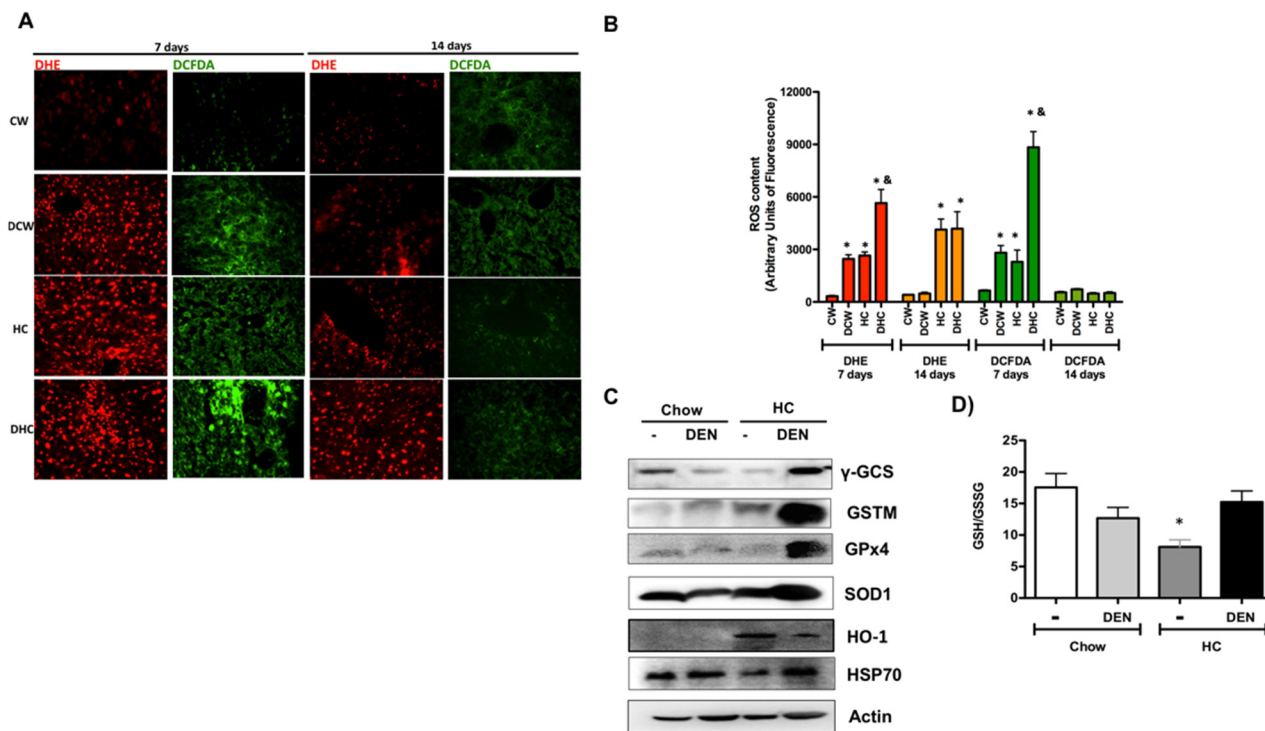
To address the degree of oxidative damage, lipid peroxidation was determined in whole liver tissue. In accordance to the increased activity of AST, levels of TBARS were significantly increased at 7 days in animals under HC diet, (7-fold vs CW and DCW), returning to similar levels observed at day 2 at day 14 (Figure 2B). Data clearly show a maximal damage response at 7 days.

To figure out the ROS involvement in cholesterol-mediated liver damage, we addressed both, superoxide radical ( $O_2^-$ ), by DHE; and peroxides, such as  $H_2O_2$ , by DCFDA fluorescence, in fresh liver sections at 7 and 14 days. Representative confocal images of ROS determination are shown in Figure 2. It is of notice that the HC diet alone increases both  $O_2^-$  and peroxides cellular content at 7 days, approximately 8-fold versus CW, which is related to TBARS content and AST activity. ROS content was exacerbated in DEN-treated HC group, indicating a greater loss of redox homeostasis.

ROS content was significantly diminished at 14 days, confirming that day 7 is the time for maximal oxidative stress generation (Figure 2B).

The assessment of some of the main protective and antioxidant proteins revealed an adaptive response in DHC mice (Figure 2C). Remarkably, the levels of GSH-related enzymes such as  $\gamma$ -GCS, GSTM and GPx4 increased in the DHC group (densitometric analysis in Supplementary Figure 2), suggesting that GSH system is required for this kind of damage as we and others previously reported [11, 14, 18]. Interestingly, the GSH to GSSG ratio determined at day 7 exhibited a significant decrease in livers from HC fed animals, but HC and DEN treated mice show similar values of GSH than control Chow (Figure 2D), this finding agrees with  $\gamma$ -GCS content observed in HC-DEN group, other antioxidant and protective enzymes such as SOD1, HO-1 and HSP70 were also increased in this group comparing with Chow and Chow-DEN animals.

Since effects were most striking at 7 days, we measured total cholesterol levels in liver tissue from animals of all groups. Figure 3A shows that mice fed with HC diet certainly exhibited significant cholesterol increment. Macroscopic inspection of livers shows the characteristic steatotic pale color in HC fed animals



**Figure 2: Cholesterol overload in the liver disrupt redox homeostasis.** (A) Reactive oxygen species content in liver tissue were determined by dihydroethidium (DHE, 5  $\mu$ M, in red) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 5  $\mu$ M, in green). Representative images obtained by confocal microscopy. Original magnification X100. (B) Fluorescence quantification of ROS determination. (C) Western blot of the main antioxidant and protective proteins at day 7. Images are representative of at least three independent experiments. Actin was used as loading control. (D) Determination of reduced glutathione (GSH) and oxidized GSH (GSSG) in livers at day 7. Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$  vs respective Chow samples at the same time. &,  $p \leq 0.05$  vs Chow-DEN at the same time.

(Figure 3B). Gallbladder hypertrophy was also observed in HC-fed animals, and these characteristics were related to a slight, but significant, increment in liver to body weight ratio in both groups under HC diet (Figure 3C).

Histology analysis revealed multivesicular steatosis in both groups under HC diet, with the DEN treated group exhibiting a mild inflammatory infiltration. Mitogenic activity was also corroborated by the observation of chromatin distended nuclei (arrow), nucleoli acidophilic staining, a key indication of cellular metabolism activation and constant rRNA synthesis (Figure 3D).

### HC promotes an antiapoptotic response and DNA damage

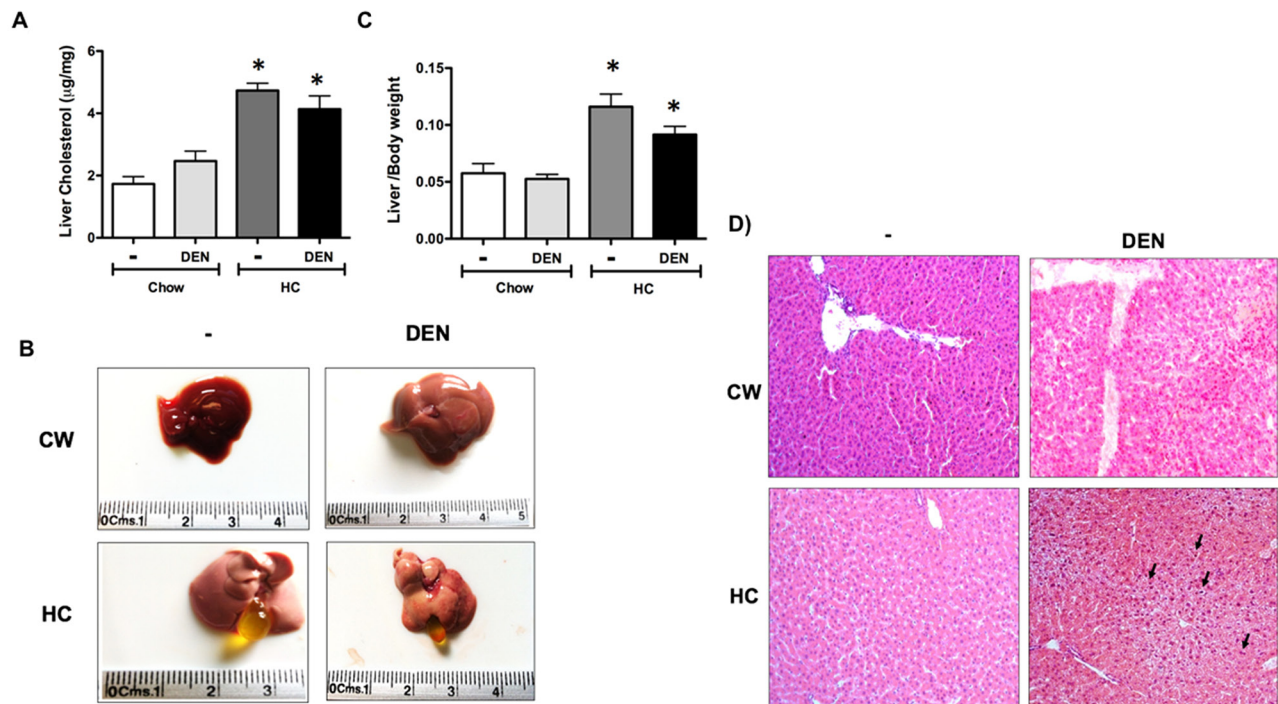
Although there is an increment in antioxidants enzymes and GSH in animals under HC diet and DEN treatment, ROS content is significantly increased as well, suggesting an inefficient antioxidant response. This sustained pro-oxidant environment could promote apoptosis. To assess the apoptosis status in the respective groups, we assayed Bax to Bcl2 expression ratio in the livers. As expected, DEN treatment led to a significant increase in the ratio in animals treated with chow diet. However, HC fed animals treated with DEN showed a striking activation of Bcl-2 and concomitant downregulation of Bax (Figure 4A). Apoptosis was

corroborated by caspase 3 activity in whole liver homogenate (Figure 4B) observing a decrease in caspase 3 activity in HC fed animals treated with DEN comparing with Chow-DEN. Thus, these data suggest that the HC diet induces apoptosis resistance that might facilitate a cell transformation due to an unresolved cell damage.

### Cholesterol overload in the liver enhances the DNA damage induced by DEN and impairs DNA repair-related proteins activation

Next, we determined the activation of the histone 2AX (H2AX), a surrogate marker of DNA damage, in samples from 7 days of treatment. Consistent with the increased liver damage and ROS activation, Figure 5A shows an increment in the phosphorylation of the H2AX in HC groups, particularly in those treated with DEN, damage was corroborated by measuring the deoxyguanosine (dG) oxidation into 8-oxo-dG, another key marker of DNA oxidation. Of note, at 7 days HC fed animals showed a significant increase in 8-oxodG (Figure 5B), particularly in those treated with DEN.

To dissect the underlying molecular mechanism, we evaluated the levels of key proteins involved in DNA repair. Figure 5C shows representative immunoblot images of p-ATM, p-BRCA1, p-ATR, p-CHK1, p-CHK2 and p-p53; importantly, all proteins were



**Figure 3: Macroscopic and microscopic inspection of the liver under HC diet and DEN treatment.** (A) Cholesterol content in liver tissue. (B) Macroscopic aspect of the liver from different groups. (C) Liver to body weight ratio. Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$  vs Chow control animals. (D) Histology appearance by H&E staining, arrows show cells with mitogenic activity corroborated by chromatin distended nuclei. Images are representative of at least 4 different mice, original magnification X200.



significantly decreased in DHC mice, whereas p-ATM increased in Chow fed animals (densitometric analysis in Supplementary Figure 3).

### NAC treatment counteracts ROS generation and the oxidative DNA damage

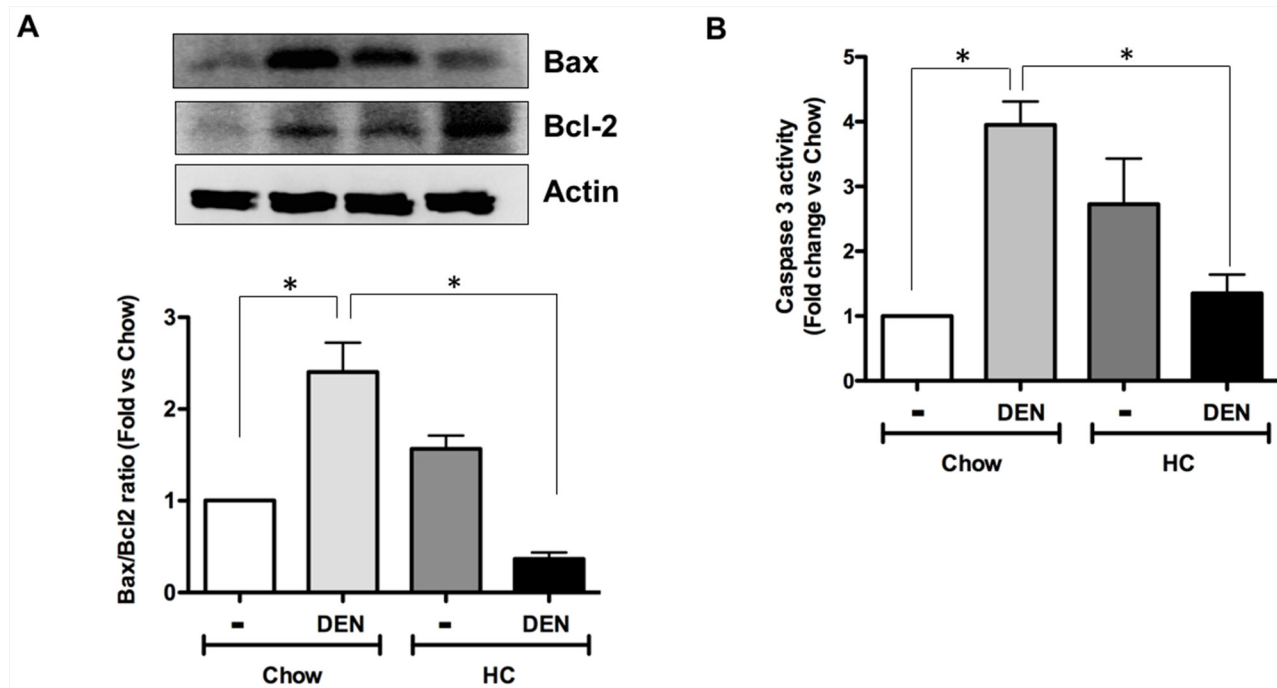
The disruption of cellular redox status aggravates the harmful effects mediated by DEN, and our data clearly show an impairment of the GSH system. To elucidate whether the redox homeostasis could be re-established we added NAC (80 mmol/L) in drinking water along HC diet for 7 days. As expected, NAC significantly decreases ROS content in all conditions, particularly in those under HC diet and DEN treatment (Figure 6A and Supplementary Figure 1), while concomitantly leading to an improvement in liver function (Figure 6B) and a decrease in DNA damage judged by dG oxidation (Figure 6C).

### A HC diet promotes tumor progression

To address if the exacerbated DNA damage observed in DHC could be associated to progression of HCC and an aggressive phenotype, we explored the different investigated groups at 1, 3, 5 and 8 months as we previously reported [18]. The kinetics of tumor development was assessed by incidence and multiplicity. In agreement with our findings from the acute model,

chronic cholesterol overload in the liver led to a more rapid development of tumors than in DCW mice (Figure 7A). Indeed, at 3 months 44 % (4 of 9,  $p \leq 0.05$ ) of DHC mice developed tumors comparing with 0% in DCW mice, at 5 months all DHC animals developed tumors versus 40% of DCW. The tumor incidence in DHC mice was higher compared with DCW at 3, 5 and 8 months after DEN treatment (Figure 7B). At 8 months of treatment, the liver to body weight ratio (Figure 7C) was higher in DHC animals comparing with HC and CW animals, and the data agree with the incidence and multiplicity of the lesions. Gross liver inspection of DHC livers revealed multiple tumors (Black arrow), bigger and evidently, more vascularized than those seen in DCW. Small lesions were observed in HC livers (white arrow).

Additionally, histological analysis of HC tissue (Figure 7E), revealed steatohepatitis, picnotic nuclei and increased mitotic activity, perilobular, periportal inflammation (black arrow), and signs of cholestasis (yellow arrow). All the observed cells by the field were identified as neoplastic due the loss of nucleus/cytoplasm ratio, granular cytoplasm that indicates massive mitochondrial presence and more than five nucleoli per nucleus. Along with these cellular alterations, the liver normal architecture was completely lost. DHC livers exhibited multi-vesicular steatosis, increased mitotic activity, that extensively describes a well-differentiated carcinoma. Hepatocytes displayed acidophilic nuclei,



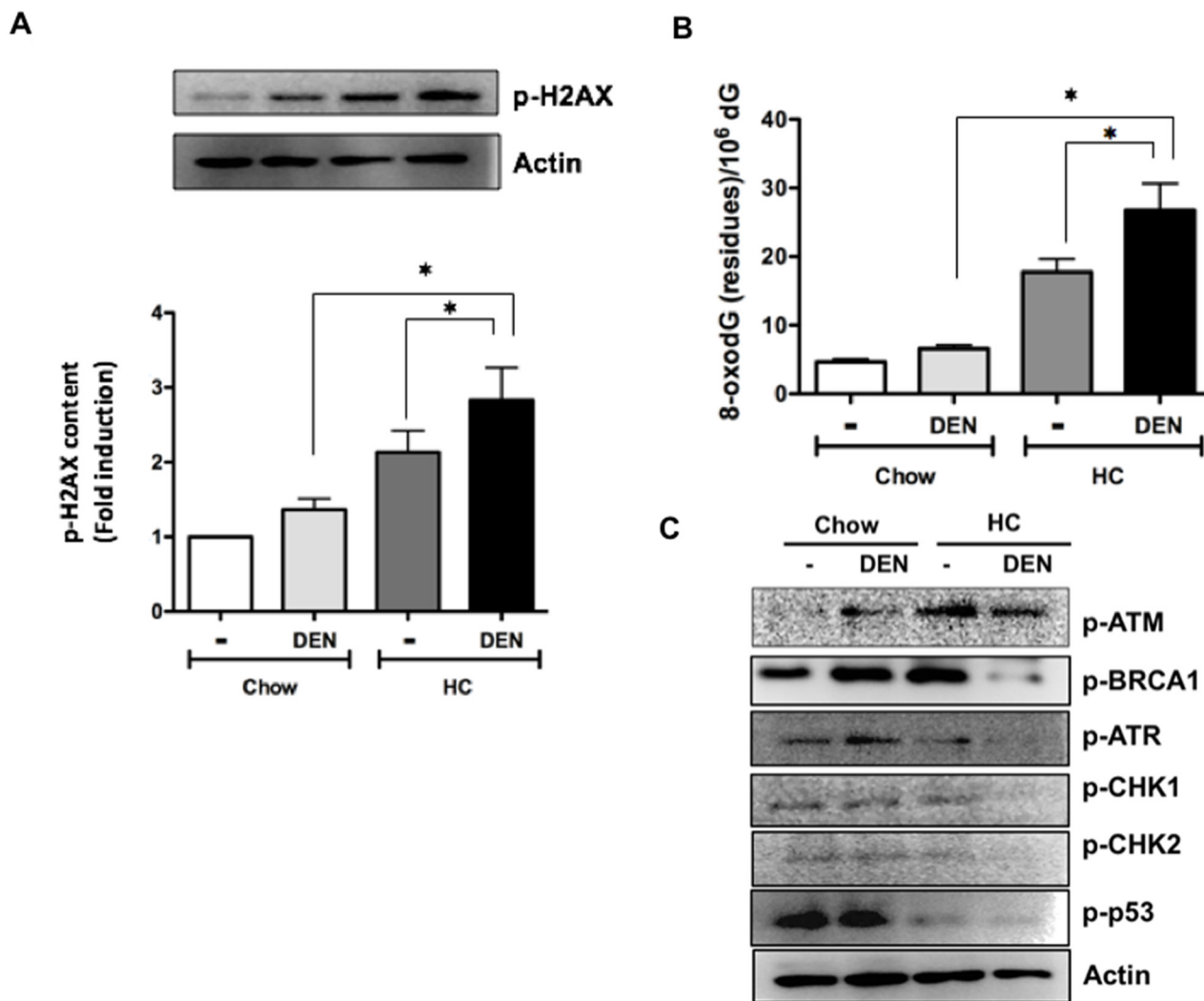
**Figure 4: HC promotes an antiapoptotic response and DNA damage. (A)** Bax to Bcl2 ratio of protein content determined by Western blot in samples from all animal groups, representative images of at least three different mice. Actin was used as loading control. **(B)** Caspase 3 activity in whole tissue homogenates. Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$ .

loss of liver normal architecture and periportal inflammation (-), it is clear the difference between the transformed cells that conform the tumor (T) when compared with those on the surrounding tissue (ST). The tumor cellular changes observed in this tissue were much more dramatic than those found in DCW treated liver sections. Interestingly, we found metastasis in lungs only in some animals (5 of 9) under HC diet and DEN treatment (Supplementary Figure 4).

## DISCUSSION

Aberrant lipogenesis is a critical event in many pathologies, such as obesity, metabolic syndrome, some viral infections, among others [19]. Increasing evidence supports that, in cancer, lipogenesis is overacting to support the tumor growth [20], because lipids are required

as fuel, building blocks for new cellular membranes, and some lipid intermediaries are essential for post-translational modifications in key proteins such as Ras or heterotrimeric G proteins [2, 3]. Particularly, in human HCC, Calvisi and coworkers, outstandingly proved that aberrant lipogenesis is directly associated to an aggressive phenotype and poor prognosis [6]. The expression of key proteins associated with lipogenesis was found to be increased in HCC, being higher as HCC malignancy progress. Among the proteins correlated with a poorer outcome are the fatty acid synthase (FASN), acetyl-coenzyme A carboxylase, and the overactivation of their main transcription factor, such as SREBP 1. Remarkably, those related to mevalonate pathway were also increased such as mevalonate kinase, HMGCR, and the master transcription factor SREBP 2, suggesting that cholesterol could be positioned as a key element in HCC progression.



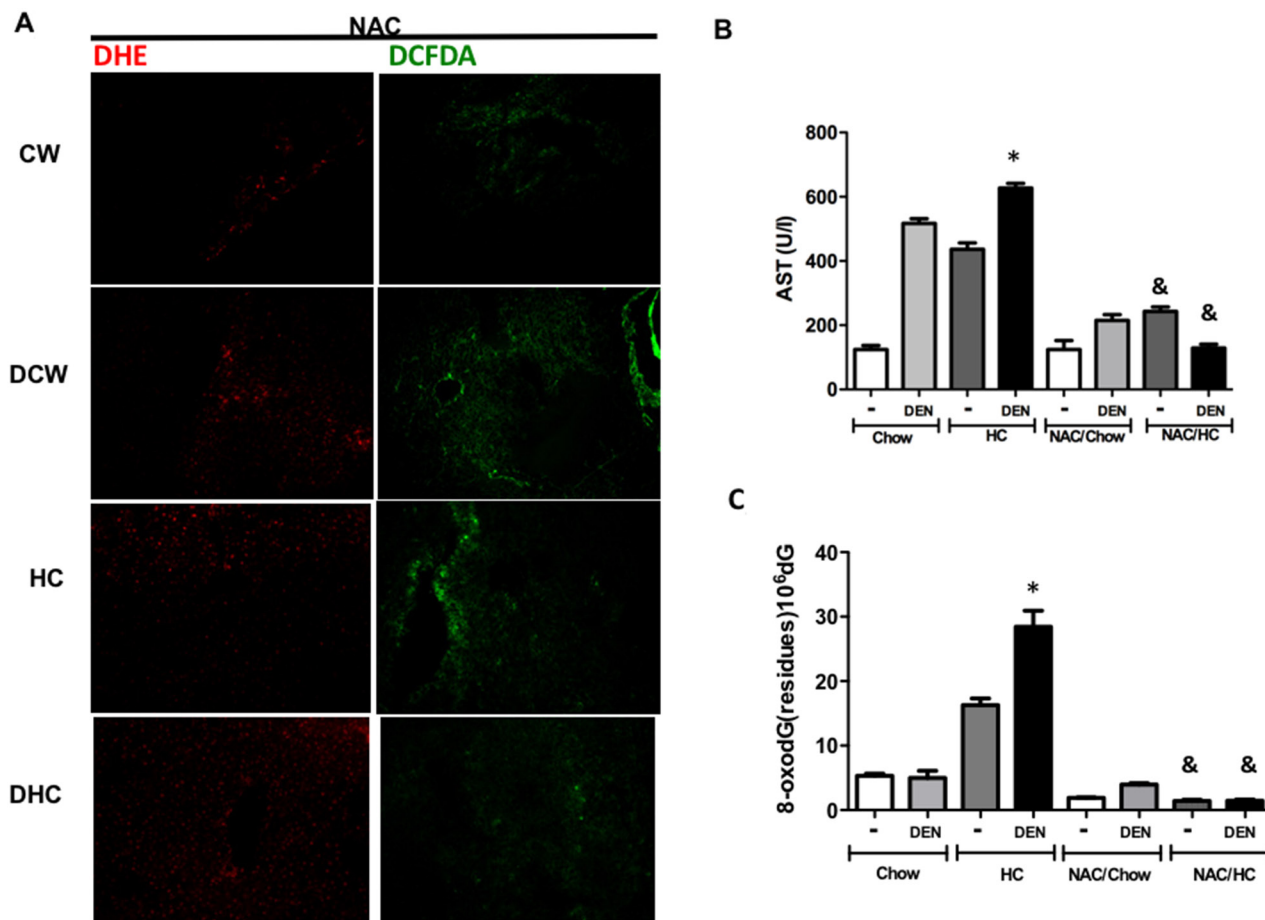
**Figure 5: Cholesterol overload in the liver potentiates the DNA damage induced by DEN impairing DNA repair enzymes activation.** (A) Phosphorylation of histone 2AX (p-H2AX) determined by Western blot. (B) Guanine oxidation judged by 8-oxodeoxyGuanine (8-oxodG) determined by HPLC. (C) Representative images of Western blot analysis of the main proteins related to DNA repair. Actin was used as loading control. Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$ .

We were focused to figure out if cholesterol plays determinant role in DNA damage and HCC initiation.

We and others have been proved that the consumption of a high cholesterol diet induces a cholesterol overload in the liver rising a complex response in hepatocytes characterized by mitochondria dysfunction and oxidative stress [12-14], but, interestingly, hepatocytes with cholesterol overload seems to be resistant to cell death under unstimulated conditions. Nonetheless, they are sensitized to a second aggression, particularly those directed to mitochondria by a mechanism related to mitochondrial-glutathione depletion [14]. In DHC mice, we found that GSH-related enzymes were remarkably increased (Figure 2C) perhaps as a compensatory response, because GSH levels are considerably decreased in hepatocytes with cholesterol overload as we and others have demonstrated [11, 13, 14], interestingly DHC tissue exhibited GSH levels compared as Chow control animals (Figure 2D), suggesting that both harmful

stimulus, cholesterol and DEN display different regulatory pathways directed to control redox homeostasis. GPx4 is a mitochondria-resident antioxidant enzyme directed to reduce hydrogen peroxides and lipid hydroperoxides, and the enzyme is fundamental for redox mitochondria homeostasis [21]. It is relevant that GPx4 is overexpressed in DHC tissue, recently, Guerriero and coworkers [22] showed that the overexpression of GPx4 is correlated to malignancy, exhibiting a higher expression in HCC grade III comparing with I and II.

Oxidative stress is the leading mechanism of damage in the liver with high cholesterol content as we have confirmed in the present work (Figure 1 and 2). However, exploration of some markers of cell death revealed that cells seem to be resistant to death as judged by the Bax to Bcl2 ratio and caspase 3 activity (Figure 4). It has been reported that mitochondria isolated from HCC exhibit high levels of cholesterol, resistance to mitochondrial membrane permeabilization, and release of proapoptotic



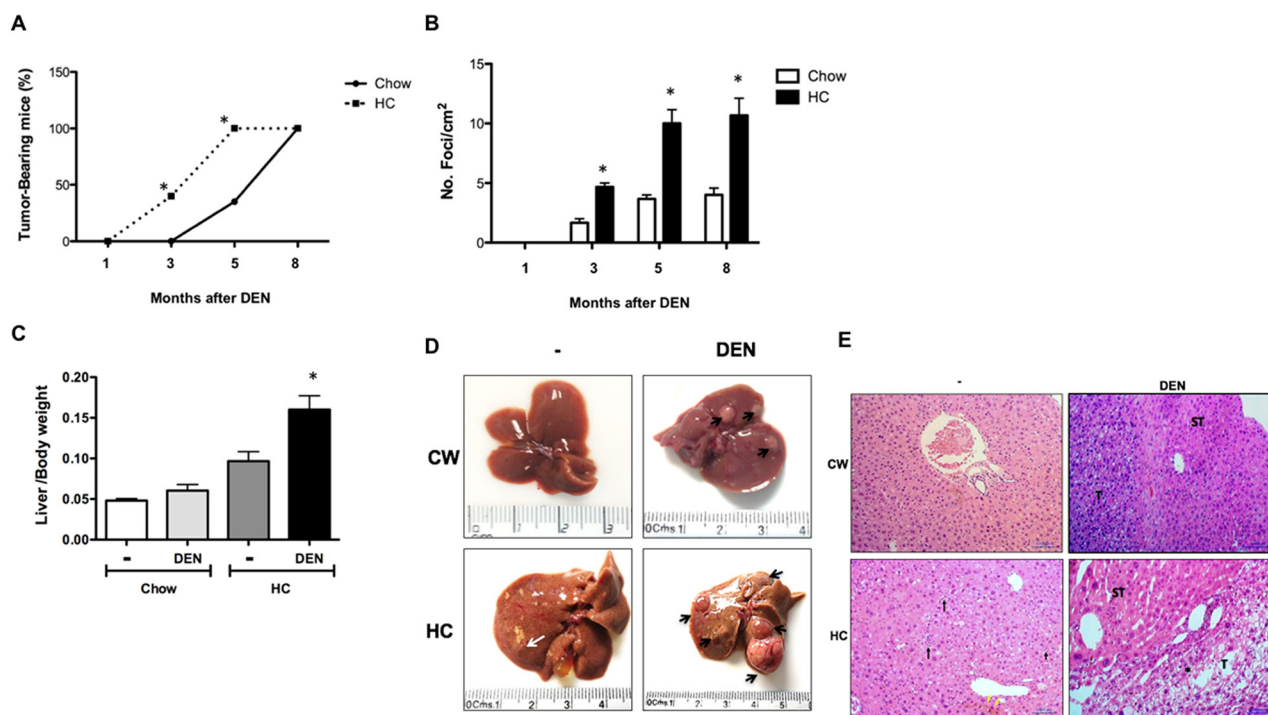
**Figure 6: N-acetylcysteine prevents oxidative stress and DNA oxidative damage.** A cohort of animals treated for 7 days received 80 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC) in drinking water *ad libitum*. (A) Reactive oxygen species content in liver tissue were determined by dihydroethidium (DHE, 5  $\mu$ M, in red) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 5  $\mu$ M, in green). Representative images obtained by confocal microscopy. Original magnification X100. (B) Serum aspartate aminotransferase (AST) activity, (C) 8-oxodeoxyGuanine (8-oxodG) content determined by HPLC. Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$  vs Chow control animals; &,  $p \leq 0.05$  vs DEN treated Chow.

mediators such as cytochrome c and Smac/Diablo, being resistance to Bax activity [23], these characteristics confers an aggressive phenotype and contributes to chemotherapy resistance. Although, cholesterol overload has been associated to apoptosis resistance, we gain evidence that, part, such response could be mediated by Bcl2 expression when liver is in presence of DEN (Figure 4A), this was related to a decrease in Bax content indicating a clear antiapoptotic effect corroborated by caspase 3 activity. Under HC diet, mitochondrial cholesterol overload [14] disturbing metabolism and impairing mitochondrial membrane dynamic [24], this could explain the antiapoptotic effect, profounder attention requires the cholesterol-mediated Bcl2 expression to exploit the potential therapeutic intervention.

ROS are the main inducers of DNA damage and, consequently, of mutations. Indeed, particularly mitochondria-derived ROS have been implicated to initiation, progression and aggressiveness of cancer [25-27]. Figure 5 shows the increment of two well-documented markers of DNA damage. The level of 8-oxodG in plasma, urine, and cerebrospinal fluids has been used as marker of DNA damage [28]. In addition, the formation of 8-oxodG is linked to epigenetic instability in human HCC [29], and it has been identified as a risk factor for the development of HCC in patients with chronic hepatitis C virus

infections. In addition, it has been suggested that these patients must be monitored carefully [30]. Taking into consideration the confidence on 8-oxodG determination as a good marker of DNA damage, our findings are remarkable indicating a broad damage induced by DEN in an hypercholesterolemic environment. Even more, activation of the H2AX, another excellent marker for DNA damage in humans [31], confirms the exacerbation of the genomic damage promoted by the high cholesterol liver content and DEN treatment.

The extensive DNA damage triggers a mechanism named DNA damage response (DDR), which detects and repairs DNA by inducing cell cycle arrest to guarantee that only cells in good conditions can progress and proliferate. Some reports indicate that activation of DDR proteins can be increased during early stages of tumorigenesis [32, 33]. It has been suggested that this response can work as a barrier for tumor development, but this is dependent of p53 activation [34]. In our system, as Figure 5D shows, p53 phosphorylation is practically abrogated in animals under HC diet, suggesting the progression of aberrant cells into the cell cycle conditioning to tumorigenesis. The results also indicate that, although ataxia-telangiectasia mutated (ATM) activation is increased in HC tissue, in DHC is downregulated but not abrogated as the other repair enzymes are. It seems that the ATM-initiated signal



**Figure 7: Mice subjected to HC diet are more susceptible than Chow mice to DEN-induced hepatocarcinogenesis.** (A) Incidence and time course of hepatic lesions from 1 to 8 months after DEN treatment, (B) multiplicity of foci per square centimeter. (C) Liver to body weight ratio at month 8. Each column or point represent the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$  vs Chow control animals; &,  $p \leq 0.05$  vs DEN treated Chow, (D) Macroscopic inspection of the livers at month 8, (E) Histology appearance by H&E staining, perilobular, periportal inflammation (black arrow), cholestasis (yellow arrow), inflammation (-), tumor (T), surrounding tissue (ST). Images are representative of at least 4 different mice, original magnification X200.



transduction is partially impaired due to one of the main downstream effectors, CHK2, which is decreased only in DHC tissue.

ATM is primarily activated by double-stranded DNA breaks (DSB), but ATR also responds to a broad spectrum of damages [35]. We have the evidence that cholesterol overload in the liver induces DNA oxidation as judged by 8-oxodG, and this triggers ATM activation. This supports previous findings that ATM and oxidative stress are related each other and, particularly, ATM seems to display protective effects [36]. Accordingly, our data clearly indicate a relation of ATM levels with a protective effect (Figure 5D). HA2X is a downstream substrate of ATM leading to the enhancement of the DDR, confirming that in high cholesterol-induced DNA damage ATM is leading the protective response.

We have previously reported that NAC supplementation can prevent carcinogenic effects of oxidative stress [18], and in the present work we confirmed once again this relevant property of NAC (Figure 6). It has been reported that ATM<sup>-/-</sup> cells are under oxidative stress and an increment in 8-oxodG has been observed, this condition was reverted by NAC treatment counteracting genetic instability [36, 37].

Our work offers the mechanism driving the enhancement of a canonical carcinogenic effect by cholesterol overload in the liver, which can promote a faster development of tumors (Figure 7) with an aggressive phenotype, judged by lung metastasis (Supplementary Figure 4), in fact, lipid metabolism has extensively been related to cancer metastasis [38], and it has recently been reported that cholesterol metabolism plays key role in metastasis in an experimental model of pancreatic cancer, the abrogation acyl-CoA cholesterol acyl transferase-1 (ACAT-1), significantly suppresses tumor growth and metastasis [39], even more, the use of simvastatin, an inhibitor of cholesterol synthesis, blocks the transforming growth factor beta-induced epithelial-mesenchymal transition, a hallmark for cancer metastasis [40], our data, leave clear the relevance of cholesterol content in cancer metastasis.

The assessment of the activation of ATM and HA2X, and the content of GPx4 and GSTM in early liver lesions could represent good prognosis factors for aggressive presentations of HCC, although many reports indicate that cancer therapies with antioxidants do not provide benefits, but detriments in some cases, definitively in carcinogenesis processes antioxidants could be fundamental, particularly those serving as precursors for endogenous antioxidants synthesis such as NAC, that cells can manages properly as we previously demonstrated [18] and confirmed in the present work.

Data confirm that cholesterol can play a relevant role not only in HCC progression but in cell transformation, by a mechanism related to the increment of ROS levels and apoptosis decrement at early times that lead to DNA

damage and initiation of carcinogenesis. Our findings are in agreement with data published by Dr. Calvisi and colleagues [6], indicating that cholesterol homeostasis-related proteins are overexpressed in HCC with poor prognosis, even more RNA-seq analysis of human HCC revealed disorders in lipid metabolism, metabolism of xenobiotics, and ATM signaling [41], some genomic reports also confirm that our mouse data are relevant in human, particularly those related with oxidative stress, DNA damage and lipid metabolism [42]. Our findings are positioning cholesterol cellular overload in the liver as a tumor promoter, inducing oxidative stress, impairing DNA damage repair system and promoting and accelerated tumor progression (Supplementary Figure 5). Hypercholesterolemia should be closely monitored in those patients with HCC risk factors.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Sixty 14-days old male mice (C57/BL6) were randomly separated in four groups: i.) fed with a high cholesterol diet (HC, 2% cholesterol and 0.5% sodium cholate) as previously reported [11, 13, 14]; ii.) HC diet and a single intraperitoneal (ip) injection of 10 µg/g body weight of DEN (Sigma-Aldrich) as previously reported [18]; control animals received regular Chow diet (CW) with iii.) or without iv.) DEN. An extra cohort of mice fed HC or Chow diet for 7 days and treated or not with DEN, received 80 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich) in drinking water *ad libitum*.

Mice were euthanized and serum and liver tissue were examined at 2, 7 or 14 days and 1, 3, 5 and 8 months. All animals were maintained in specific pathogen-free housing and cared in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Histology

Livers were fixed in 10% neutral formalin overnight at 4°C. Paraffin sections (5 µm) were stained with routine H&E for histology and quantification of liver lesions (foci). Analysis was conducted by an expert pathologist (R.H.P.).

### Western blot

Western blot was performed as we previously reported [43], using specific antibodies listed in Supplementary Table 1.

### Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assayed by the production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using spectrophotometry as described by Buege and Aust [44].

## DNA extraction, enzymatic hydrolysis, and analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) by HPLC/electrochemical detection

DNA was extracted from fresh liver samples using the chaotropic-NaI method, as we previously reported [45]. After DNA quantification using Nanodrop 2000c (Thermo Scientific Inc), samples were digested with nuclease P1 and *E. coli* acid phosphatase. 8-oxodG detection was performed as we reported previously [45]. Briefly, 100 µg of digested DNA was loaded into a HPLC coupled with an electrochemical detector (EC, Waters Inc) and the system was connected to a Supelcosil LC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) reverse-phase column (250X4.6 mm, i.d. particle size 5 µm). The eluent was 50mM potassium phosphate buffer, pH 5.5, with 8% methanol at 1 ml/min flow rate. The molar ratio of 8-oxodG in each DNA sample was determined based on EC detection at 290 mV for 8-oxodG and absorbance at 254 nm for dG.

### ROS in situ determination

Animals were euthanized in parallel exclusively for *in situ* ROS determination [12]. Fresh tissue was rapidly sectioned, frozen in liquid nitrogen, and embedded in optimum cutting temperature reagent (OCT, Sakura Finetec, Torrance, CA). Subsequently, 8-µm frozen sections were obtained in a cryostat (Leica CM-3050S) at -20°C and the slides were immediately incubated for 15 min, in the dark, at room temperature with either 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 5 µM), a cell-permeable non-fluorescent probe that is intracellularly de-esterified and converted to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation by ROS, particularly peroxides, or with dihydroethidium (DHE, 5 µM) for determination of superoxide anion radical detecting ethidium fluorescence. Samples were covered and observed using a confocal microscope at excitation and emission wavelengths of 480 and 520 nm, respectively, for DCFDA; and excitation and emission wavelengths of 485 and 570 nm, respectively, for DHE-derived ethidium fluorescence, as we previously reported [46].

### Caspase 3 activity

Caspase 3 activity was quantified using the caspase 3 synthetic fluorogenic tetrapeptide substrate Ac-DEVD-AMC (BD Pharmingen) as previously we reported [12] using fresh liver tissue, values were normalized regarding Chow sample and reported as fold change.

### Serum detection of alanine aminotransferase activity

Blood samples were obtained from each animal. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) were

determined by the automated method using Reflovet Plus (Roche).

### Glutathione determination

Both reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively) were determined using the Glutathione assay kit (Sigma-Aldrich # CS0260) following manufacturer's instructions. Values are reported as GSH to GSSG ratio.

### Protein content

Protein content was evaluated by the bicinchoninic acid protein assay (BCA) kit following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific).

### Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM of at least three independent experiments carried out in triplicate. Comparisons between groups were made using Student's *t* test, Mann Whitney and Tukey-Kramer test. GraphPad Prism 6 software for OSX was used to run analysis. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

### Abbreviations

DEN, N-diethylnitrosamine; HC, high cholesterol; CW, Chow regular diet; ROS, reactive oxygen species; HCC, hepatocellular Carcinoma; FASN, fatty acid synthase; ACLY, ATP citrate lyase; ACC, Acetyl-CoA carboxylase; MVK, mevalonate kinase; SQS, squalene synthase; HMGCR; the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; SREBP, sterol regulatory element binding protein GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; AST, aspartate aminotransferase; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; 8-oxodG, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; DCFDA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DHE, dihydroethidium; NAC, N-acetyl-L-cysteine.

### Author contributions

Cristina Enríquez-Cortina, performed Western blot experiments, cared animals, processed tissue, collaborated in manuscript draft.

Oscar Bello-Monroy, prepared tissue for histology analysis and performed histological experiments.

Patricia Rosales. Performed ROS detection in tissue Verónica Souza. Performed ROS detection in tissue and prepared images.

Roxana U. Miranda, conducted microscopy analysis.

Rafael Toledo-Pérez, performed HPLC DNA damage experiments.

Armando Luna-López, performed HPLC DNA damage experiments and analyzed that data

Arturo Simoni-Nieves, conducted apoptosis experiments and GSH determination

Rogelio Hernández-Pando. Main pathologist, interpreted the histological analysis and emitted the result.

María Concepción Gutiérrez-Ruiz, Provided funding, revised manuscript.

Diego F. Calvisi, participated in experimental design, revised manuscript.

Jens U Marquardt, participated in experimental design, revised manuscript

Leticia Bucio, performed experiments related to DNA damage

Luis Enrique Gomez-Quiroz, leader of the study, participated in experimental design, wrote manuscript, provided funding.

## ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

We thank CONACYT for financial support for Cristina Enriquez-Cortina Ph.D. studies. We also thank Roberto Lazzarini for technical support and the Confocal Core Unit of the DCBS-UAM-I, and Hiram Castillo for assistance in the animal maintenance at the animal facility of the National Rehabilitation Institute. We also thank to Dr. Carlos Pineda and Dr. Alberto López-Reyes for assistance in the project. This work was partially funded by a grant from CONACYT: Fronteras de la Ciencia #1320, SEP-PRODEP 913026–14612111, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

## CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Beloribi-Djefafli S, Vasseur S, Guillaumond F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*. 2016; 5:e189.
2. Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem*. 1995; 270:503-506.
3. Vogel A, Reuther G, Weise K, Triola G, Nikolaus J, Tan KT, Nowak C, Herrmann A, Waldmann H, Winter R, Huster D. The lipid modifications of Ras that sense membrane environments and induce local enrichment. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009; 48:8784-8787.
4. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*. 2006; 116:1582-1595.
5. Che L, Pilo MG, Cigliano A, Latte G, Simile MM, Ribback S, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Calvisi DF. Oncogene dependent requirement of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle*. 2017; 19:499-507.
6. Calvisi DF, Wang C, Ho C, Ladu S, Lee SA, Mattu S, Destefanis G, Delogu S, Zimmermann A, Ericsson J, Brozzetti S, Staniscia T, Chen X, et al. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2011; 140:1071-1083.
7. Morales A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Colell A, Fernandez-Checa JC. Hepatocarcinogenesis and ceramide/cholesterol metabolism. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012; 12:364-375.
8. Cao D, Song X, Che L, Li X, Pilo MG, Vidili G, Porcu A, Solinas A, Cigliano A, Pes GM, Ribback S, Dombrowski F, Chen X, et al. Both de novo synthesized and exogenous fatty acids support the growth of hepatocellular carcinoma cells. *Liver Int*. 2017; 37:80-89.
9. Caballero F, Fernandez A, De Lacy AM, Fernandez-Checa JC, Caballeria J, Garcia-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol*. 2009; 50:789-796.
10. Kolly P, Dufour JF. Surveillance for hepatocellular carcinoma in patients with NASH. *Diagnostics (Basel)*. 2016.
11. Gomez-Quiroz LE, Seo D, Lee YH, Kitade M, Gaiser T, Gillen M, Lee SB, Gutierrez-Ruiz MC, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS, Marquardt JU. Loss of c-Met signaling sensitizes hepatocytes to lipotoxicity and induces cholestatic liver damage by aggravating oxidative stress. *Toxicology*. 2016; 361-362:39-48.
12. Nuno-Lambarri N, Dominguez-Perez M, Baulies-Domenech A, Monte MJ, Marin JJ, Rosales-Cruz P, Souza V, Miranda RU, Bucio L, Montalvo-Jave EE, Concepcion Gutierrez-Ruiz M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Gomez-Quiroz LE. Liver cholesterol overload aggravates obstructive cholestasis by inducing oxidative stress and premature death in mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:9895176.
13. Dominguez-Perez M, Nuno-Lambarri N, Clavijo-Cornejo D, Luna-Lopez A, Souza V, Bucio L, Miranda RU, Munoz L, Gomez-Quiroz LE, Uribe-Carvajal S, Gutierrez-Ruiz MC. Hepatocyte growth factor reduces free cholesterol-mediated lipotoxicity in primary hepatocytes by countering oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:7960386.
14. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006; 4:185-198.
15. Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and

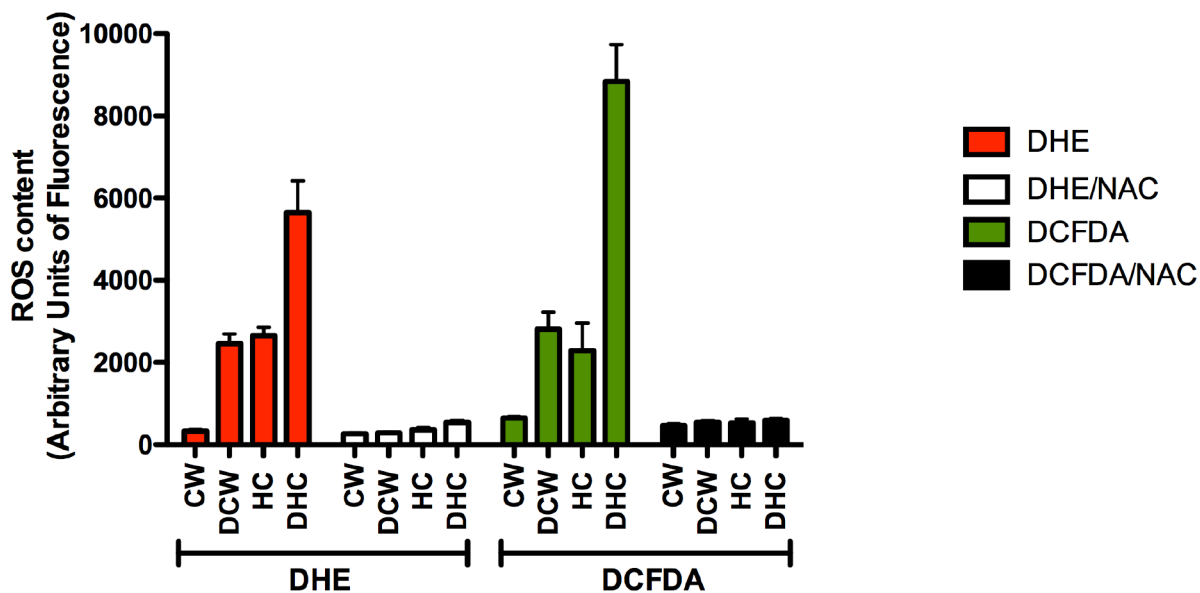


- sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008; 283:14581-14589.
16. Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, Lopez-Reyes A, Dominguez-Perez M, Nuno N, Dominguez-Meraz M, Bucio L, Souza V, Factor VM, Thorgeirsson SS, Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie.* 2013; 95:1177-1184.
  17. Linhart K, Bartsch H, Seitz HK. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biol.* 2014; 3C:56-62.
  18. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, Thorgeirsson SS. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2007; 67:9844-9851.
  19. Ameer F, Scanduzzi L, Hasnain S, Kalbacher H, Zaidi N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism.* 2014; 63:895-902.
  20. Deep G, Schlaepfer IR. Aberrant lipid metabolism promotes prostate cancer: role in cell survival under hypoxia and extracellular vesicles biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016.
  21. Liang H, Van Remmen H, Frohlich V, Lechleiter J, Richardson A, Ran Q. Gpx4 protects mitochondrial ATP generation against oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356:893-898.
  22. Guerriero E, Capone F, Accardo M, Sorice A, Costantini M, Colonna G, Castello G, Costantini S. GPX4 and GPX7 over-expression in human hepatocellular carcinoma tissues. *Eur J Histochem.* 2015; 59:2540.
  23. Montero J, Morales A, Llacuna L, Lluís JM, Terrones O, Basanez G, Antonsson B, Prieto J, Garcia-Ruiz C, Colell A, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008; 68:5246-5256.
  24. Ribas V, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clin Transl Med.* 2016; 5:22.
  25. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science.* 2008; 320:661-664.
  26. Sabharwal SS, Schumacker PT. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat Rev Cancer.* 2014; 14:709-721.
  27. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab.* 2014; 2:17.
  28. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, Nielsen PE, Weimann A. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840:801-808.
  29. Nishida N, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Kudo M. Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis.* 2013; 31:459-466.
  30. Chuma M, Hige S, Nakanishi M, Ogawa K, Natsuzaka M, Yamamoto Y, Asaka M. 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23:1431-1436.
  31. Rey S, Quintavalle C, Burmeister K, Calabrese D, Schlageter M, Quagliata L, Cathomas G, Diebold J, Molinolo A, Heim MH, Terracciano LM, Matter MS. Liver damage and senescence increases in patients developing hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2017; 32:1480-1486.
  32. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Orntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature.* 2005; 434:864-870.
  33. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 2005; 434:907-913.
  34. Weber AM, Ryan AJ. ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Ther.* 2015; 149:124-138.
  35. Marechal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013.
  36. Takao N, Li Y, Yamamoto K. Protective roles for ATM in cellular response to oxidative stress. *FEBS Lett.* 2000; 472:133-136.
  37. Reliene R, Fischer E, Schiestl RH. Effect of N-acetyl cysteine on oxidative DNA damage and the frequency of DNA deletions in atm-deficient mice. *Cancer Res.* 2004; 64:5148-5153.
  38. Luo X, Cheng C, Tan Z, Li N, Tang M, Yang L, Cao Y. Emerging roles of lipid metabolism in cancer metastasis. *Mol Cancer.* 2017; 16:76.
  39. Li J, Gu D, Lee SS, Song B, Bandyopadhyay S, Chen S, Konieczny SF, Ratliff TL, Liu X, Xie J, Cheng JX. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene.* 2016; 35:6378-6388.
  40. Xie F, Liu J, Li C, Zhao Y. Simvastatin blocks TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Oncol Lett.* 2016; 11:3377-3383.
  41. Huang Q, Lin B, Liu H, Ma X, Mo F, Yu W, Li L, Li H, Tian T, Wu D, Shen F, Xing J, Chen ZN. RNA-Seq analyses generate comprehensive transcriptomic landscape and reveal complex transcript patterns in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2011; 6:e26168.
  42. Niu ZS, Niu XJ, Wang WH. Genetic alterations in hepatocellular carcinoma: an update. *World J Gastroenterol.* 2016; 22:9069-9095.

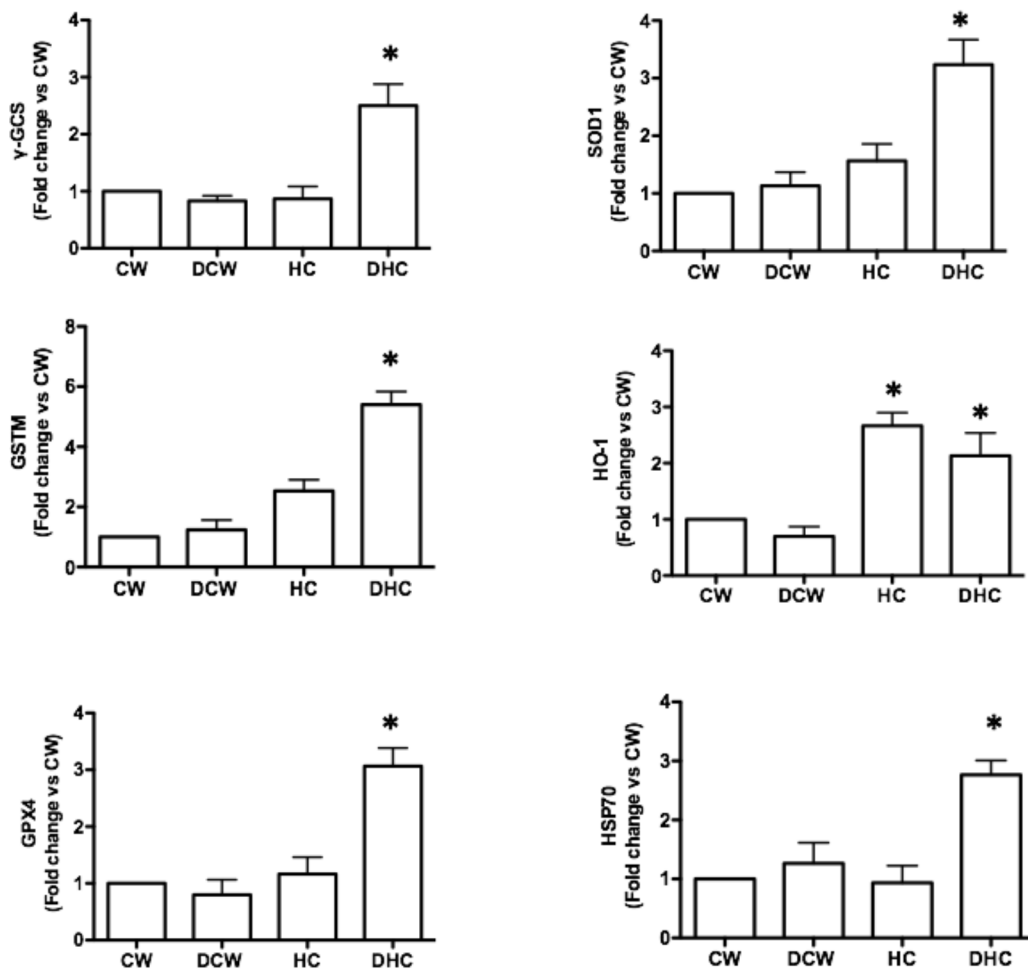
43. Clavijo-Cornejo D, Gutierrez-Carrera M, Palestino-Dominguez M, Dominguez-Perez M, Nuno N, Souza V, Miranda RU, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC, Bucio L, Gomez-Quiroz LE. Acetaldehyde targets superoxide dismutase 2 in liver cancer cells inducing transient enzyme impairment and a rapid transcriptional recovery. *Food Chem Toxicol.* 2014; 69:102-108.
44. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-310.
45. Luna-Lopez A, Triana-Martinez F, Lopez-Diazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutierrez-Ruiz MC, Damian-Matsumura P, Zentella A, Gomez-Quiroz LE, Konigsberg M. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49:1192-1204.
46. Enriquez-Cortina C, Almonte-Becerril M, Clavijo-Cornejo D, Palestino-Dominguez M, Bello-Monroy O, Nuno N, Lopez A, Bucio L, Souza V, Hernandez-Pando R, Munoz L, Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE. Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicol Sci.* 2013; 135:26-36.

## Cholesterol overload in the liver aggravates oxidative stress-mediated DNA damage and accelerates hepatocarcinogenesis

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

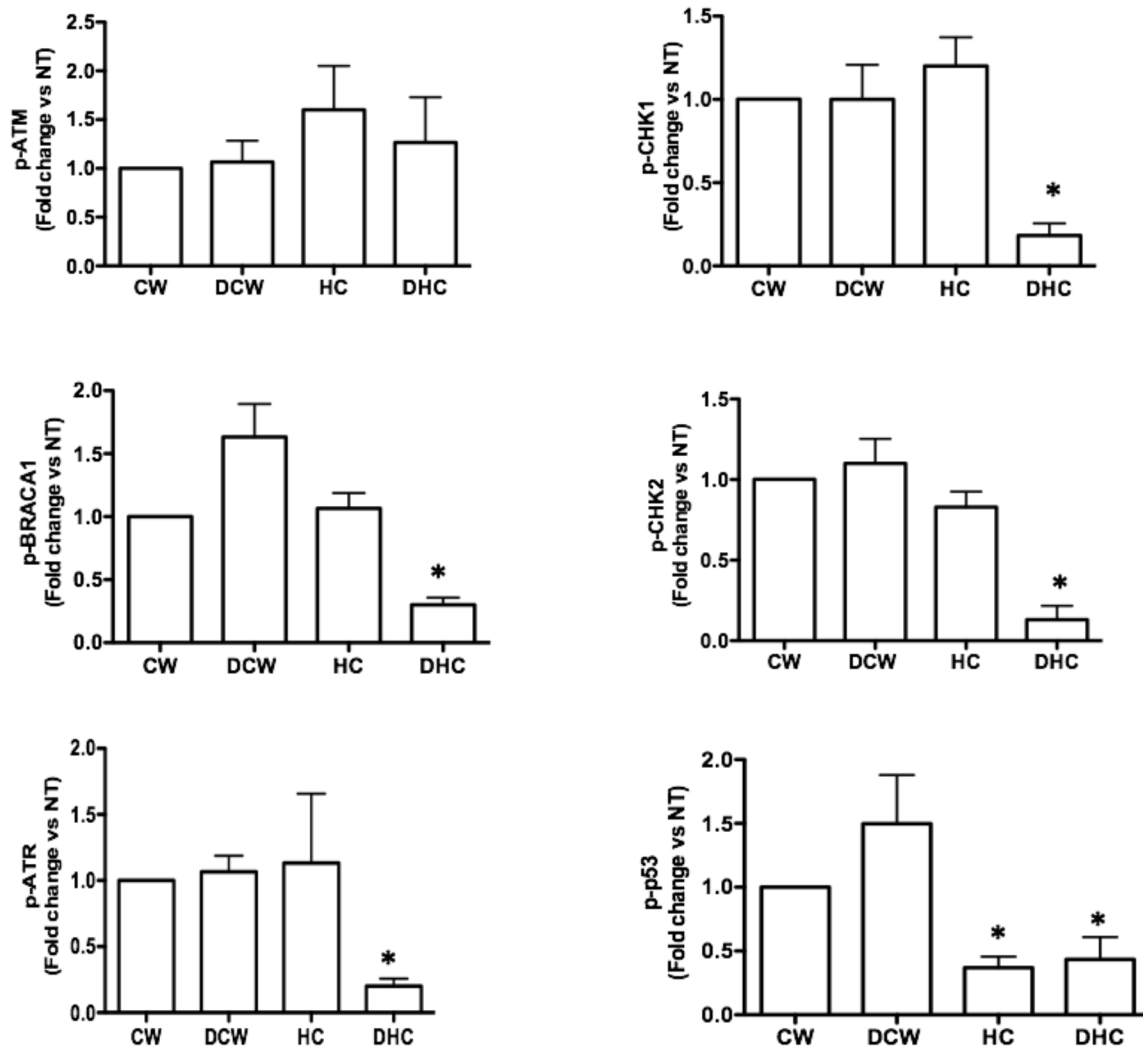


**Supplementary Figure 1: Reactive oxygen species quantification in liver tissue.** ROS determine at day 7 by dihydroethidium (DHE, 5  $\mu$ M) and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA, 5  $\mu$ M) in presence or absent of NAC. Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice.

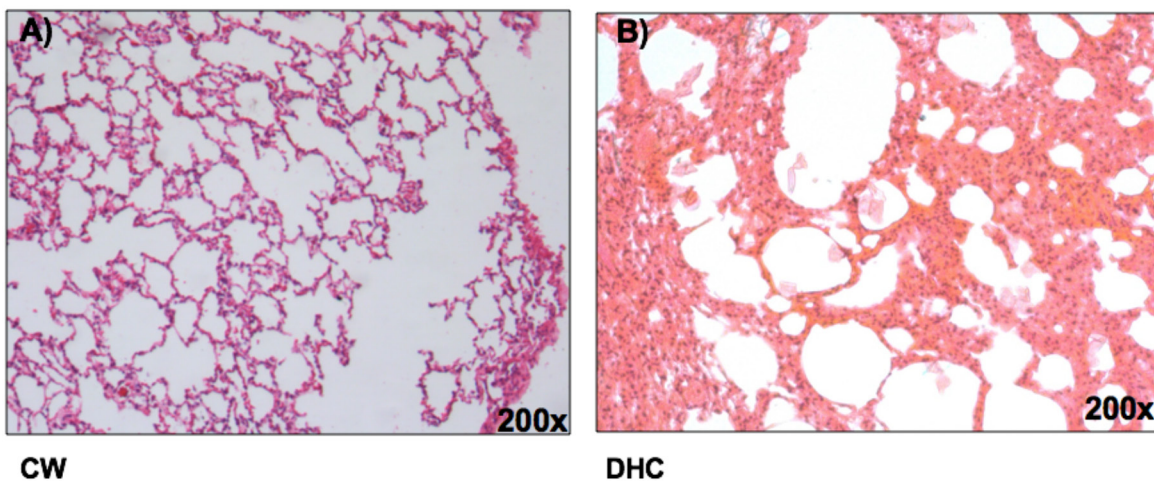


**Supplementary Figure 2: Densitometric analysis of antioxidant and protective proteins.** Each column represents the mean  $\pm$  SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$  vs Chow fed animals (CW).

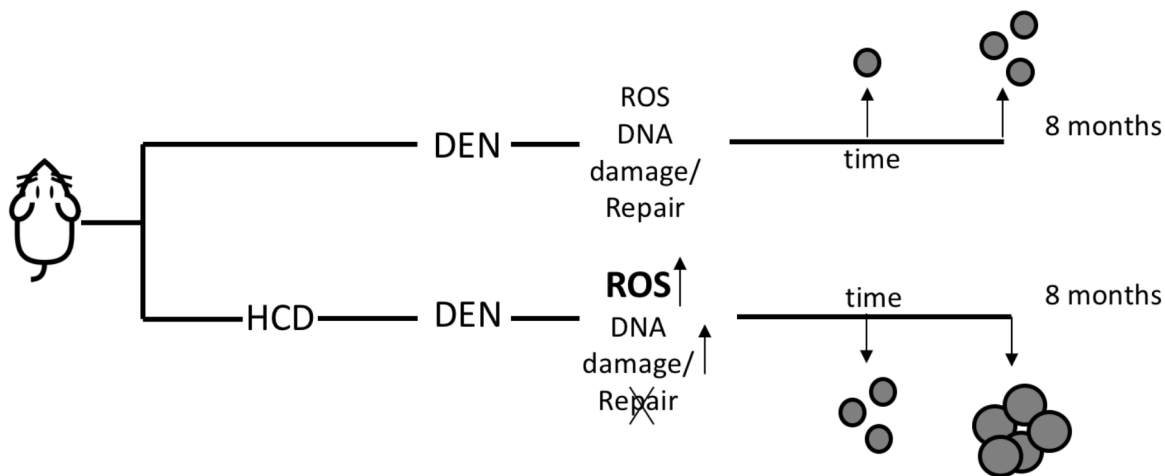




**Supplementary Figure 3: Densitometric analysis of DNA repair-related enzymes.** Each column represents the mean ± SEM in at least four different mice. \*,  $p \leq 0.05$  vs Chow fed animals (CW).



**Supplementary Figure 4: DEN treatment induces lung metastasis under HC diet at month 8.** Histology analysis by H&E routine staining of lungs from (A) Control Chow (CW) animals; (B) DEN treated mice under high cholesterol (HC) diet exhibiting the metastasis.



**Supplementary Figure 5: Graphical overview of main findings.** Cholesterol overload in the liver accelerates the carcinogenic process induced by DEN, increasing ROS content and impairing DNA repair machinery, generating tumors at early times and increased in size comparing with animals under normal diet. HCD, high cholesterol diet; DEN, N-diethylnitrosamine; ROS, reactive oxygen species.

Supplementary Table 1: Antibodies used in the study

Antibody	Company	Catalog number	dilution
Actin	Sigma	A2228	1:1000
Bax	Santa Cruz	6236	1:200
Bcl-2	Santa Cruz	783	1:200
GPX4	Abcam	41787	1:1000
GSTm	Santa Cruz	FL-218	1:200
HO-1	Santa Cruz	5141S	1:200
HSP70	Santa Cruz	1060	1:200
p-ATM (Ser1981)	Cell Signaling	5883	1:1000
p-ATR (Ser428)	Cell Signaling	2853	1:1000
p-BRCA1(Ser1524)	Cell Signaling	9009	1:1000
p-CHK1(Ser345)	Cell Signaling	2348	1:1000
p-CHK2 (Thr68)	Cell Signaling	2197	1:1000
p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	9101	1:1000
p-H2AX (Ser139)	Cell Signaling	9718	1:1000
p-p53 (Ser15)	Cell Signaling	9286	1:1000
gamma-GCS	Santa Cruz	22755	1:200