



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE B7-H3 DURANTE LA
FORMACIÓN DE LESIONES PRE-NEOPLÁSICAS DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR EN RATA.**

Tesis que presenta

Q.F.B. CHRISTIAN GONZÁLEZ REYES

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en la Especialidad de

BIOLOGÍA CELULAR

Director de tesis:

Dr. Saúl Villa Treviño

Dra. Verónica Rocío Vásquez Garzón

Asesores:

Dra. Guadalupe Reyes Cruz

Dr. José Manuel Hernández Hernández

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 50 de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la tutoría del Dr. Saúl Villa Treviño y de la Dra. Verónica Rocío Vázquez Garzón.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con la beca de maestría número 392474 y el donativo 178558.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi querida Madre
por apoyarme siempre y en todo momento
e impulsarme a continuar adelante.

Te amo mamá.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Saúl Villa Treviño por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo, confianza y tolerancia.

A la Dra. Verónica Rocío Vázquez Garzón por sus comentarios y sugerencias en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Reyes Cruz y al Dr. Juan Manuel Hernández Hernández por sus comentarios y aportaciones a este trabajo.

A Samia, Eunice, Sergio, Leo y Clarita, por su ayuda y apoyo dentro del laboratorio, que hacen que funcione correctamente.

A mis compañeros del laboratorio 50, Nancy, Jacobo, Tita, Sol, Vale, Moni, Ruth, Carlos por sus críticas y opiniones.

A mis compañeros de generación, en especial a Tania, Aydé y Mariana.

A mi familia, hermanos Yareli y Osiris por ser parte de mi vida.

A mis hermanos del alma, Toño, Naye, Ismael, Jorge que siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas, cerca y a distancia.

A todos: Gracias.

ABREVIATURAS

RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
CD	Cúmulo de diferenciación
CPA	Células presentadoras de antígeno
CTLA-4	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
NK	Asesinas naturales
MMHR	Modelo modificado del hepatocito resistente
CAPE	Fenetil éster del ácido cafeico
DEN	N-dietilnitrosamina
2-AAF	2-acetilaminofluoreno
HP	Hepatectomía parcial
PBS	Tampón fosfato salino
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GMNA	L-ácido glutámico γ -4-metoxi- β -naftilamida
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico
Ac	Anticuerpo
TBS	Tampón tris salino
IHC	Inmunohistoquímica

BSA	Albúmina sérica bovina
GST-p	Glutación sulfihidrilo tranferasa isoforma placentaria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	
Características fisiológicas de las células cancerosas	2
Figura 2	
Etapas del proceso de carcinogénesis química	7
Figura 3	
Diagrama del MMHR indicando los días de sacrificio	12
Figura 4	
Peso de ratas tratadas con el modelo MMHR comparado con peso de ratas control	20
Figura 5	
DEN induce necrosis y presenta infiltrado inflamatorio	22
Figura 6	
Expresión relativa de B7-H3 por qRT-PCR	23
Figura 7	
Comparación de Microarreglos vs qRT-PCR	24
Figura 8	
Detección de lesiones pre-neoplásicas en hígado por GGT	25
Figura 9	
Evaluación de integridad de extracción de proteínas	26
Figura 10	
Western Blot de B7-H3	27
Figura 11	
Análisis densitométrico de las bandas de B7-H3 detectadas por Western Blot	28
Figura 12	
Controles positivos para detección de GSTp, B7-H3, CD 8 y CD4	30
Figura 13	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados sin tratamiento	30

Figura 14	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 24 horas pos-tratamiento con DEN	31
Figura 15	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 7 días pos-tratamiento con DEN	31
Figura 16	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 11 días pos-tratamiento completo	32
Figura 17	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 16 días pos-tratamiento completo	32
Figura 18	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 30 días sin tratamiento	33
Figura 19	
Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 30 días pos-tratamiento completo	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Dilución de los anticuerpos utilizados para identificar B7-H3 y actina	17
Tabla 2. Dilución de los anticuerpos utilizados para IHC	19

RESUMEN

El proceso de carcinogénesis sigue una serie de procesos bioquímicos, celulares y tisulares que resultan en la formación de tumores malignos. La hepatocarcinogénesis química en la rata es un modelo muy útil que permite el estudio de estos cambios durante todo el proceso a través del análisis de biomarcadores que se expresan desde tiempos muy tempranos en el desarrollo de neoplasias. B7-H3 es una proteína transmembranal tipo I, designada como CD276. Recientemente, la expresión de B7-H3 se ha encontrado en varios tipos de cáncer, incluyendo carcinoma renal de células claras, cáncer de próstata pancreático, gástrico, ovario, colorrectal y carcinoma de células uroteliales. En este estudio analizamos el patrón de expresión de B7-H3 en tejido hepático de ratas tratadas con el modelo modificado del hepatocito resistente durante la formación de lesiones pre-neoplásicas. Encontramos que existe una correlación a nivel transcripcional y traduccional de B7-H3, a nivel de RNAm y proteína, observando aumento en los niveles conforme avanza el proceso de formación pre-neoplásica. También evidenciamos que existe una mayor expresión de B7-H3 en regiones nodulares que en hepatocitos del tejido que la rodea; la localización de B7-H3 es en membrana así como en citoplasma y existe mayor cantidad de células T citotóxicas CD8⁺ en estas regiones, lo que sugiere que exista una relación funcional entre éstas moléculas.

ABSTRACT

The process of cancer progression follows a series of biochemical, cellular and tissue changes which results in the formation of malignant tumor. Chemical hepatocarcinogenesis in the rat is an useful model for the study of these changes during the whole process through the analysis of protein markers that expresses since the initial steps in the tumor formation process. B7-H3 is a type I-transmembrane protein, named as CD276. Recently, the expression of B7-H3 has been found in several kinds of cancer, including clear cell renal cell carcinoma, prostate cancer pancreatic cancer, gastric cancer, ovarian cancer, colorectal cancer and urothelial cell carcinoma. In this study we analyzed the expression pattern of B7-H3 in liver tissue from rats treated with the resistant hepatocyte model modified during the formation of pre-neoplastic lesions. We found a transcriptional and translational correlation at the level of B7-H3, a protein and mRNA level, noting increased levels according as the process of pre-neoplastic formation. Also we found that there is increased expression of B7-H3 in nodular regions than in hepatocytes of surrounding tissue; the localization of B7-H3 is in membrane as well as in cytoplasm and there is a greater amount of CD8⁺ cytotoxic T cells in these regions, suggesting that there is a functional relationship between these molecules.

Índice

ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Carcinoma hepatocelular.....	3
1.2 Características fisiológicas del cáncer.....	4
1.3 Inmunidad antitumoral.....	5
1.4 B7-H3.....	6
1.5 Etapas de la carcinogénesis experimental.....	8
1.6 Herramientas de diagnóstico.....	9
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo general.....	13
4.2 Objetivos particulares.....	13
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
5.1 Animales de experimentación.....	14
5.2 Procesamiento del hígado.....	15
5.3 Inclusión en parafina.....	15
5.4 Cortes histológicos y cuantificación de proteínas.....	15
5.5 Determinación histoquímica de GGT.....	16
5.6 Tinción Hematoxilina-eosina.....	16
5.7 qRT-PCR.....	17
5.8 Western-blot.....	18
5.9 Inmunohistoquímica (IHC).....	20
6.0 RESULTADOS.....	22
6.1 DEN y 2-AAF producen pérdida de peso en ratas después de su administración.....	22
6.2 DEN induce necrosis en el hígado 24 horas después de su administración.....	23
6.3 Validación de la expresión relativa de B7-H3 por qRT-PCR.....	25

6.4 Detección de lesiones pre-neoplásicas en hígado pr GGT.	27
6.5 Expresión de B7-H3 a nivel de proteína.	28
6.6 Expresión y localización de B7-H3 con células del sistema inmune en lesiones pre-neoplásicas.	30
7.0 DISCUSIÓN.....	36
8.0 CONCLUSIONES	40
9.0 PERSPECTIVAS	41
10. REFERENCIAS.....	42

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Carcinoma hepatocelular.

El carcinoma hepatocelular es uno de los tumores malignos más frecuentes en países en desarrollo y su tratamiento es deficiente; A nivel mundial es el quinto cáncer más común y la tercera causa de muerte por cáncer [1, 2]. Los factores de riesgo en el desarrollo del carcinoma hepatocelular son: la infección por virus de la hepatitis tipo B y C, el consumo exagerado de alcohol, cirrosis hepática, la exposición a toxinas (aflatoxina), enfermedades metabólicas hereditarias (hemocromatosis), hepatitis autoinmune, sobrepeso, diabetes mellitus, entre otras. [3].

Los pacientes con carcinoma hepatocelular en etapas tempranas o con nódulos pre-neoplásicos no presentan síntomas, sin embargo, cuando el tumor aumenta de tamaño ocasiona presión al tejido adjunto así como a otros órganos provocando dolor [4]. Existen otros síntomas como pérdida de apetito y de peso, fiebre de origen desconocida, pérdida sensorial, entre otros. Desafortunadamente, cuando este tipo de cáncer es diagnosticado las posibilidades de tratamiento son muy pocas y poco efectivas [5]. El diagnóstico se realiza mediante técnicas de imagenología así como serológicas. Los tratamientos abarcan desde el trasplante hepático, la resección del cáncer hepático, la inyección de alcohol, la ablación por radiofrecuencia o la quimioembolización [6].

En la actualidad, no es posible hacer un diagnóstico práctico y seguro en etapas tardías y menos aún en etapas tempranas, esta situación sumada a la escasa viabilidad y efectividad de los tratamientos, anticipan una supervivencia muy baja. Para su cura, la detección temprana juega un papel crucial, lo que contribuiría a la solución de una de las causas de muerte más importantes por cáncer. De ahí que el estudio de las etapas tempranas de la carcinogénesis ha tenido gran importancia para entender mejor el origen y progresión de dicha enfermedad, así como para encontrar métodos de diagnóstico efectivos. El estudio de la biología celular del cáncer nos dará herramientas para comprender los procesos biológicos alterados durante esta enfermedad.

1.2 Características fisiológicas del cáncer.

Hanahan *et al* en 2000 identificaron las características fisiológicas principales que adquieren las células cancerosas, como son: evasión de la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales anti-crecimiento, potencial replicativo ilimitado, invasión de tejido y metástasis, así como una angiogénesis sostenida [7]. Ahora en 2011, los mismos autores enfatizan cuatro nuevas características de la célula tumoral, la primera está involucrada en el fenómeno de la inflamación, la segunda que tempranamente evade la respuesta inmune, la tercera está relacionada con la desregulación energética y la cuarta está asociada con una inestabilidad genómica y mutaciones (Fig. 1), [8].



Figura 1. Características fisiológicas de las células cancerosas.

Las células iniciadas en el proceso cancerígeno, así como las lesiones pre-neoplásicas y los tumores, tienen la capacidad de evadir a las células efectoras de la respuesta inmune ya que desregulan la expresión de las moléculas que participan en el reconocimiento y/o destrucción de las células tumorales, a este proceso se le conoce como evasión de la respuesta inmune. En los tumores

existe una baja inmunogenicidad de las células, además de una subversión del sistema inmune [9]. En estudios epidemiológicos de lesiones pre-malignas o cancerosas tempranas, se ha visto que la respuesta inmune aumenta vigorosamente; sin embargo, a pesar de la intensa respuesta de las células efectoras del sistema inmune innato y adaptativo, no se llega a cumplir su función antitumoral en la carcinogénesis. En los últimos años, se ha asociado la subversión del sistema inmune en la carcinogénesis a las moléculas llamadas co-estimuladoras que regulan negativamente la respuesta inmune [10, 11]. A nivel de expresión de RNA mensajero (RNAm) en un análisis de microarreglos realizados en nuestro laboratorio encontramos un gran número de genes asociados a inflamación y respuesta inmune, algunos de estos genes están presentes desde la etapa de iniciación hasta la formación de tumores, así mismo, existen genes que sólo se expresan en una etapa, ya sea la de iniciación, la de promoción o la de progresión. Estos resultados sugieren que existe una inmunovigilancia, sin embargo, su eficacia no es suficiente para inhibir el desarrollo del cáncer [9]. En este fenómeno de la evasión del sistema inmune parecen participar moléculas descritas clásicamente de co-estimulación (CD80/B7-1 y CD86/B7-2) y que pueden realizar una función inhibitoria o activadora [10]. El conocer con seguridad la expresión de ciertas moléculas que regulan negativamente la respuesta inmune nos permitiría incursionar en sus mecanismos de acción durante el establecimiento de tumores. Además, si al interferir con su sobre-expresión, se puede restablecer la respuesta inmune y podríamos proponer posibles blancos terapéuticos tempranos.

1.3 Inmunidad antitumoral.

Los linfocitos T del sistema inmune adaptativo reconocen y responden específicamente a una increíble variedad de antígenos [12]. Para garantizar una respuesta adecuada las células T son activadas por dos vías de señalización independientes ya que estas células son esenciales para erradicar agentes patógenos principalmente intracelulares, mantener la tolerancia citotóxica antitumoral y mantener la auto-tolerancia. La primera señal, en la superficie de células presentadoras de antígeno (CPA), requiere el reconocimiento del complejo principal de histocompatibilidad. La segunda

señal, independiente del complejo de histocompatibilidad, se realiza por moléculas co-estimuladoras de la familia B7/CD28 [12]. La señalización de B7-1(CD80)/B7-2(CD86):CD28/CTLA-4 representa la mejor vía de co-estimulación. La unión de B7-1 en células presentadoras de antígeno con CD28 en las células T aumenta la proliferación de células T y la producción de IL-2 [10]. En ausencia de esta señal de co-estimulación simultánea, la unión a un péptido antigénico en las CPA puede resultar en disfunción de células T, tolerancia o anergia. Aparte de las señales de estimulación a células T, las vías co-estimuladoras también pueden enviar señales inhibitorias que regulan a la baja o incluso cancelan las respuestas de células T. La unión de CTLA-4 a B7-1 y/o B7-2 inhibe la síntesis de IL-2 y la progresión del ciclo celular que conduce a la terminación de la respuesta de células T [11]. Se sugiere que la familia de homólogos B7 es reguladora potencial de la inmunidad antitumoral. Por ejemplo, la expresión B7-H1 en células cancerosas se ha asociado con características patológicas adversas y pobres resultados al tratamiento en los diferentes tumores de seres humanos, por lo que esta familia de co-activadores ha sido postulada como parte importante del mecanismo por el cual los tumores malignos pueden evadir la respuesta inmune [13, 14]. En el carcinoma hepatocelular se ha propuesto que la sobreexpresión de B7-H1 puede mediar el escape inmunológico, además dificulta la inmunoterapia basada en células T CD8⁺ [15]. Se ha reportado que exceptuando a los macrófagos, el tejido de seres humanos normal no expresa B7-H1, pero se ha descrito que B7-H1 se presenta de manera abundante en el carcinoma de pulmón, en el de ovario, en el de colon y en los melanomas; su presencia se correlaciona con la apoptosis de células T [16].

1.4 B7-H3.

B7-H3 es una proteína transmembranal tipo I, designada como CD276, tiene una homología en sus aminoácidos entre el 20% y 27% con los miembros de la familia B7. Adicionalmente, la estructura terciaria guarda una similitud mayor con varias isoformas de la familia B7. B7-H3 es la más conservada con ~ 88% de identidad de aminoácidos entre el ratón y el ser humano. El RNAm de B7-H3 se expresa de manera apreciable en varios tejidos, mientras que la proteína se expresa en concentraciones bajas, lo que sugiere la participación de una

regulación post-transcripcional [17]. Se ha reportado una isoforma de splicing, denominada B7-H3b, con cuatro dominios tipo Ig en lugar de dos que se origina de la duplicación de genes y splicing diferencial [18]. La isoforma con dos dominios tipo Ig se denominó 2IgB7-H3 y se expresa en roedores. B7-H3b en seres humanos es la principal isoforma expresada en varios tejidos y el cDNA de esta proteína fue clonado y se denominó 4IgB7-H3 [19, 20]. La proteína B7-H3 como molécula co-estimuladora accesoria, no se expresa constitutivamente en las células T, en las células NK, ni en células presentadoras de antígeno, pero su expresión puede ser inducida. A diferencia de B7-1 y B7-2 cuya expresión está limitada a células del sistema inmune como las CPA, la proteína B7-H3 se encuentra en osteoblastos, fibroblastos y células epiteliales, así como en hígado, pulmón, vejiga, testículo, próstata, mama, placenta, y en órganos linfoides [21]. Este amplio patrón de expresión sugiere una diversidad inmunológica mayor y probablemente una función no inmunológica, especialmente en tejidos periféricos. Recientemente, la expresión de B7-H3 también se ha encontrado en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de próstata, renal, pancreático, gástrico, ovario, colorrectal y carcinoma de células uroteliales [22-29].

Hashiguchi *et al*, encontraron que la unión B7-H3 con TLT-2 en células T CD8⁺ aumenta las funciones efectoras de las células T, como es la producción de citocinas [30]. Sin embargo, este tipo de interacción *in vivo* en el ratón y en el ser humano no se ha podido comprobar. Leitner *et al*, bajo diferentes condiciones experimentales, direccionado al potencial funcional de B7-H3 de seres humanos demostraron que no co-estimula a las células T, por el contrario, disminuye su proliferación y la producción de citocinas, así como también afecta a las células T vírgenes activadas. Además demostraron que la interacción B7-H3-células T se caracteriza por una supresión temprana de IL-2 [31]. Una de las explicaciones a los resultados contradictorios obtenidos para B7-H3 es que el nivel de expresión de B7-H3 sea determinante en las células cancerosas y participe en diferentes funciones inmunológicas e interacción, dependiendo de su afinidad con los receptores ya existentes. Esta discrepancia funcional con respecto a los niveles de expresión de una molécula co-estimuladora en cáncer también se ha descrito para B7-1 [32]. Aunque, estos descubrimientos sugieren la posibilidad de la participación de B7-H3 en la

regulación de la inmunidad antitumoral, su función exacta no es clara, ya que se ha descrito que presenta ante el sistema inmune, tanto las propiedades estimuladoras como las inhibitorias. Se sabe que B7-H3 de ser humano se une a un receptor desconocido de las células T activadas CD4+ y CD8+. Este receptor es diferente de CD28, CTLA-4, PD1 e ICOS, de los cuales se conoce se unen a los miembros de la familia B7 [33]. A pesar de que existe información de la actividad co-estimuladora de B7-H3, la mayoría de la evidencia que existe de la función sobre las células T es la de inhibir su funcionalidad. Suh y colaboradores demuestran *in vivo* que B7-H3 subregula células Th1, lo que conduce a la inhibición de la proliferación de las células T [34]. En otros estudios se han visto los efectos negativos de la sobreexpresión de B7-H3, por ejemplo, en cáncer de pulmón y en carcinoma colorrectal, se correlaciona inversamente con el número de linfocitos infiltrados en el tumor [23]. En un estudio en pacientes con cáncer de pulmón los niveles en circulación de B7-H3 soluble se correlacionó con un estado de agresividad mayor del tumor: tamaño, metástasis nodal y metástasis distal [35]. En otro estudio clínico, B7-H3 se encontró uniformemente expresado en adenocarcinoma de próstata [29]. Estos resultados muestran que la alta expresión de B7-H3 se correlaciona con una etapa más avanzada del cáncer, con un infiltrado menor de linfocitos al tumor, así como con un tiempo de supervivencia significativamente menor. El estudio de la participación de B7-H3 en cáncer está en sus inicios pero hay evidencia suficiente de que esta molécula de co-estimulación está participando en la evasión del sistema inmune, esencial para el establecimiento de los tumores.

1.5 Etapas de la carcinogénesis experimental.

El desarrollo del cáncer es un proceso complejo y multifacético que para su estudio experimental se ha dividido en tres etapas conceptuales: iniciación, promoción y progresión. La primera etapa hace referencia a la inducción de mutaciones claves, ocasionada por los carcinógenos las cuales requieren ser fijadas mediante un ciclo de replicación, (fig. 2) [36]. Una vez que la célula ha sido iniciada, requiere de un estímulo proliferativo, que promueve la expansión clonal de la célula iniciada durante la etapa de promoción. La etapa de promoción es esencial para el aumento en el número de células iniciadas, las

cuales adquieren mutaciones y cambios epigenéticos adicionales que les permiten proliferar descontroladamente. Existen cambios asociados que favorecen su crecimiento como son, alteración de vías de señalización que participan en ciclo celular, proliferación, metabolismo; de manera conjunta, todos estos factores promueven la formación de focos de células pre-neoplásicas. Por último en la etapa de progresión, además del aumento en el número de células transformadas, existe un incremento en el número de mutaciones que les confieren una inestabilidad genética y un fenotipo maligno [37].

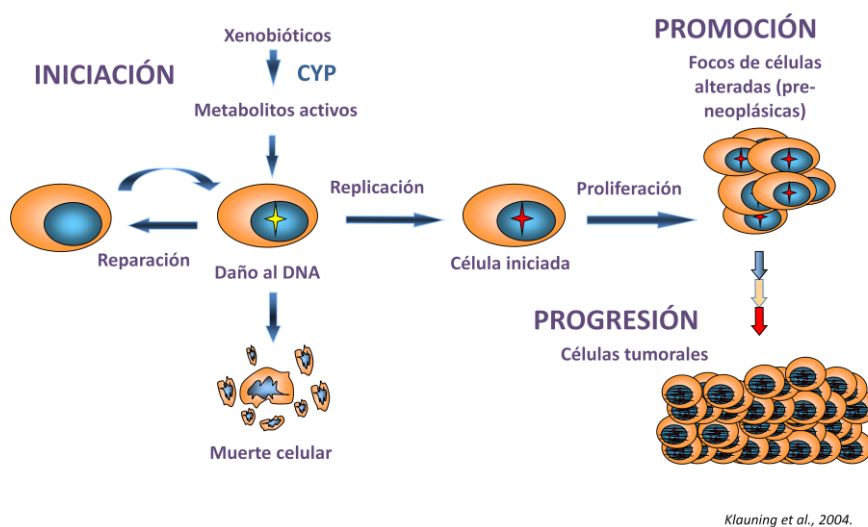


Figura 2. Etapas del proceso de carcinogénesis química.

1.6 Herramientas de diagnóstico.

La utilización de modelos experimentales en cáncer permite estudiar a detalle las modificaciones biológicas existentes además de detectar la presencia de las proteínas alteradas mediante diferentes estudios. Para el cáncer hepático se han descrito varios modelos experimentales, dentro de los que destaca el modelo modificado del hepatocito resistente (MMHR). En este modelo con sólo tres intervenciones, se reproducen las etapas de la carcinogénesis en el hígado de la rata en un periodo relativamente corto. Este modelo experimental ha permitido el estudio del proceso carcinogénico *per se*, así como el uso de agentes quimioprotectores para prevenir o revertir la progresión de dicha enfermedad. También, se ha demostrado que sustancias antioxidantes, como el CAPE o agentes anti-inflamatorios como el Celecoxib, previenen o revierten

el desarrollo del cáncer con administraciones únicas o diarias [38, 39]. Gracias al uso de microarreglos se ha podido evaluar la expresión de genes a gran escala y con la ayuda de este modelo se pueden evaluar los cambios que presentan los genes durante el desarrollo del cáncer hepático, permitiendo descubrir puntos claves en la evolución del cáncer así como mecanismos de quimioprevención [40].

Utilizando el MMHR se elaboraron microarreglos de expresión de *Affymetrix Gene Chip Exon Rat 1.0* el cual contenía 32,000 spots con 28,000 genes conocidos de rata. Los resultados de estos microarreglos fueron transformados y normalizados mediante el programa "Partek Genomics Suite Software" y analizados con Anova de una vía con una prueba de "Tukey's post hoc test". Posteriormente se realizó el análisis bioinformático usando el programa Ingenuity Pathway Analysis 7.6, el cual se basa en la información de las publicaciones científicas disponibles en la red tanto de textos completos como de bibliotecas extensivas de vías de señalización así como información química y farmacéutica. Este programa permite clasificar los genes en 3 vías principales: Toxicológicas, Biológicas y Canónicas.

En Vías Biológicas, en la clasificación de enfermedades y desórdenes encontramos dentro de la sub-clasificación de la respuesta inmune 560 genes alterados durante el desarrollo del cáncer de hígado. Esta expresión diferencial de 560 genes clasificados dentro de los fenómenos de inflamación y respuesta inmune sugiere la participación activa del sistema inmune, pero debido a las características del modelo en que por ensayo y error se han introducido intervenciones para reproduciblemente inducir el cáncer de hígado en el 100% de los animales, la respuesta antitumoral no es eficiente. Es obvio que en nuestro modelo, en donde el registro histórico muestra que se induce el cáncer de hígado en el 100 % de las ratas, se lleva a cabo la evasión del sistema inmune, característica primordial para el desarrollo del cáncer. Consecuentemente concentramos nuestra atención en los genes que muestran características inhibitorias de la respuesta inmune en los tiempos iniciales cuando la vigilancia inmunológica es más intensa [9]. Varios genes de proteínas inhibitorias se encontraron sobre-expresados y dentro de ellos destaca B7-H3. Para este gene encontramos valores de sobre expresión de 3 veces respecto al control, desde la etapa de iniciación hasta la progresión del

tumor. La alta sobreexpresión en nuestro modelo lo hacen un candidato muy atractivo para analizar el papel que tiene en la iniciación del cáncer hepatocelular, lo que ayudaría a entender su función biológica y sus posibles moléculas de interacción.

2. JUSTIFICACIÓN

Basándonos en estudios previos que mostraron que el RNAm y proteína de B7-H3 se sobre-expresan en diversos tipos de cáncer de seres humanos y los resultados de ensayos con microarreglos realizados en nuestro laboratorio donde los niveles de RNAm se encuentran sobre-expresados en el MMHR justifican nuestra propuesta de analizar la proteína para entender mejor su participación en el desarrollo del cáncer.

3. HIPÓTESIS

Congruente con la propuesta del papel co-inhibitorio de B7-H3 sobre las células T, las células iniciadas sobre-expresan la proteína B7-H3 durante la formación de lesiones pre-neoplásicas del MMHR en rata.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Caracterizar *in vivo* la expresión de la proteína B7-H3 en las células iniciadas y su relación con las células del sistema inmune durante la formación de lesiones pre-neoplásicas del cáncer de hígado en el MMHR en rata.

4.2 Objetivos particulares.

- Determinar los niveles de RNAm para B7-H3 durante la formación de lesiones pre-neoplásicas.
- Determinar la expresión de la proteína B7-H3 durante la formación de lesiones pre-neoplásicas.
- Realizar en tiempos específicos inmunolocalizaciones de B7-H3 y células del sistema inmune (Lc T CD4/CD8) en los tejidos hepáticos de las ratas durante la formación de lesiones pre-neoplásicas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Animales de experimentación.

Para este estudio se utilizaron ratas machos Fisher-344 de 180-200 g de peso, proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN (los animales fueron tratados según las normas vigentes indicadas por el comité de ética) y se colocaron en grupos de 10 animales en jaulas de acero galvanizado con libre acceso al agua y alimento, con ciclo de luz-oscuridad de 12 h y humedad relativa a 50 %, a una temperatura de 21 ± 1 °C por un mes antes de su sacrificio.

Fueron tratadas de acuerdo al protocolo de hepatocarcinogénesis de Sample-Roberts modificado [41, 42], se iniciaron administrando intraperitonealmente 200 mg/kg de peso de N-dietilnitrosamina (DEN) como única dosis; a los días 7, 8 y 9 se les administraron 20 mg/kg de peso de 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) vía intragástrica y al día 10 se les realizó una hepatectomía parcial (HP) de 3/5 partes del hígado. Las ratas fueron sacrificadas a las 24h, 7, 11, 16 y 30 días posteriores a la iniciación y se les extrajo el hígado y plasma (Fig 3). Como controles positivos para los marcadores CD4, CD8, CD69 se utilizó una rata sin tratamiento a la que se le extrajo el bazo, timo, páncreas, próstata y apéndice. Como control negativo se utilizaron hígados de ratas no tratadas.

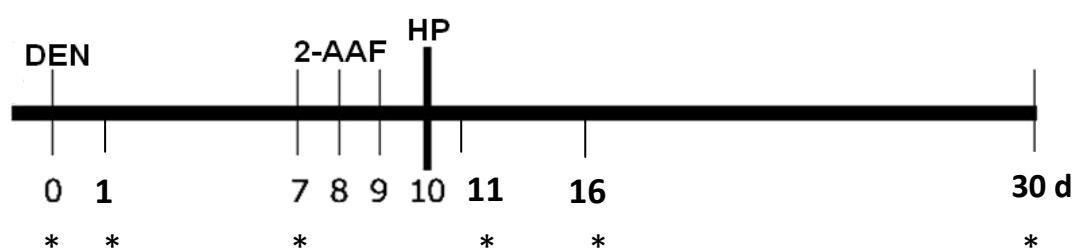


Figura 3. Diagrama del MMHR indicando los días de sacrificio. Se representan los tiempos del modelo que se utilizarán y se enfatizan los días de sacrificio.

5.2 Procesamiento del hígado.

El hígado fue extraído de las ratas y enjuagado en tampón de fosfatos salino (PBS) frío hasta eliminar la mayor cantidad de sangre. El hígado fue fraccionado y seleccionado al azar para cortes histológicos en fresco, cada fracción fue congelada en nitrógeno líquido en presencia del crioprotector tisular 2-metilbutano (J.T. Baker) durante 5 min y fueron almacenados a -70°C en un ultra congelador hasta su utilización. Otras fracciones del hígado fueron colocadas en formaldehído al 4% en PBS pH 7.4 durante 72 h para posteriormente realizar el procedimiento de deshidratación e inclusión en parafina.

5.3 Inclusión en parafina.

Las fracciones de hígado conservadas en formaldehído durante 72 h fueron cortadas en fracciones pequeñas y formas regulares, se colocaron en una canastilla para deshidratarlas en etanol al 80% toda la noche. Al día siguiente se colocaron en etanol al 96% (Golden bell) a una temperatura de 58-60° C durante 50 min, tres veces. A continuación se colocaron en una mezcla de 50/50 VV de etanol-xilol (J.T.Baker) a una temperatura de 58-60° C durante 50 min. Enseguida se colocaron en xilol al 100% a una temperatura de 58-60°C durante 50 min, tres veces. Posteriormente se pasaron por tres recipientes que contienen parafina líquida, manteniéndose en cada uno a 58-60°C durante 50 min. Finalmente los tejidos deshidratados se colocaron en los moldes de aluminio y se recubrieron con parafina limpia, se pasaron al hielo hasta que solidificó la parafina.

5.4 Cortes histológicos y cuantificación de proteínas.

Los cortes histológicos, para los tejidos en fresco fueron realizados con un criostato (Leyca) y con un micrótopo (Microm) para los tejidos incluidos en parafina, con un grosor de 20 y 3 µm respectivamente.

Para la extracción de proteínas, 200 mg de tejido congelado fue homogeneizado en un homogeneizador mecánico con 10 golpes de 5 s en 800 µL de buffer de fosfatos que contenía 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich), 137

mM de NaCl (Química Meyer), 4.6 mM de KCl (J.T. Baker), 1.1 mM KH₂PO₄ (J.T. Baker), 0.6mM de MgSO₄ (J.T. Baker), 0.1 mM de EDTA (Research Organics) y media tableta de complete (Roche). Se determinó la cantidad de proteínas en cada muestra por el método de Lowry usando albúmina para la curva estándar. Posteriormente se prepararon con buffer de Laemmli's y β-mercaptoetanol y fueron conservadas a -70°C hasta ser utilizadas en western-blot.

5.5 Determinación histoquímica de GGT.

La actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) fue detectada en cortes histológicos, se utilizó el L-ácido glutámico γ-4-metoxi-β-naftilamida (GMNA) (Sigma-Aldrich) como sustrato logrando la formación de un precipitado rojo, como fue reportado por Rutenburg *et al.*, 1969. Los cortes histológicos fueron fijados con etanol al 96% a -20° durante 5 min y se incubaron durante 20 min con una solución que contenía 125 µg/mL de GMNA, 0.5 mg/mL de glicilglicina (Sigma-Aldrich) y 0.5 mg/mL de azul rápido (Sigma-Aldrich) en 25 mM de Tris base (Sigma-Aldrich). Finalmente los precipitados fueron fijados con una solución de sulfato cúprico 100 mM.

5.6 Tinción Hematoxilina-eosina.

Los cortes histológicos fueron colocados 15 min a una temperatura de 60°C, enseguida fueron tratados con xilol a 60°C por 15 min seguido de xilol a temperatura ambiente por 5 min. A continuación se realizaron tres pases por etanol al 96% por 3 min cada uno, seguido de etanol al 70% por 3 min, se lavaron con agua bidestilada y fueron teñidos con hematoxilina de Harris por 10 min, se lavaron con agua bidestilada, se pasaron por alcohol ácido por 20 s, se lavaron 2 veces, se colocaron en solución amoniacal por 10 s, se lavaron 2 veces, se pasaron por etanol al 70% por 1 min y fueron teñidos con una solución de eosina por 10 s. Posteriormente se pasaron por una solución de etanol al 70%, 96% por 40 s, y tres veces por xilol por 40 s cada uno, finalmente se culminó montándose con resina.

5.7 qRT-PCR.

El estudio de la expresión del transcrito B7-H3 se realizó por la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). La RT-PCR es un ensayo rápido, sensible y reproducible, ya que la generación del amplicón se puede observar conforme la amplificación progresa, lo que elimina el análisis post-PCR. En este ensayo se utilizó una sonda TaqMan que es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13-18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un quencher o apagador, de tal forma que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero.

El RNA total fue aislado a partir de 60 mg de tejido hepático congelado, utilizando el reactivo TRIPURO[®] (Roche Diagnostics). El tejido fue homogeneizado y los complejos nucleoprotéicos fueron separados por extracción con fenol-cloroformo; la fase acuosa fue recuperada por centrifugación. El RNA fue precipitado de la fase acuosa con isopropanol y se recuperó por centrifugación. El RNA recuperado se disolvió en agua libre de Rnasa y su concentración fue determinada en un espectrofotómetro UV-Vis (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) a 260 nm. Para evitar la contaminación con DNA genómico todas las muestras de RNA fueron tratadas con Dnasa I libre de RNAsa. La integridad de RNA de cada muestra se verificó en un gel de agarosa desnaturizante con formaldehído. El RNA total fue convertido a cDNA por transcripción reversa. Los ensayos de RT-PCR se realizaron en un solo paso con la mezcla de la PCR y la sonda Taqman (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Para cada reacción de 15 μ L, se utilizó lo siguiente:

Reactivo	Cantidad
Master Mix	7.5 μ L
Agua	6.1 μ L
Sonda TaqMan	0.4 μ L
cDNA	1 μ L

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un sistema de PCR (StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems), con los siguientes pasos: se posiciona a una temperatura de 50°C durante 2 min y a una temperatura de 95°C durante 10 min que permite la activación de la enzima DNA polimerasa. Posteriormente realizó 40 ciclos con temperaturas a 95°C por 15 s lo que permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena y temperatura de 60°C de 1min donde realiza la elongación. Finalizada la reacción se analizaron los resultados, lo cuales fueron por triplicado para cada muestra, ajustado el umbral de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y se calcularon los valores en unidades de expresión relativa con ayuda del programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft). Este procedimiento se realizó para la proteína de interés B7-H3 como para el control interno la fracción ribosomal 18s.

5.8 Western-blot.

El método se basa en la separación electroforética de las proteínas por carga y tamaño en un gel de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y posteriormente en la transferencia a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) [43]. La membrana fue primeramente incubada con leche en polvo descremada para bloquear los sitios inespecíficos y después incubada con el anticuerpo (Ac) primario que reconoce a la proteína de interés. Posteriormente se agregó el Ac secundario que se encuentra unido covalentemente a la peroxidasa de rábano, enzima que oxida a un sustrato produciendo un cuanto de luz que sensibiliza una placa fotográfica.

Electroforésis. En cada corrimiento electroforético se utilizaron 50 µg/µL de proteína por carril de la proteína preparada con buffer de Laemmli's y β-mercaptoetanol. Se utilizaron geles de poliacrilamida-SDS al 10 % en un sistema Bio-Rad (Mini-PROTEAN Tetra system) y se aplicó un voltaje constante de 100 V hasta que el colorante se observó al final de la parte inferior del gel (aproximadamente 100 min).

Transferencia. La transferencia se realizó a membranas PVDF (Merck-Millipore) a un voltaje constante de 250 mA durante 150 min en una cámara de transferencia de inmersión Bio-Rad (Mini-PROTEAN 2-D). Para verificar la eficiencia de la transferencia, el gel fue teñido con azul de Coomassie durante toda la noche y la membrana con rojo de Ponceau durante 5 min.

Inmunodetección. El bloqueo de los sitios inespecíficos de la membrana se llevó a cabo incubando las membranas de PVDF con solución bloqueadora, leche 5 % en TBS-Tween₂₀ 0.1% (Sigma-Aldrich), durante 1 h a temperatura ambiente; después del bloqueo, la membrana se lavó 6 veces durante 5 min con TBS-Tween₂₀ 0.1%, se incubó con el Ac primario (Tabla 1) diluido en solución de boqueo durante toda la noche a 4° C con agitación suave y constante en la oscuridad. Al día siguiente, se lavó con solución de lavado 6 veces durante 5 min, se bloqueó por segunda vez durante 10 min y se incubó con el Ac secundario peroxidado en solución de bloqueo (Tabla 1) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la membrana 6 veces durante 5 min. Las bandas de B7-H3 (Santa Cruz Biotechnology) y actina (proporcionado por Dr. José Manuel Hernández) se visualizaron por exposición en una película fotográfica (X-Omat AR, Kodak) por medio de la reacción quimioluminiscente de la peroxidasa sobre la membrana de PVDF con ayuda de luminol (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas de B7-H3 se digitalizaron utilizando un escáner digital (Pixma, Canon) y posteriormente se realizó el análisis densitométrico utilizando el software Image J 1.46r.

Tabla 1. Dilución de los anticuerpos utilizados para identificar B7-H3 y actina.

Ac primario	Dilución	Ac secundario	Dilución
Rabbit anti-B7-H3	1:1000	Anti-Rabbit	1:10000
Mouse anti-actina	1:100	Anti-mouse	1:10000

5.9 Inmunohistoquímica (IHC).

Los cortes histológicos embebidos en parafina se colocaron en la estufa a 58-60°C durante toda la noche para desparafinar. Al siguiente día se colocaron durante 20 min en xilol a 58-60° C. Posteriormente se pasaron por diferentes soluciones sumergiendo 30 veces en cada una: xilol, alcohol-xilol, alcohol 96, 90, 80, 70, 60 % y finalmente se lavaron con agua, esto con la finalidad de deshidratar el tejido. A continuación se colocaron en buffer de citratos pH 6 y se introdujeron en olla express durante 10 min para exponer el antígeno. Se les colocó TBS-Tritón 0.2% durante 5 min para hacer el tejido permeable. Se realizaron bloqueos con avidina por 10 min (Invitrogen), se enjuagó con tampón tris salino (TBS) 1x; se bloqueó con biotina por 10 min (Invitrogen), se enjuagó con TBS 1x. Se realizó un segundo bloqueo con H₂O₂ al 1% en metanol por 20 min, se enjuagaron con TBS 1x. Colocamos PBS con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% por 10 min. Al término de esto, se colocó el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo y se incubó en cámara húmeda toda la noche a 4°C; para el caso de los isotipos, solo se colocó solución de bloqueo.

Al día siguiente, se lavó 3 veces con TBS 1x Tritón 0.2 %, se enjuagó 3 veces con TBS 1x. Se colocó el anticuerpo secundario, se incubó en cámara húmeda a 37°C por 1 h. Transcurrido este tiempo, se lavó 3 veces con TBS 1x Tritón 0.2 %, se enjuagó 3 veces con TBS 1x. Se colocó una gota de estreptavidina (Dako), se incubó 15 min a 37°C en cámara húmeda. Se enjuagó 3 veces con TBS 1x. A continuación se reveló con el Kit de sustrato DAB para HRP (Invitrogen), en 1 mL de H₂O bidestilada se colocó una gota del reactivo 1, una gota de reactivo 2 y una gota de reactivo 3, se mezcló y colocó 50 µL de esta mezcla a la muestra, se observó al microscopio y se detuvo la reacción con agua.

Una vez revelado, se contratiñó con Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) por 15 s, se lavó con agua y se colocó en soluciones para deshidratar el tejido (alcohol 60, 70, 80, 90, 96 %, alcohol-xilol, xilol 2 y xilol 1), sumergiendo 30 veces en cada una. Se colocó una gota de resina sintética (Hycel) sobre el tejido y sobre ésta un cubreobjetos. Las laminillas fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70) y se obtuvieron imágenes a través de una cámara digital conectada a la computadora por medio del programa analizador de imágenes (analySIS 3.0 Opti).

Tabla 2. Dilución de los anticuerpos utilizados para IHC.

Ac primario	Dilución	Ac secundario	Dilución
Rabbit anti-B7-H3	1:100	Universal	1 gota
Goat anti-GSTp	1:100	Universal	1 gota
Mouse anti-CD4	1:100	Universal	1 gota
Mouse anti-CD8	1:100	Universal	1 gota

B7-H3, GSTp (Santa Cruz Biotechnology). CD4 (Abcam). CD8 (LifeSpan Biosciences). Universal (Dako).

6.0 RESULTADOS.

6.1 DEN y 2-AAF producen pérdida de peso en ratas después de su administración.

Las ratas tratadas con el MMHR fueron pesadas de lunes a viernes para determinar si la administración de DEN así como el 2-AAF afecta el peso de la rata; de igual manera se realizó el mismo procedimiento con ratas control. Los valores obtenidos se grafican y se muestran en las figuras 4 y 5 respectivamente. Como se observa en la fig. 4, después de la administración de DEN se observa una disminución en el peso de las ratas de manera notoria en los días 1 y 2, que se mantienen en peso y comienza a subir al día 7 que es cuando se administra el carcinógeno promotor y se observa nuevamente una disminución en el peso que posteriormente se hace notoria después de la HP; esto las mantiene en un peso estable hasta que posteriormente ganan peso. En el caso de las ratas control se observa ganancia de peso día con día.

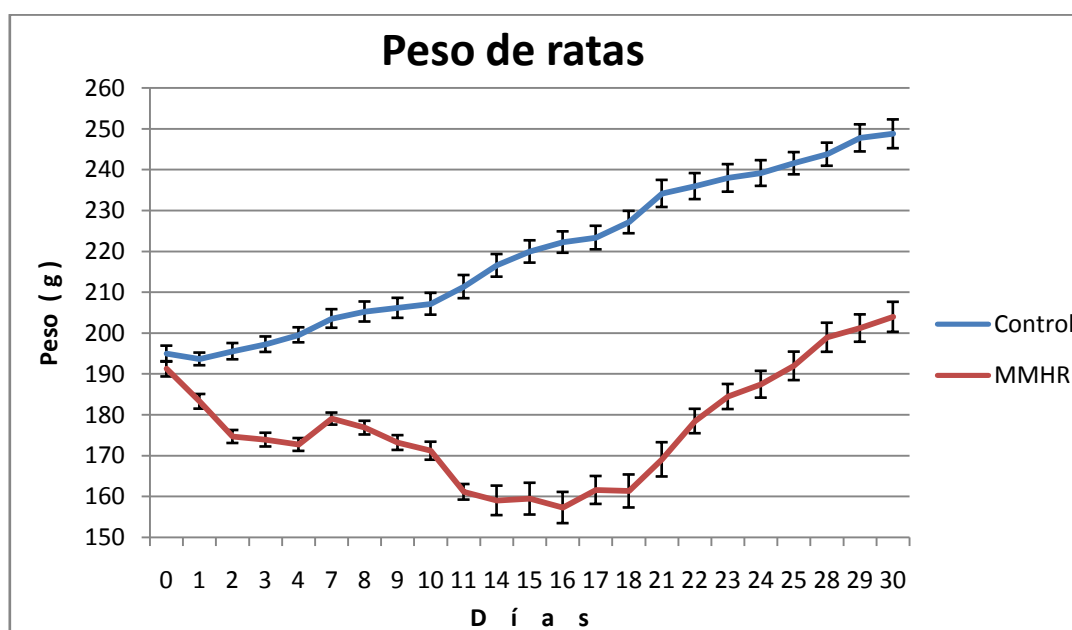


Figura 4. Peso de ratas tratadas con el modelo MMHR comparado con peso de ratas control. Los resultados muestran una disminución notoria en el peso después de la administración de DEN y 2-AAF, en cambio Las ratas control no muestran disminución en el peso, se observa ganancia de peso de manera progresiva.

6.2 DEN induce necrosis en el hígado 24 horas después de su administración.

El análisis de las tinciones con hematoxilina-eosina revela que el DEN genera necrosis generalizada en el hígado después de 24 h de su administración. En la figura 6 se muestran las fotografías representativas de las tinciones con hematoxilina-eosina para cada uno de los tiempos de sacrificio establecidos en el modelo. En el hígado sin tratamiento se observa la organización estructural típica del parénquima (fig. 5 A). A las 24 horas se pueden observar huecos en el tejido además de infiltrado inflamatorio y los hepatocitos circundantes se encuentran destruidos o con morfología anormal, estas características indican necrosis que se observa en gran parte del tejido (fig. 5 B). A los 7 días después de la administración del carcinógeno, se observa poca necrosis, el hígado está prácticamente regenerado aunque la estructura es desordenada (Fig 5 C). A partir de los 11 y 16 días, posteriores a la administración de DEN y una vez que el carcinógeno promotor es administrado, se puede observar gran cantidad de infiltrado inflamatorio así como la presencia de hepatocitos con citoplasmas más grandes y núcleos menos acidófilos (fig. 5 D, E). Para los 30 días, se aprecia la estructura del tejido altamente desordenada, hepatocitos con un gran citoplasma y núcleos pequeños así como una zona transparente alrededor del núcleo (fig. 5 F).

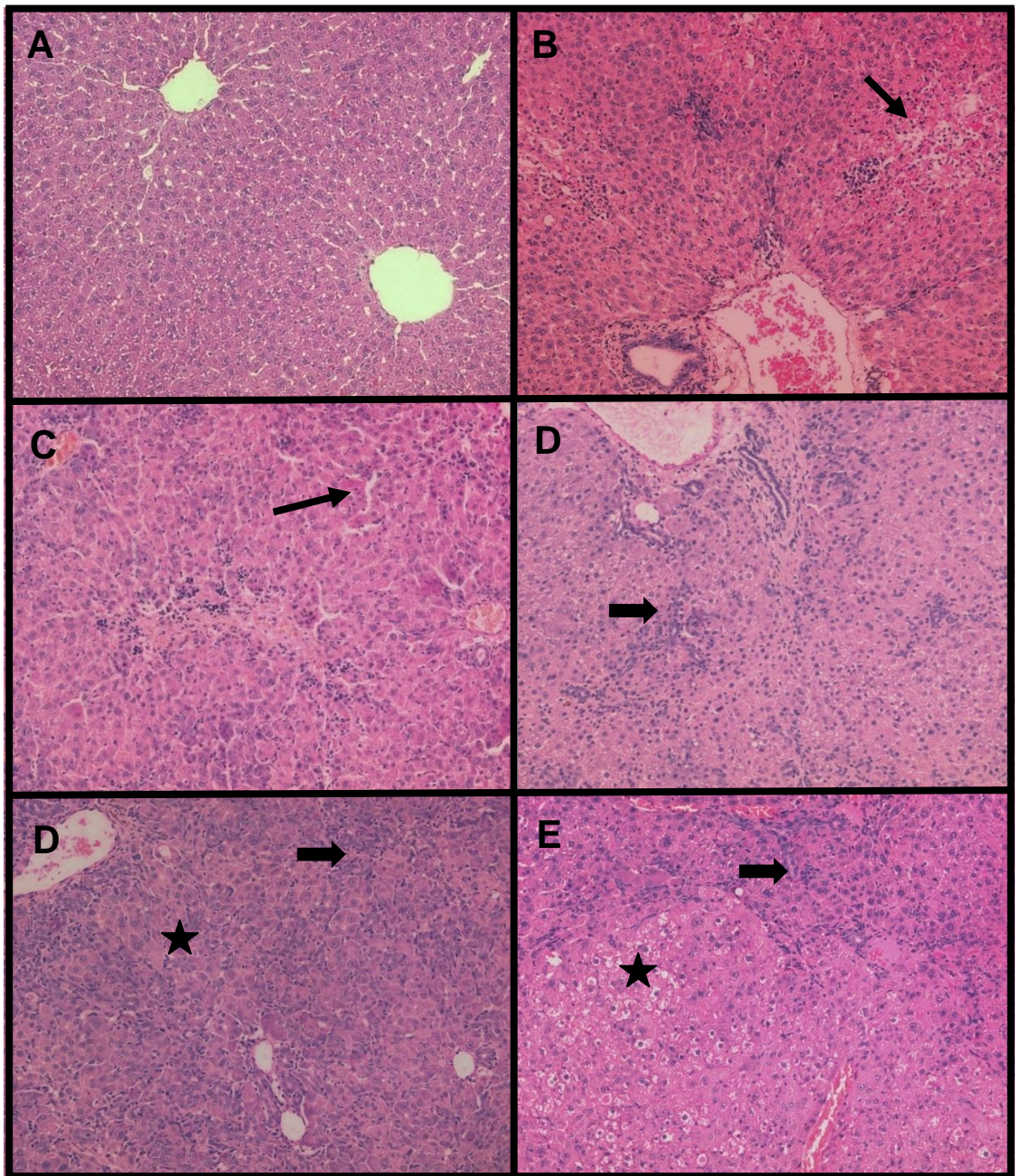


Figura 5. DEN induce necrosis y presenta infiltrado inflamatorio. Tinciones con hematoxilina-eosina de cortes de 3 μm de espesor. A. Control sin tratamiento; B. 24 h; C. 7 d; D. 11 d; E. 16 d; F. 30 d después de la administración intraperitoneal de 200 mg/Kg de DEN, 20 mg/Kg de 2-AAF. \rightarrow Sitios necróticos. \rightarrow Infiltrado inflamatorio. \star Hepatocitos con estructura alterada.

6.3 Validación de la expresión relativa de B7-H3 por qRT-PCR.

El RNA íntegro y de pureza mayor de 1.8 se convirtió a cDNA. Se realizó la amplificación del transcrito B7-H3. Para la qRT-PCR se eligieron los tiempos representativos 24 horas, 7, 11, 16, 30 días después de la administración de DEN con sus respectivos controles, ya que éstos fueron los tiempos a los cuales se sobre-expresó en mayor cantidad el mensajero de B7-H3 según los resultados de microarreglos. En la figura 6, podemos observar que, en todos los tiempos, la expresión de B7-H3 se ve aumentada con respecto al control. La mayor expresión del mensajero de B7-H3 se observa a los 7 días en hígados de ratas tratadas con DEN, seguido por las lesiones nodulares a los 30 días. (p menor a 0.05, n=3).

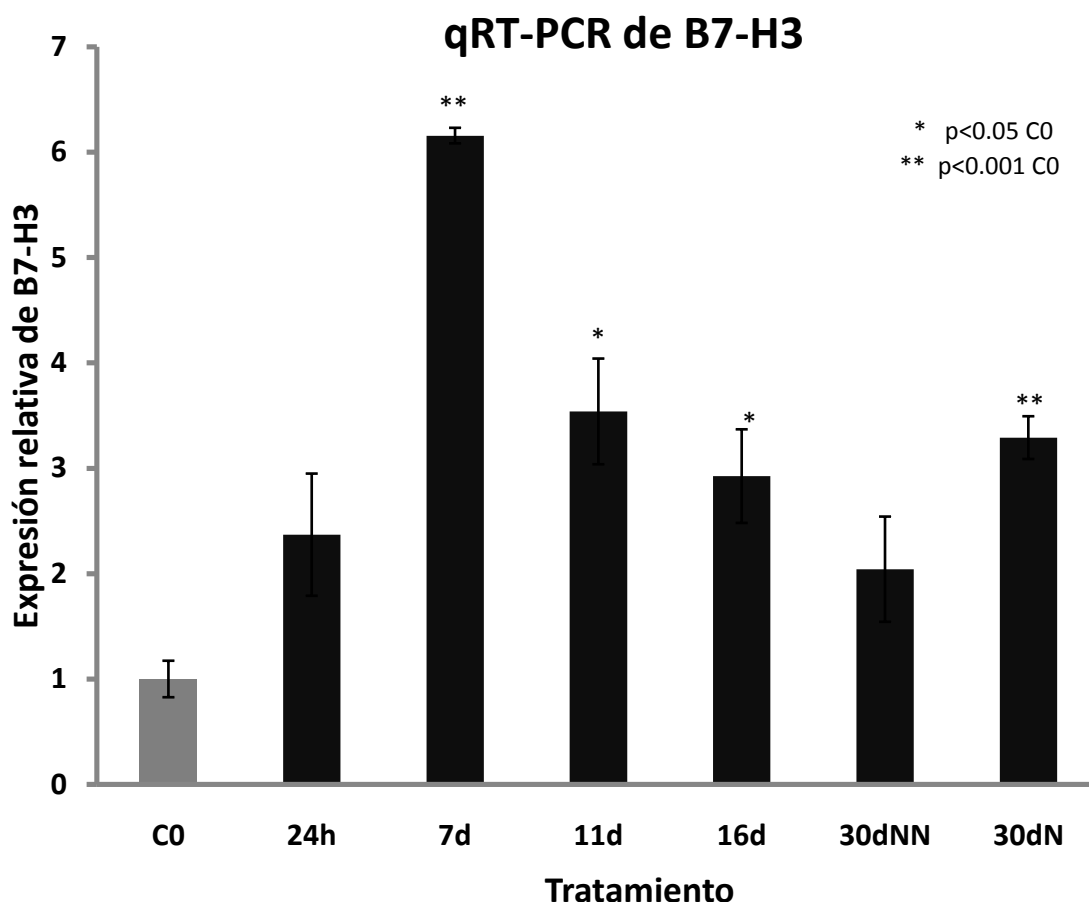


Figura 6. Expresión relativa de B7-H3 por qRT-PCR. En la gráfica se puede observar la expresión de B7-H3 en hígados de ratas con tratamiento con respecto a su control sin tratamiento. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Los resultados del transcrito de B7-H3 por la técnica de qRT-PCR son comparados con los resultados obtenidos por microarreglos (O. Beltrán-Ramírez, resultados no publicados), nos indican que existe un comportamiento similar en el patrón de expresión relativa con ambas técnicas utilizadas, al aparecer sobre-expresadas con respecto al control (fig. 7).

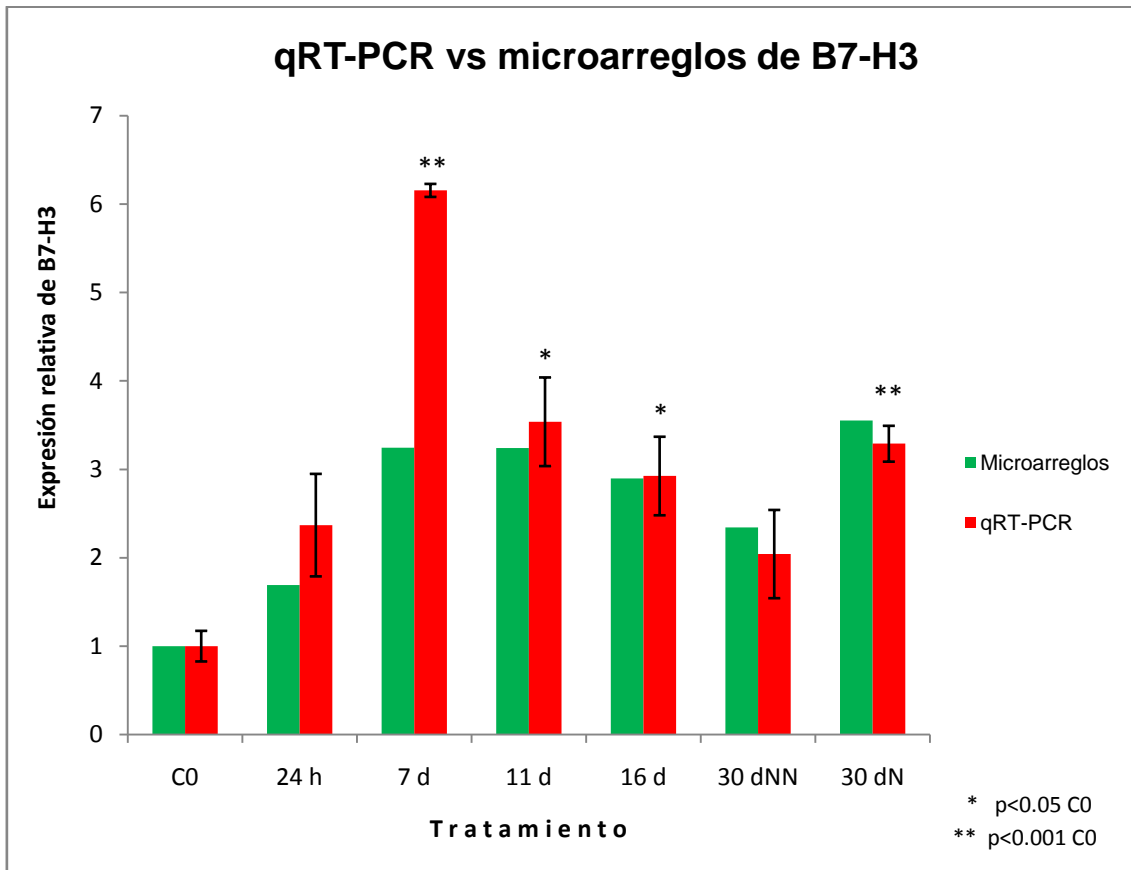


Figura 7. Comparación de Microarreglos vs qRT-PCR. Se observa la comparación de la expresión relativa de B7-H3 mediante la técnica de qRT-PCR y los resultados obtenidos por microarreglos (O. Beltrán-Ramírez, resultados no publicados). Los resultados de qRT-PCR indican que el comportamiento del mensajero de B7-H3 es parecido al de los resultados obtenidos de microarreglos.

6.4 Detección de lesiones pre-neoplásicas en hígado pr GGT.

Las lesiones pre-neoplásicas en hígados de ratas sometidas al modelo de hepatocarcinogénesis, pueden ser detectadas a través de los marcadores tumorales GGT y Glutación sulfhidrilo tranferasa (GST-p). La GGT presenta una expresión tejido-específica que se modifica bajo varias condiciones fisiológicas y patológicas, tales como el desarrollo y la carcinogénesis. En un hígado normal la GGT se encuentra expresada en las células que conforman los canalículos biliares [44], solo es positiva alrededor de los canalículos biliares. Los hepatocitos sin tratamiento son negativos a la tinción. En el grupo de ratas a los 30 días sometidos al tratamiento completo del MMHR se determinó la actividad de GGT para delimitar las zonas nodulares de las No nodulares y poder obtener tejido para la extracción de proteínas. En este grupo se encontró variación en número y tamaño de nódulos (figura 8).

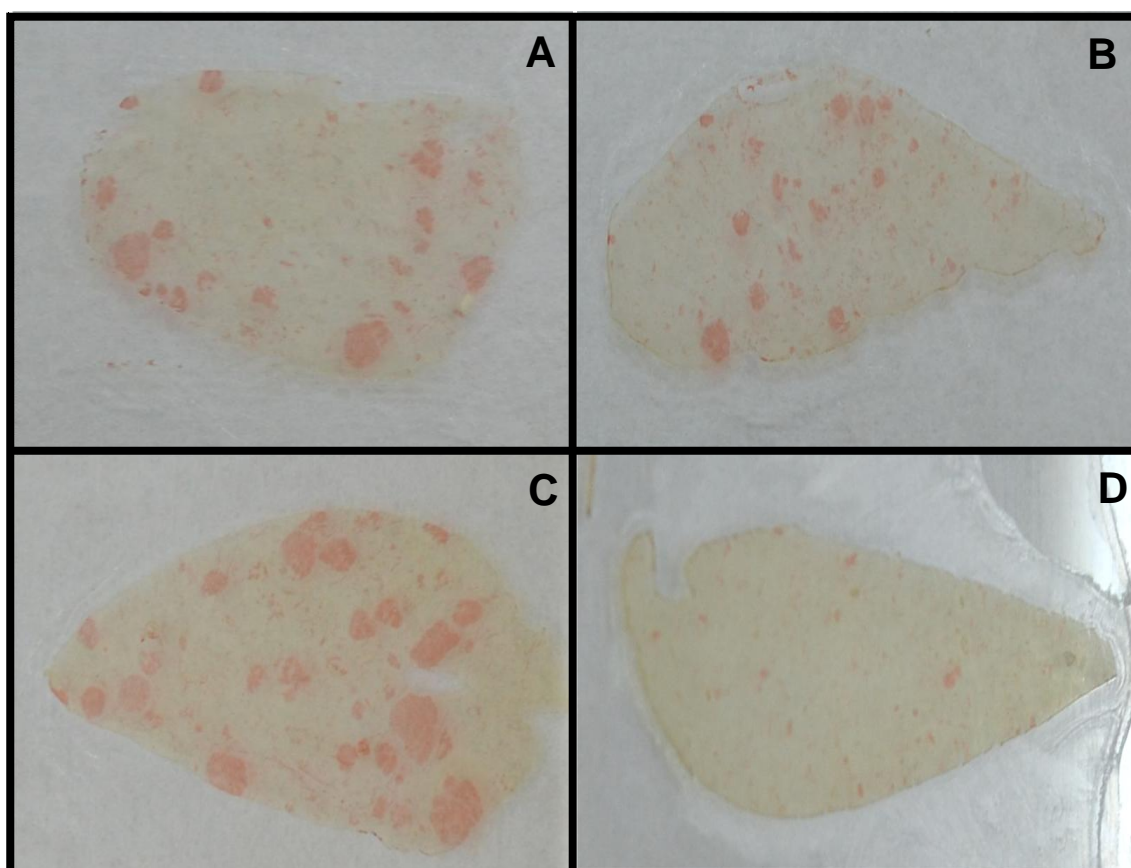


Fig. 8. Detección de lesiones pre-neoplásicas en hígado por GGT. Se puede observar el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas en hígados de 30 días mediante el marcador tumoral GGT que se aprecia con una coloración roja, A. Rata 27; B. Rata 28; C. Rata 29; D. Rata 30

6.5 Expresión de B7-H3 a nivel de proteína.

Para evaluar la expresión de B7-H3 a nivel proteico se realizó un WB. La integridad de las proteínas se evaluó mediante geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie donde se aprecia correctamente las proteínas separadas por tamaño a lo largo del gel, no hay evidencia de desnaturalización o alteraciones (fig. 9).

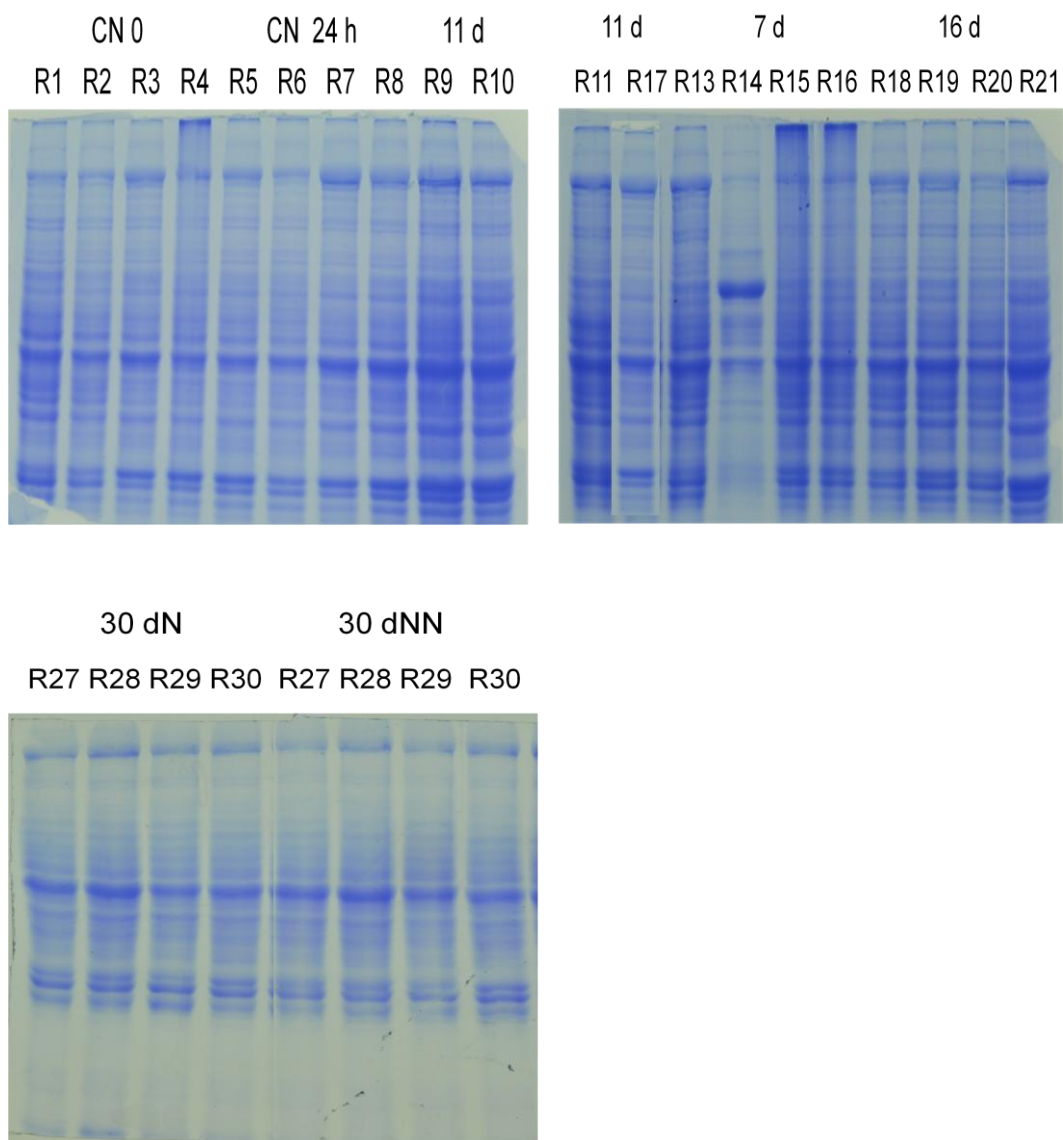


Figura 9. Evaluación de integridad de proteínas. Las proteínas extraídas del tejido hepático de las ratas a diferentes tiempos muestran un patrón de corrimiento electroforético adecuado al ser teñidas con azul de Coomassie.

Después de checar la integridad de las proteínas de cada muestra, se llevó a cabo el WB para evaluar la expresión de B7-H3. Como control positivo se utilizó extracto proteico de próstata de rata, el patrón electroforético mostró una proteína de 34 kDa. Todos los grupos mostraron expresión de la proteína, siendo ésta más marcada a los 7, 16 y 30 días y observando los niveles más bajos a las 24 horas. Los controles que no recibieron tratamiento con algún carcinógeno mostraron expresión basal de la proteína (Figura 10). Posteriormente se realizó una densitometría para determinar la expresión relativa (fig. 11).

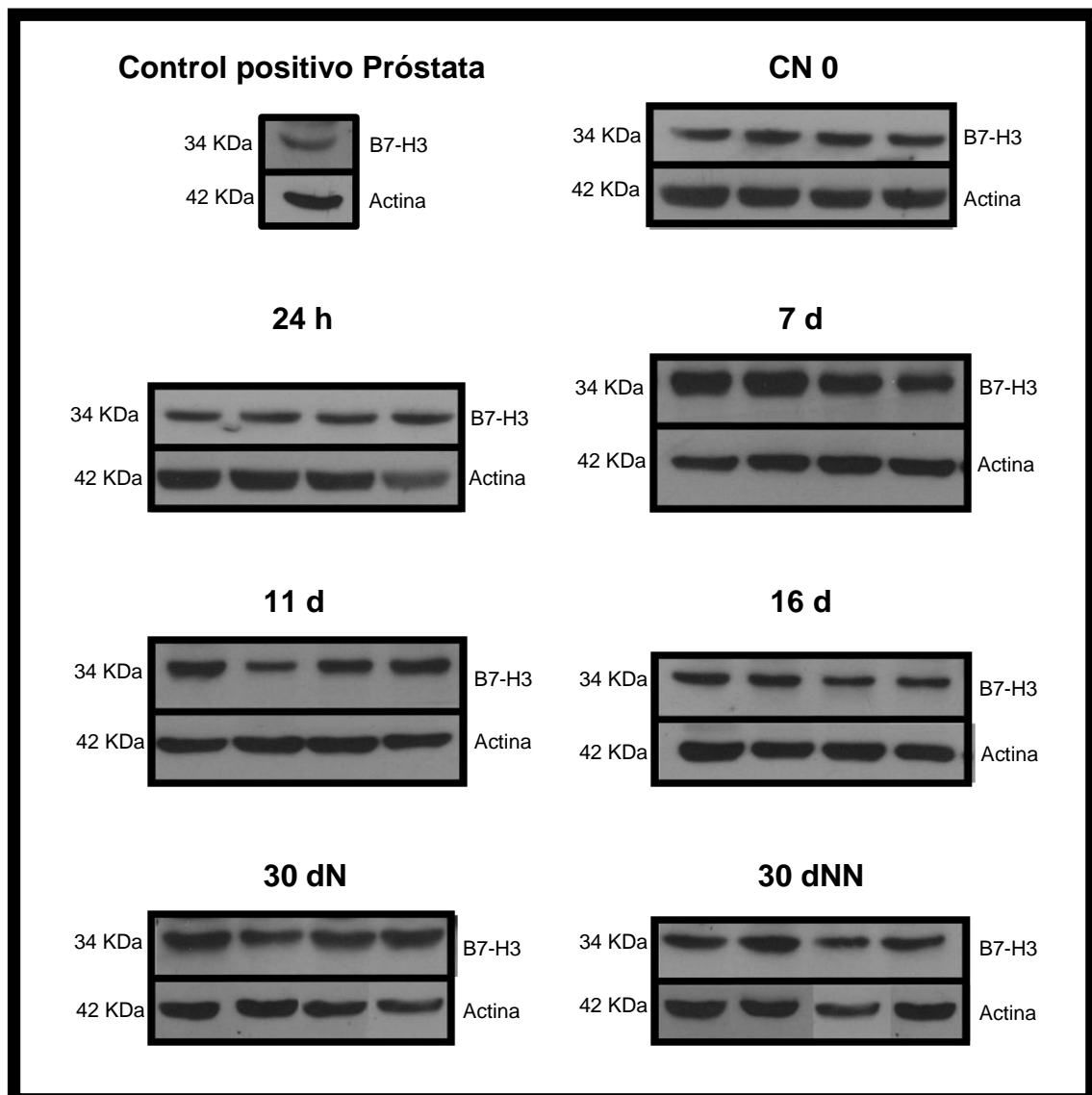


Figura 10. Western Blot de B7-H3. Grupos de los primero tiempos del MMHR. Por cada tiempo incluido en el modelo se realizó la determinación por cuadruplicado, de los cuales se eligieron 3 para realizar el análisis densitométrico.

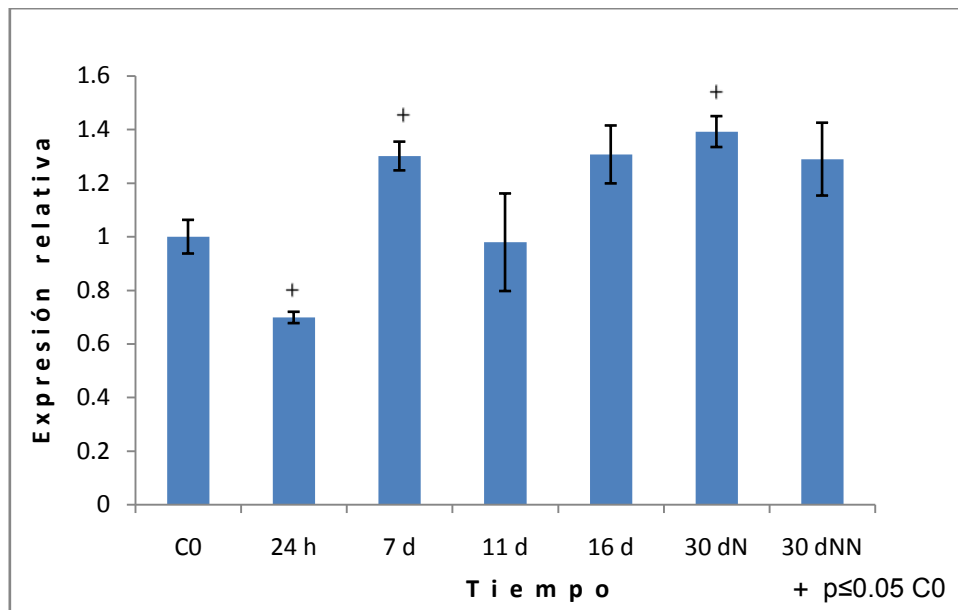


Figura 11. Análisis densitométrico de las bandas de B7-H3 detectadas por Western Blot. Las bandas detectadas por WB correspondientes a B7-H3 fueron analizadas con Image J, para determinar la expresión relativa de la proteína en relación al control interno, actina.

6.6 Expresión y localización de B7-H3 con células del sistema inmune en lesiones pre-neoplásicas.

Se evaluó la presencia GSTp que es una enzima considerada como uno de los mejores marcadores para el monitoreo de las lesiones producidas durante la hepatocarcinogénesis química en ratas, así como la expresión y localización de B7-H3, una proteína transmembranal, en células hepáticas tratadas con el carcinógeno iniciador así como en células tratadas con el MMHR completo; de igual manera se evaluó la presencia de células inmunológicas, CD4 y CD8A, en las regiones nodulares.

Para corroborar la funcionalidad de los anticuerpos utilizados, se realizaron pruebas en tejidos donde se ha reportado que las proteínas de interés se expresan, para el caso de GSTp se utilizó tejido hepático de 18 meses; B7-H3 se detectó en células prostáticas y pancreáticas tanto a nivel membranal como citoplasmático; CD4 y CD8 se evidenció su presencia en timo y bazo de rata (figura 13).

Los tejidos de hígado de ratas sin tratamiento muestran presencia nula de GSTp, pocos hepatocitos con presencia de B7-H3 en membrana y citoplasma así como pocas células CD8, no se observa la presencia de células CD4.

Los tejidos de hígados de ratas tratadas con el carcinógeno iniciador 24 h, muestra pocos hepatocitos positivos para GSTp y B7-H3 en las mismas células de cortes seriados, también se observan pocas células CD8 en la misma zona y no se observan células CD4.

En los tejidos de 7 días pos-tratamiento con DEN, se observan moderados hepatocitos positivos para GSTp y B7-H3, de las cuales, varias células coinciden en localización similar en cortes seriados, así como moderadas células CD8 en la misma zona, no hay presencia de células CD4.

En los tejidos de 11 días pos-tratamiento completo, se aprecian moderadas células positivas para GSTp y B7-H3, de las cuales, varias coinciden en localización similar en cortes seriados, así como moderadas células CD8 en la misma zona, no se aprecia la presencia de células CD4.

En los tejidos de 16 días pos-tratamiento completo, se aprecian diferentes nódulos positivos para GSTp y moderados hepatocitos con B7-H3 que coinciden en localización dentro de la región nodular; también se aprecian moderadas células CD8 en la zona nodular, no hay presencia de células CD4.

En los tejidos de 30d sin tratamiento, se observa un comportamiento similar al descrito para el control sin tratamiento a tiempo cero, presencia nula de GSTp, pocos hepatocitos con presencia de B7-H3 en membrana y citoplasma así como pocas células CD8, no se observa la presencia de células CD4.

Para el caso de los tejidos de 30 días pos-tratamiento completo, se aprecian abundantes nódulos positivos para GSTp, y moderados hepatocitos que expresan B7-H3 dentro de la región delimitada por el nódulo; también se aprecian pocas células CD8, no se observa la presencia de células CD4.

En todos los tejidos de los tiempos manejados en este trabajo se observa expresión de B7-H3 en diferentes niveles, tanto en membrana como en región citoplasmática a pesar ser una proteína transmembranal. Otra característica interesante que se aprecia, es que en la mayoría de los tiempos donde hay hepatocitos con el marcador GSTp, hay presencia de la proteína B7-H3, y esto es más notable en los tejidos donde se aprecian claramente los nódulos.

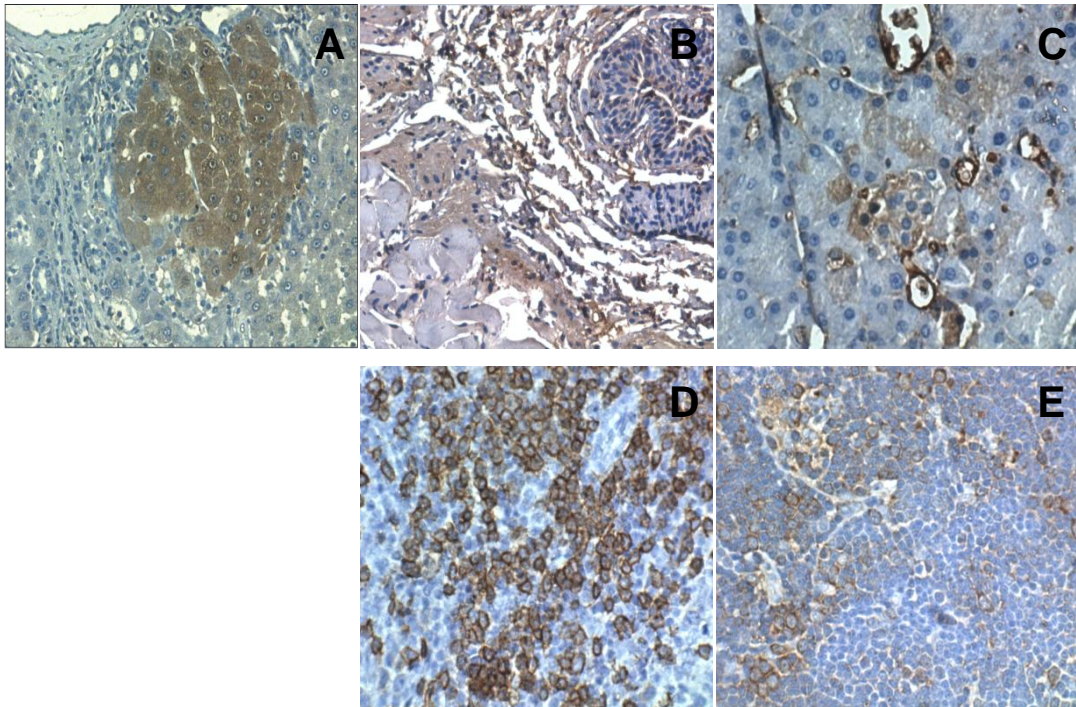


Figura 12. Controles positivos para detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4. Inmunohistoquímicas en cortes de 3 μm de espesor. A. GSTp en tejido de hígado de 18 meses. B y C. B7-H3 en tejido de próstata y páncreas de rata. D. CD8 en tejido de bazo de rata, 40x. E. CD4 en tejido de timo de rata. 20 y 40x.

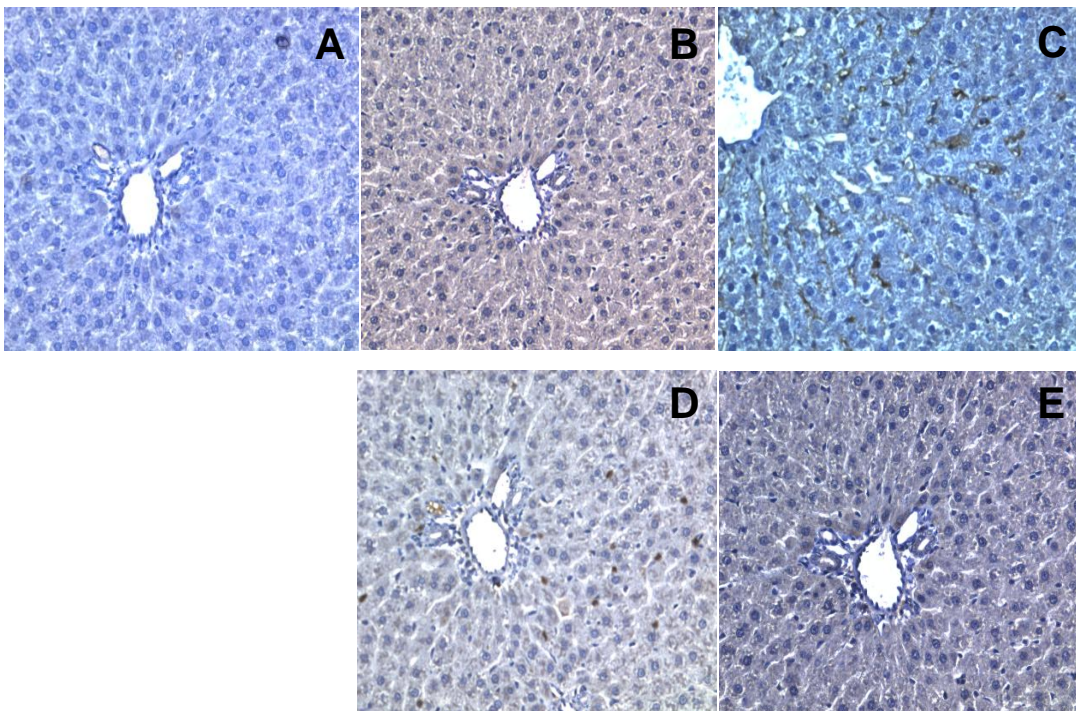


Figura 13. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados sin tratamiento. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 20x.

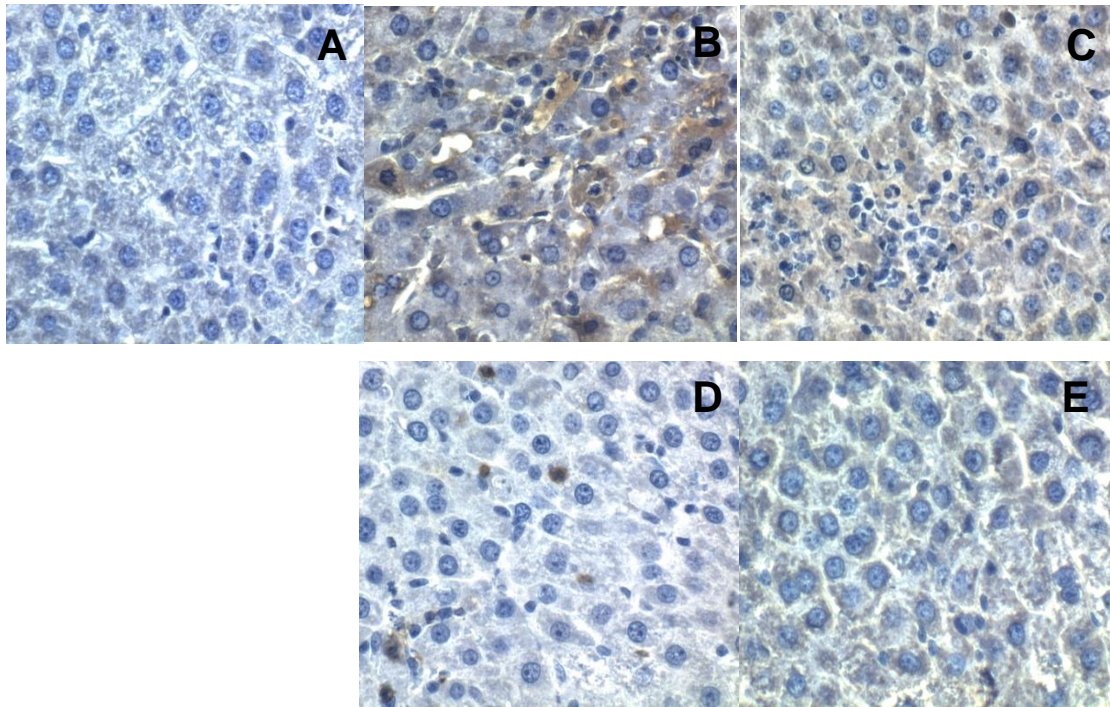


Figura 14. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 24 horas pos-tratamiento con DEN. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 40x.

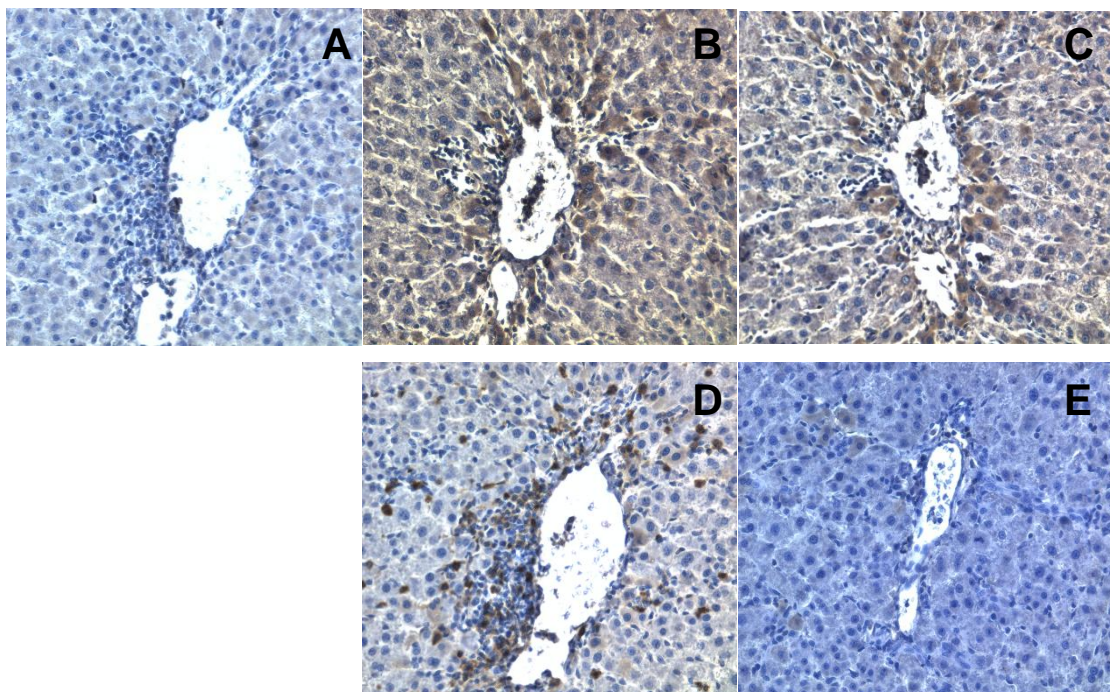


Figura 15. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 7 días pos-tratamiento con DEN. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 20x.

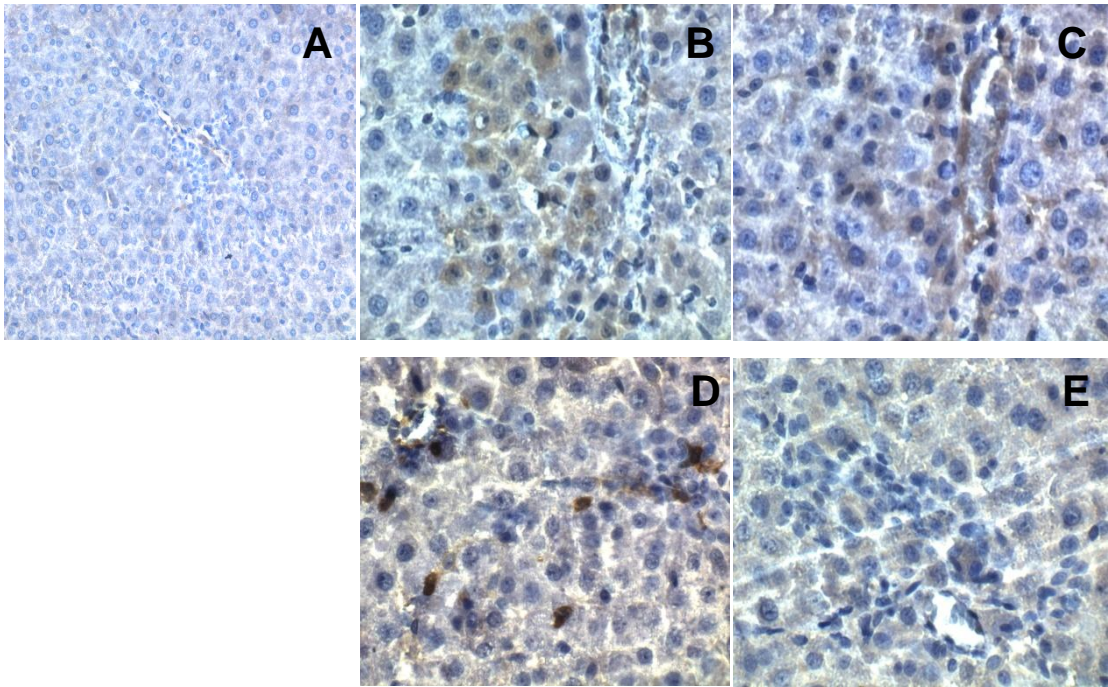


Figura 16. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 11 días pos-tratamiento completo. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 40x.

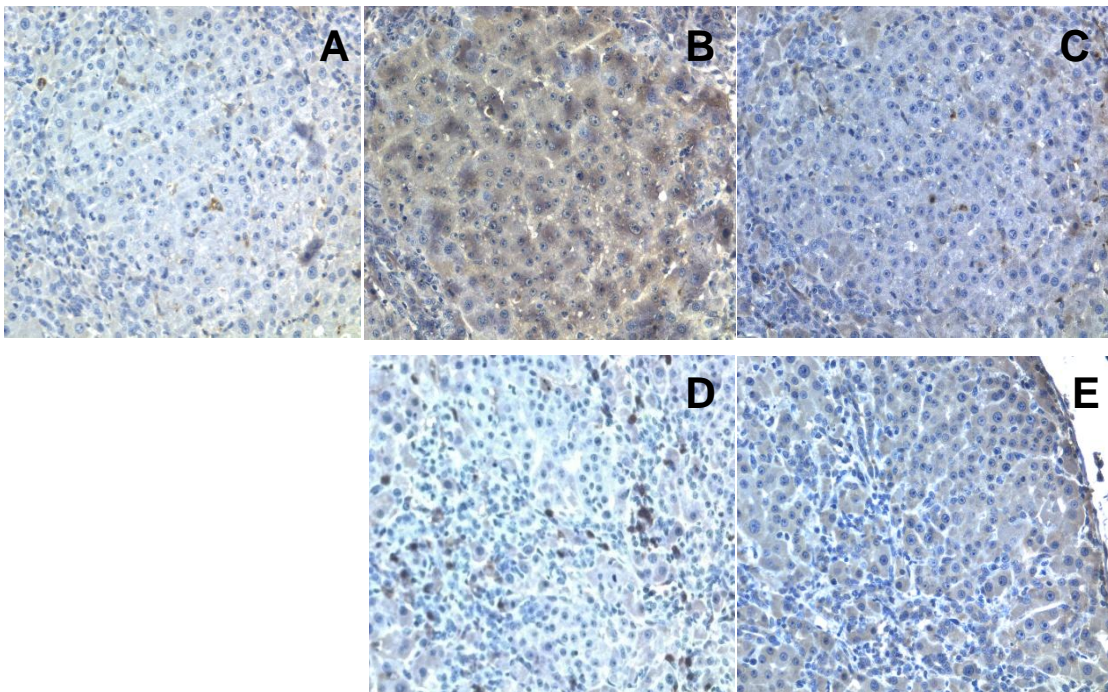


Figura 17. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 16 días pos-tratamiento completo. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 20x.

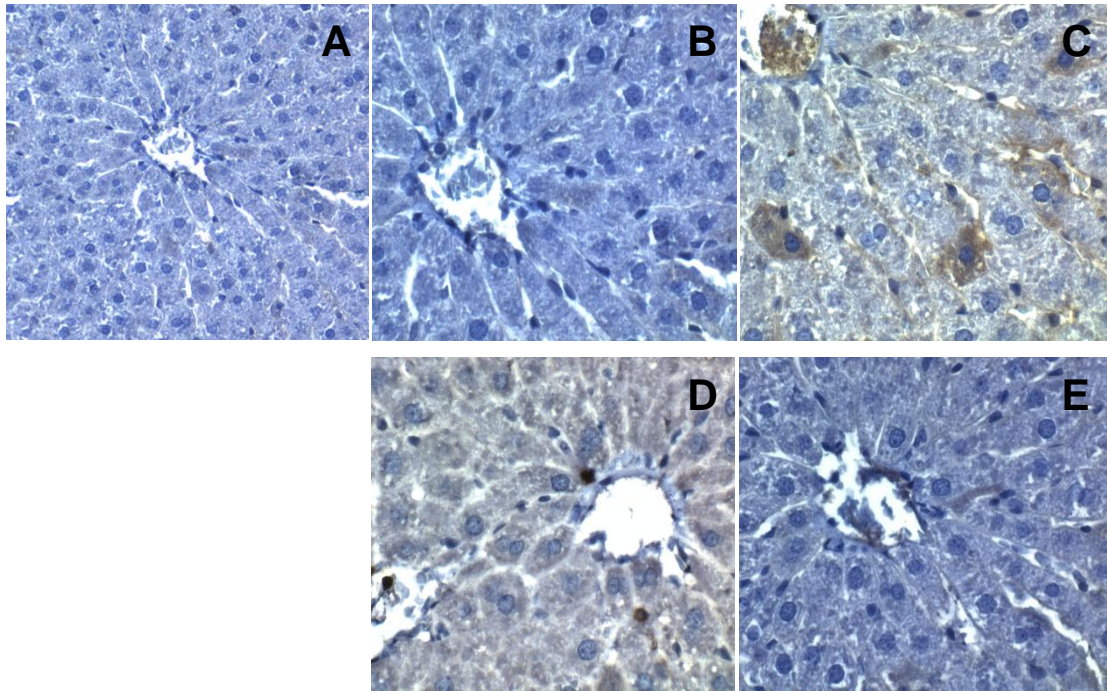


Figura 18. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 30 días sin tratamiento. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 40x.

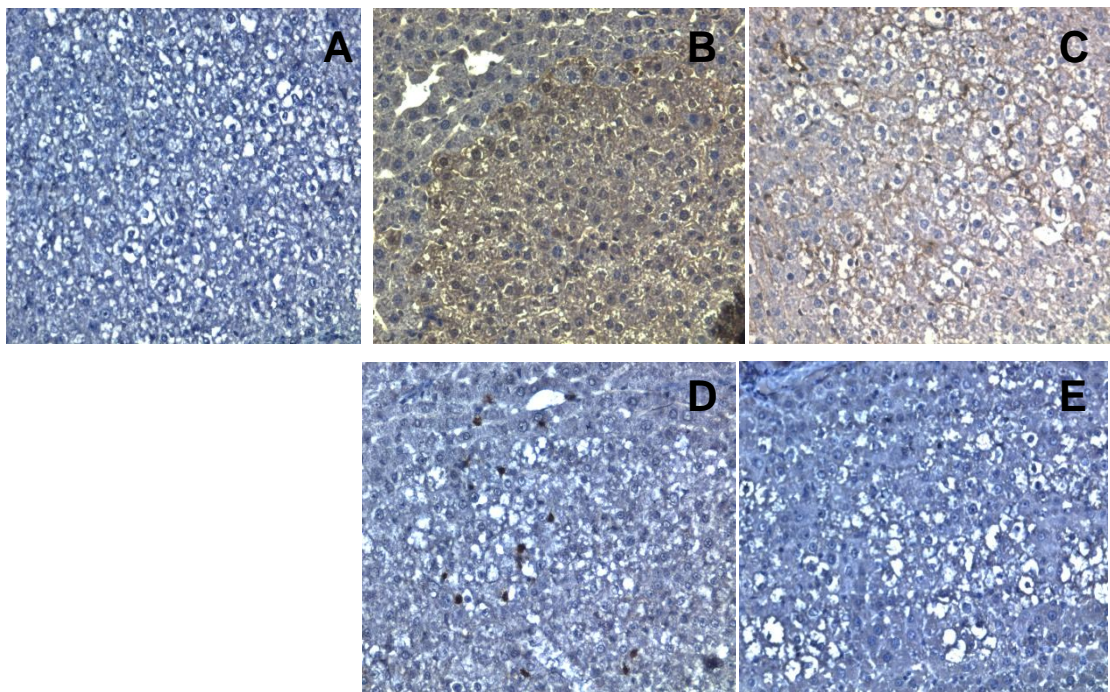


Figura 19. Detección de GSTp, B7-H3, CD8 y CD4 en cortes histológicos de hígados 30 días pos-tratamiento completo. A. control de isotipo. B. GSTp. C. B7-H3. D. CD8. E. CD4. 20x.

7.0 DISCUSIÓN

El cáncer es considerado un proceso complejo y multifacético. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares específicos y la secuencia de los mismos.

Los modelos de inducción de cáncer han sido muy exitosos en la caracterización de las diferentes etapas de la carcinogénesis, tal es el caso del modelo de hepatocarcinogénesis (MMHR) donde se pueden evaluar los focos de hepatocitos alterados para el seguimiento de los efectos producidos por diversos carcinógenos iniciadores o promotores. Los focos de hepatocitos alterados son identificados por la expresión de enzimas que habitualmente no se encuentran en los hepatocitos maduros de la rata, como la Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) o la glutatión sulfhidrilo transferasa (GSTp). La utilización de éstos marcadores ha permitido definir las tres etapas conceptuales conocidas en el proceso carcinogénico: iniciación, promoción y progresión [45]. Se ha demostrado que existe una correlación directa entre la expresión de GGT y GST-p en las células iniciadas que son promovidas a la formación de tumores [45], por lo que probablemente los mecanismos que llevan a la expresión de estos marcadores también estén correlacionados.

Los cambios celulares que suceden en nuestro modelo de hepatocarcinogénesis durante los primeros días son muy drásticos e implican muerte masiva de los hepatocitos, regeneración hepática y aumento en el infiltrado inflamatorio, como se observa en las tinciones realizadas con hematoxilina-eosina (fig. 5), al igual que el estrés oxidativo que produce el DEN

administrado [46]. Un hecho contundente de los cambios drásticos que ocurren es la disminución en el peso de la rata como se observa en la fig. 4, donde las ratas tratadas con los carcinógenos iniciador y promotor muestran una disminución de peso posterior a su administración en comparación con las ratas no tratadas.

Basándonos en estudios previos donde se ha demostrado que el RNAm y proteína de B7-H3 se sobre-expresan en diversos tipos de cáncer de seres humanos y los resultados de ensayos con microarreglos realizados en nuestro laboratorio donde los niveles de RNAm se encuentran sobre-expresados en el MMHR decidimos analizar la proteína para determinar si se encuentra sobre-expresada en la etapa de formación de lesiones pre-neoplásicas para entender mejor su participación en el desarrollo del cáncer. El primer paso fue determinar los niveles del RNAm de la proteína (fig. 6) y posteriormente compararlos con los resultados de microarreglos (fig.7). Los resultados obtenidos muestran un comportamiento similar en los niveles de expresión relativa con ambos métodos siendo los de mayor expresión los tiempos post-tratamiento, 7, 11, 16 y 30 d, que de cierta manera correlaciona con los reportes donde se manejan mayor expresión del RNAm de la proteína en el cáncer ya establecido. Obtuvimos los mismos resultados para el caso de la expresión a nivel de proteína determinado por western blot, que en las etapas de célula iniciada existe una mayor expresión de la proteína, que correlaciona con los trabajos reportados donde se observa una sobre expresión de la proteína en diferentes tipos de cáncer [22-29], sobre todo en un trabajo reportado en tejido de carcinoma hepatocelular (HCC) humano, donde la proteína se sobre expresa en la mayoría de los tejidos con HCC y en varias

líneas celulares, sobre todo en las que son más agresivas [47]. El único tiempo que llama la atención debido a que la expresión de la proteína B7-H3 es menor que el control sin tratamiento, es el tiempo de 24 h, pero al respecto se puede considerar que es poco el tiempo de contacto con el carcinógeno o que la necrosis que se observa a este tiempo afecte el nivel de expresión de la proteína.

B7-H3 es una proteína transmembranal y nos dimos a la tarea de corroborar su localización celular y su expresión, como ha sido reportada su sobreexpresión en diferentes tipos de cáncer, utilizamos el marcador GSTp para evidenciar las células iniciadas o la formación de nódulos pre-neoplásicos. Observamos la expresión de B7-H3 en todos los tiempos evaluados del modelo, como lo propusimos en un principio, la expresión de la proteína se ve aumentada conforme hay mayor número de células iniciadas o nódulos pre-neoplásicos, esto correlaciona con lo ya reportado en el HCC de seres humanos [47]. Otra característica importante fue la localización celular de la proteína, que la observamos en membrana así como también en citoplasma, a pesar de ser una proteína transmembrana tipo I, esto coincide con reportes donde la proteína es encontrada en citoplasma de células tumorales así como en la membrana [25-27, 29, 47-50].

El resultado del análisis de la presencia de células inmunológicas T CD4⁺ y CD8 fue congruente con lo planteado en nuestra hipótesis, encontramos que la presencia de células T citotóxicas CD8⁺ se observa en mayor proporción en los tiempos donde hay mayor expresión de la proteína B7-H3, esto correlaciona con lo ya establecido en reportes donde se menciona que las principales células que actúan en contra de las células iniciadas o tumorales

son las células T citotóxicas CD8⁺ [12]; por el contrario, no se detectaron células T cooperadoras CD4⁺ en ningún tiempo del modelo.

La infiltración de células T en el microambiente tumoral es un importante regulador de la progresión del cáncer. Como se mencionó anteriormente B7-H3 se le ha asociado con un papel contrastante en la activación o evasión inmune, aunque es necesario realizar más trabajos para poder aclarar el papel que B7-H3 puede jugar en el desarrollo de tumores en hepatocarcinogénesis de rata.

8.0 CONCLUSIONES

- ✓ Existe una similitud a nivel transcripcional del RNAm en ambos métodos, microarreglos y qRT-PCR, en los niveles de expresión de RNAm donde se aprecia una sobre-expresión durante la formación de lesiones pre-neoplásicas.

- ✓ Se observa una correlación a nivel transcripcional y traduccional en los niveles de expresión de RNAm y proteína durante la etapa de formación de lesiones pre-neoplásicas del MMHR.

- ✓ Existe una mayor expresión de B7-H3 en regiones nodulares (GSTp⁺) que en hepatocitos del tejido que la rodea; la localización de B7-H3 es en membrana así como en citoplasma y existe moderada presencia de células T citotóxicas CD8⁺.

9.0 PERSPECTIVAS

- Analizar la expresión de B7-H3 en los tiempos restantes del MMHR, 5 m, 9 m, 12 m, 18 m.
- Determinar la relación de B7-H3 con células T citotóxicas CD8⁺.
- Determinar la presencia y cantidad de B7-H3 soluble en plasma de ratas tratadas con el MMHR.
- Identificar el receptor con que interactúa B7-H3.

10. REFERENCIAS

1. Kemmer, N. and G.W. Neff, *Liver transplantation in the ethnic minority population: challenges and prospects*. Dig Dis Sci, 2010. **55**(4): p. 883-9.
2. Hsu, C., et al., *Geographic difference in survival outcome for advanced hepatocellular carcinoma: implications on future clinical trial design*. Contemp Clin Trials, 2010. **31**(1): p. 55-61.
3. Scatton, O., G. Liddo, and J. Belghiti, *Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: current topics in France*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2010. **17**(5): p. 567-73.
4. Theise, N.D., Y.N. Park, and M. Kojiro, *Dysplastic nodules and hepatocarcinogenesis*. Clin Liver Dis, 2002. **6**(2): p. 497-512.
5. Motola-Kuba, D., et al., *Hepatocellular carcinoma. An overview*. Ann Hepatol, 2006. **5**(1): p. 16-24.
6. Jaramillo, R., *Managing oncology agents: an HMO's perspective*. Manag Care, 2007. **16**(3 Suppl 4): p. 16-8; discussion 18-9.
7. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
8. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
9. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
10. Rietz, C. and L. Chen, *New B7 family members with positive and negative costimulatory function*. Am J Transplant, 2004. **4**(1): p. 8-14.
11. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
12. Seliger, B., et al., *The complex role of B7 molecules in tumor immunology*. Trends Mol Med, 2008. **14**(12): p. 550-9.
13. Liu, Y., et al., *B7-H1 on myeloid-derived suppressor cells in immune suppression by a mouse model of ovarian cancer*. Clin Immunol, 2008. **129**(3): p. 471-81.
14. Thompson, R.H., et al., *Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma*. Cancer, 2005. **104**(10): p. 2084-91.
15. Chen, J., et al., *Upregulation of B7-H1 expression is associated with macrophage infiltration in hepatocellular carcinomas*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(1): p. 101-8.
16. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
17. Chapoval, A.I., et al., *B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 269-74.
18. Sun, M., et al., *Characterization of mouse and human B7-H3 genes*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6294-7.
19. Ling, V., et al., *Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss*. Genomics, 2003. **82**(3): p. 365-77.

20. Steinberger, P., et al., *Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2352-9.
21. Loos, M., et al., *B7-h3 and its role in antitumor immunity*. Clin Dev Immunol, 2010. **2010**: p. 683875.
22. Boorjian, S.A., et al., *T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(15): p. 4800-8.
23. Sun, Y., et al., *B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 2006. **53**(2): p. 143-51.
24. Loos, M., et al., *Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 463.
25. Zang, X., et al., *Tumor associated endothelial expression of B7-H3 predicts survival in ovarian carcinomas*. Mod Pathol, 2010. **23**(8): p. 1104-12.
26. Sun, J., et al., *Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H3 in human colorectal carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(8): p. 1163-71.
27. Wu, C.P., et al., *Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 457-9.
28. Crispen, P.L., et al., *Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5150-7.
29. Roth, T.J., et al., *B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy*. Cancer Res, 2007. **67**(16): p. 7893-900.
30. Hashiguchi, M., et al., *Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10495-500.
31. Leitner, J., et al., *B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction*. Eur J Immunol, 2009. **39**(7): p. 1754-64.
32. Tirapu, I., et al., *Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma*. Cancer Res, 2006. **66**(4): p. 2442-50.
33. Hofmeyer, K.A., A. Ray, and X. Zang, *The contrasting role of B7-H3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10277-8.
34. Suh, W.K., et al., *The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses*. Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 899-906.
35. Zhang, G., et al., *Diagnosis value of serum B7-H3 expression in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2009. **66**(2): p. 245-9.
36. Klaunig, J.E. and L.M. Kamendulis, *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 239-67.
37. Surh, Y.J., et al., *Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals*. J Nutr, 2005. **135**(12 Suppl): p. 2993S-3001S.

38. Beltran-Ramirez, O., et al., *Evidence that the anticarcinogenic effect of caffeic acid phenethyl ester in the resistant hepatocyte model involves modifications of cytochrome P450*. Toxicol Sci, 2008. **104**(1): p. 100-6.
39. Arellanes-Robledo, J., et al., *Celecoxib activates Stat5 and restores or increases the expression of growth hormone-regulated genes in hepatocarcinogenesis*. Anticancer Drugs, 2010. **21**(4): p. 411-22.
40. Perez-Carreón, J.I., et al., *Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats*. Neoplasia, 2006. **8**(5): p. 373-83.
41. Semple-Roberts, E., et al., *Alternative methods of selecting rat hepatocellular nodules resistant to 2-acetylaminofluorene*. Int J Cancer, 1987. **40**(5): p. 643-5.
42. Marche-Cova, A., et al., *Follow-up of GST-P during hepatocarcinogenesis with DEN-2AAF in F344 rats*. Arch Med Res, 1995. **26 Spec No**: p. S169-73.
43. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
44. Hanigan, M.H., *Expression of gamma-glutamyl transpeptidase provides tumor cells with a selective growth advantage at physiologic concentrations of cyst(e)ine*. Carcinogenesis, 1995. **16**(2): p. 181-5.
45. Hendrich, S., H.A. Campbell, and H.C. Pitot, *Quantitative stereological evaluation of four histochemical markers of altered foci in multistage hepatocarcinogenesis in the rat*. Carcinogenesis, 1987. **8**(9): p. 1245-50.
46. Sanchez-Perez, Y., et al., *Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis*. Cancer Lett, 2005. **217**(1): p. 25-32.
47. Sun, T.W., et al., *B7-H3 is expressed in human hepatocellular carcinoma and is associated with tumor aggressiveness and postoperative recurrence*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(11): p. 2171-82.
48. Yamato, I., et al., *Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2009. **101**(10): p. 1709-16.
49. Arigami, T., et al., *B7-h3 ligand expression by primary breast cancer and associated with regional nodal metastasis*. Ann Surg, 2010. **252**(6): p. 1044-51.
50. Boorjian, S.A., et al., *T-cell co-regulatory molecule expression in renal angiomyolipoma and pulmonary lymphangiomyomatosis*. Urology, 2009. **74**(6): p. 1359-64.