

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Título:

“Papel del gen *PLAGL1* en carcinoma hepatocelular”

por

Lic. Ana Florencia Vega Benedetti

Director: Dr. Luis Antonio Parada

Lugar de trabajo: Instituto de Patología Experimental,  
CONICET - Universidad Nacional de Salta



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2017

## Comisión Asesora

Dra. Graciela Panzetta-Dutari; CIBICI-CONICET, Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Guillermo Mazzolini Rizzo; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral.

Dr. Luis Antonio Parada; Instituto de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, CONICET-Universidad Nacional de Salta.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

### TRIBUNAL

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

*“...cuando ante ti se abran muchos caminos y no sepas cuál recorrer, no elijas uno al azar: siéntate y espera. Respira con la serena profundidad que respiraste el día que viniste al mundo, sin permitir que nada te distraiga: espera y espera aún. Quédate en silencio, y escucha a tu corazón. Luego, cuando te hable, levántate y ve donde él te lleve. ”*

*Susanna Tamaro*

## **Agradecimientos**

Al Dr. Luis A. Parada, por haberme permitido realizar mi tesis doctoral, por su dirección y por su contribución profesional en mis estudios.

Al Instituto de Patología Experimental por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos del IPE por acompañarme y ayudarme en esta etapa de formación.

A la Dra. Roberta Vanni por haberme aceptado en su laboratorio y contribuir a mi formación profesional. A mis compañeras del laboratorio de la Universidad de Cagliari por su calidez.

A la Dra. Patrizia Zavattari por confiar en mí y trasmitirme sus conocimientos y la pasión por la investigación científica.

A la Dra. Laura Vargas Roig por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio en el IMBECU-Mendoza. Muchas gracias a la Dra. Laura González por enseñarme nuevas técnicas de laboratorio, por su paciencia y cariño.

Al Dr. Félix M. Royo de CIC bioGUNE, por su asistencia en el análisis genómico de los tumores y líneas celulares.

A mis padres, Ana María y Osvaldo Jesús, por darme los valores y las herramientas para progresar y seguir adelante con esfuerzo y trabajo. A mi hermano Fernando Jesús, por su apoyo en todo momento. Gracias por estar siempre.

*Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión de una beca doctoral de CONICET y un subsidio para proyectos de investigación otorgado por el MinCyT (PICT 2011-1897).*

### **Publicación derivada de la tesis:**

- PLAGL1: an important player in diverse pathological processes. Vega Benedetti, AF; Saucedo, C; Zavattari, P; Vanni, R; Zugaza, JL; Parada, LA. J Appl Genet. 2017 Feb; 58(1):71-78. doi: 10.1007/s13353-016-0355-4. Epub 2016 Jun 16.

### **Presentaciones a Congreso:**

- PLAGL1 gene function during hepatoma cell proliferation. Vega Benedetti, AF; Saucedo, CN; Zavattari, P; Vanni, R; Parada, LA. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina. Desde 16 hasta 19 Noviembre 2016.
- PLAGL1 gene transcription during hepatocellular carcinoma cell proliferation. Vega Benedetti, AF; Vanni, R; Caria, P; Zavattari, LA; Parada, LA. 56th Reunión Anual de la Sociedad Italiana de Cáncer. Dangerous Liaisons. Ferrara, Italia. Desde 11 hasta 13 Setiembre 2014.

# Índice

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1.1 EL HÍGADO .....	7
1.1.1 <i>Anatomía</i> .....	7
1.1.2 <i>Fisiología hepática</i> .....	9
1.2 TUMORIGÉNESIS .....	10
1.2.1 <i>Genes asociados a neoplasias</i> .....	11
1.2.1.1 Oncogenes .....	11
1.2.1.1.1 Gen del receptor tirosina quinasa <i>MET</i> .....	11
1.2.1.1.2 Oncogén homólogo al virus de la mielocitomatosis aviar ( <i>MYC</i> ) .....	12
1.2.1.1.3 Oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata ( <i>RAS</i> ).....	13
1.2.1.2 Genes supresores de tumor .....	14
1.2.1.2.1 Gen supresor de tumor <i>p53</i> .....	14
1.2.1.2.2 Gen Inhibidor 1A de Quinasa Dependiente de Ciclinas ( <i>CDKN1A</i> ) .....	16
1.2.1.2.3 Receptor de peroxisoma-proliferador- activado gamma ( <i>PPAR<math>\gamma</math></i> ).....	18
1.2.1.2.4 Gen de adenoma pleomórfico tipo 1 ( <i>PLAGL1</i> ) .....	19
1.3 CÁNCER DE HÍGADO .....	20
1.3.1 <i>Hemangiosarcoma</i> .....	20
1.3.2 <i>Hepatoblastoma</i> .....	20
1.3.3 <i>Carcinoma colangiocelular</i> .....	21
1.3.4 <i>Carcinoma Hepatocelular</i> .....	21
1.4 GEN DE ADENOMA PLEOMÓRFICO TIPO 1 ( <i>PLAGL1</i> ) .....	28
<b>2 HIPÓTESIS</b> .....	<b>37</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR.....	40
4.1.1 <i>Línea celular PLC/PRF/5</i> .....	40
4.1.2 <i>Línea celular HepG2</i> .....	40
4.1.3 <i>Línea celular Huh7</i> .....	41
4.1.4 <i>Línea celular SkHep1</i> .....	41
4.2 HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA MEDIANTE MATRICES .....	41
4.3 PCR METIL ESPECÍFICA.....	43
4.4 PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE RECUENTO CELULAR .....	44
4.5 PROLIFERACIÓN Y CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	45
4.6 NIVEL DE MARN .....	46
4.6.1 <i>Extracción de ARN</i> .....	46

4.6.2	<i>Retrotranscripción</i> .....	47
4.6.3	<i>PCR cuantitativa</i> .....	47
4.6.4	<i>Análisis de los datos</i> .....	48
4.7	NIVEL DE EXPRESIÓN .....	50
4.7.1	<i>Extracción de proteínas</i> .....	50
4.7.2	<i>Concentración de proteínas</i> .....	50
4.7.3	<i>Electroforesis en gel</i> .....	51
4.7.4	<i>Transferencia e inmunodetección de proteínas</i> .....	52
4.8	MIGRACIÓN CELULAR .....	53
4.9	SOBREPRESIÓN DEL GEN <i>PLAGL1</i> .....	53
4.9.1	<i>Crecimiento y purificación del plásmido</i> .....	53
4.9.2	<i>Transfección</i> .....	54
4.10	INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.....	56
4.11	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	57
4.12	ANÁLISIS DE DATOS.....	58
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
5.1	DESBALANCES GENÓMICOS EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE HCC .....	61
5.2	ESTADO DE METILACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>PLAGL1</i> .....	64
5.3	PROLIFERACIÓN, NIVEL DE TRANSCRIPTO Y DE EXPRESIÓN PROTEICA .....	65
5.3.1	<i>Fibroblastos</i> .....	65
5.3.2	<i>Línea celular PLC/PRF/5</i> .....	72
5.3.3	<i>Línea celular HepG2</i> .....	78
5.3.4	<i>Línea celular Huh7</i> .....	84
5.3.5	<i>Línea celular SkHep1</i> .....	90
5.4	NIVEL DE TRANSCRIPTOS ( <i>PLAGL1</i> , <i>P53</i> Y <i>PPARY</i> ) Y NIVEL DE EXPRESIÓN ( <i>PLAGL1</i> , <i>P53</i> Y <i>P21</i> ) ENTRE LAS LÍNEAS CELULARES .....	96
5.5	SOBREPRESIÓN DEL GEN <i>PLAGL1</i> .....	102
5.5.1	<i>Sobrexpresión del gen PLAGL1 en células PLC/PRF/5</i> .....	103
5.5.2	<i>Sobrexpresión del gen PLAGL1 en células HepG2</i> .....	106
5.6	PAPEL DEL GEN <i>PLAGL1</i> EN HCC DE PACIENTES .....	109
5.6.1	<i>Desbalances genómicos en muestras de tumor hepático</i> .....	111
5.6.2	<i>Estado de metilación del promotor de PLAGL1</i> .....	112
5.6.3	<i>Nivel de expresión de PLAGL1 y p21 in situ</i> .....	112
<b>6</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>123</b>
6.1	ABERRACIONES GENÉTICAS Y EPIGENÉTICAS EN HCC .....	123
6.2	NIVEL DE TRANSCRIPTO Y EXPRESIÓN PROTEICA DEL GEN <i>PLAGL1</i> .....	126
6.3	NIVEL DE TRANSCRIPTO Y EXPRESIÓN PROTEICA DE <i>P53</i> Y <i>P21</i> .....	129
6.4	NIVEL DE TRANSCRIPTO DE <i>PPARY</i> EN HCC.....	136
6.5	MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE HCC .....	138

6.6	EXPRESIÓN IN SITU DE <i>PLAGL1</i> Y P21 .....	139
6.7	SOBREPRESIÓN DEL GEN <i>PLAGL1</i> .....	142
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>148</b>



## Abreviaturas

Adcarc: adenocarcinoma

ADN: ácido desoxirribonucleico

array-CGH: matriz-hibridación genómica comparativa

ARN: ácido ribonucleico

ASB: albumina de suero bovino

BAX: proteína X asociada con BCL-2

cADN: copia de ácido desoxirribonucleico

CCC: carcinoma colangiocelular

CDK: quinasa dependiente de ciclina

CDKN1A: gen Inhibidor 1A de quinasa dependiente de ciclinas

CpG: citosina y guanina unidas por enlace fosfodiéster

Ct: ciclo umbral

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindol

DMEM: medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle

dNTP: deoxinucleótido

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FAS: receptor de muerte celular Fas

FISH: hibridación in situ fluorescente

FITC: isotiocianato de fluoresceína

H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>: agua destilada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

HBT: hepatoblastoma

HBV: virus de la hepatitis B

HCC: carcinoma hepatocelular

HCV: virus de la hepatitis C

HNF: hiperplasia nodular focal

HS: hemangiosarcoma

IGFII: factor de crecimiento insulínico tipo II

IGFBP-3: proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina

IL-6: interleuquina 6

LOH: pérdida de heterocigosidad

Lot1: gen perdido durante la transformación

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos  
mARN: ácido ribonucleico mensajero  
MET: gen del receptor tirosina quinasa  
MMP-2: metalopeptidasa de matriz 2  
MMP-9: metalopeptidasa de matriz 9  
MS-PCR: PCR metil específica  
MYC: oncogén homólogo al virus de la mielocitomatosis aviar  
NAFLDs: enfermedades no alcohólicas de hígado graso  
NGS: secuenciación de última generación  
NK: células Natural Killer  
NOXA: phorbol-12-myristate-13-acetato inducida por la proteína 1  
p53: gen supresor de tumor p53  
PACAP<sub>1</sub>-R: receptor del polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitario tipo I  
PBS: buffer fosfato salino  
PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación  
PI3K: fosfoinositol 3-quinasa  
PLAGL1: gen de adenoma pleomórfico tipo 1  
PLCy: fosfolipasa C gamma  
PPAR $\gamma$ : receptor de peroxisoma-proliferador- activado gamma  
PPIA: peptidilprolil isomerasa A  
pRB: proteína retinoblastoma  
PUMA: modulador de apoptosis regulado por p53  
RB1: gen del retinoblastoma  
RT-qPCR: retrotranscripción-PCR cuantitativa  
RAC: proteína relacionada con RAS sustrato de la toxina botulínica C3  
RAF: proteína serina/treonina quinasa de fibrosarcoma de crecimiento acelerado o factor asociado a RAS  
RAL: proteína similar a RAS  
RAS: oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata  
SDS: dodecil sulfato de sodio  
SFB: suero fetal bovino  
SRC: proteína tirosina quinasa del virus del sarcoma de Rous  
STAT: proteína transductora de señal y activadora de la transcripción

TBST: tris buffer salino con tween

TERT: telomerasa transcriptasa inversa

TSG: gen supresor de tumor

WB: western blot

Zac1: proteína dedo de zinc que regula la apoptosis y el arresto del ciclo celular

ZF: dedo de zinc

## Resumen

El gen *PLAGL1* codifica para una proteína homónima que regula el arresto del ciclo celular y la apoptosis, por lo que es considerado un gen supresor de tumores. Esta regulación ocurre a través de vías de señalización que incluyen p53 y PPAR $\gamma$ , los cuales inducen p21, que es un importante regulador del ciclo celular. Se ha demostrado que las pérdidas genómicas de la región cromosómica donde mapea *PLAGL1* (6q24) en ocasiones están asociadas con metilación anormal del alelo remanente y que esto conduce a una disminución de la expresión de la proteína. La hipótesis de trabajo fue que si bien las alteraciones conducentes a desbalances genómicos tienen un rol en el desarrollo tumoral, otros cambios, tales como los epigenéticos podrían influenciar en la expresión de *PLAGL1* y por consiguiente en el papel de la proteína en el desarrollo del carcinoma hepatocelular. Para estudiar la relación entre *PLAGL1* y hepatoma, en primer lugar se caracterizaron desde el punto de vista citogenético cuatro líneas tumorales de hígado (PLC/PRF/5, SkHep1, Huh7 y HepG2), utilizadas como modelo experimental in vitro y también diez muestras de tumores frescos mediante array-CGH. Estos ensayos mostraron que pérdidas genómicas de la región donde mapea *PLAGL1* son frecuentes en hepatomas. También se investigó el estado de metilación del promotor P1 de *PLAGL1* mediante PCR-metil-específica y se determinó un porcentaje de metilación superior al 50% en las cuatro líneas tumorales. A continuación, se determinó el nivel de mRNA y proteínas de *PLAGL1*, mediante RT-qPCR y Western blot respectivamente, conjuntamente con el de p53, PPAR $\gamma$  y p21, durante la proliferación de células de hepatomas. Estos experimentos mostraron en general que la transcripción y expresión de *PLAGL1* es menor en células tumorales que en fibroblastos normales usados como control. Además, se encontró que durante proliferación, los fibroblastos sufren una marcada disminución transitoria y posterior aumento gradual de los niveles de mRNA y proteína de *PLAGL1*, p53 y p21 que sugiere una participación conjunta y orquestada en el control del crecimiento normal. Por el contrario, los niveles uniformemente bajos de mRNA y de la proteína *PLAGL1* obtenidos en los ensayos de proliferación de líneas celulares tumorales indican que se establece una dinámica diferente en la regulación de la elevada proliferación de las

células tumorales e indirectamente sugieren que *PLAGL1* juega un papel en hepatocarcinogénesis. Estos resultados motivaron la realización de ensayos de transfección con una construcción genética que contiene la secuencia completa del gen *PLAGL1*, y se encontró que las transfecciones causaron incremento de la expresión de *PLAGL1* y p21. Mediante recuento celular y citometría de flujo se detectó una disminución del número de células totales y del porcentaje de células en G2/M, sin embargo el efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular no alcanzó niveles de significancia estadística.

En resumen, los resultados del trabajo de tesis doctoral demuestran que *PLAGL1* podría ejercer un papel en la proliferación de células tumorales hepáticas y sugieren que el mecanismo de señalización en el que interviene durante hepatocarcinogénesis es complejo.

# Introducción

# 1 Introducción

## 1.1 El hígado

### 1.1.1 Anatomía

El hígado es el órgano más grande en el cuerpo humano y lleva a cabo múltiples funciones esenciales. Está subdividido en lóbulos y su unidad funcional es el lobulillo hepático (Couinaud, 1957). Los aspectos fundamentales de esta estructura son los siguientes:

- Los hepatocitos, principales células del parénquima hepático en el lobulillo, se disponen en forma radial alrededor de una vena central denominada vena centrolobulillar, y conforman una estructura hexagonal.

El sistema vascular hepático incluye ramas de la vena porta y de la arteria hepática. Ramas de estos vasos sanguíneos se localizan en los extremos de la estructura hexagonal y drenan la sangre que transportan en la vena centrolobulillar (Fig. 1A).

- El sistema de ductos se inicia como canalículos biliares que confluyen en conductos biliares y que transportan la bilis secretada en los hepatocitos al intestino delgado.
- Vasos sanguíneos comparten el espacio porta junto con el conducto biliar, por el que también pasan nervios aferentes y eferentes.

El hígado tiene una doble irrigación por sangre arterial oxigenada y sangre carboxigenada, pero rica en nutrientes, de la vena porta, que se mezclan en los sinusoides hepáticos. La unidad microvascular del hígado es el acino hepático que representa un grupo de hepatocitos, células poliédricas, ubicados alrededor de las ramas terminales de la arteriola hepática y de la vénula portal (Rappaport, 1973). La entrada de la circulación al acino ocurre por la región periportal (zona 1 o central), mientras que la salida ocurre en la periferia (zona 3), por lo tanto se produce un gradiente de oxígeno y otras sustancias que son absorbidos o removidos desde la sangre a lo largo del acino. La zona central tiene el mayor nivel de oxigenación sanguínea y actividad de enzimas respiratorias. Luego de circular por las células de la zona 1 y 2, la sangre con menor concentración de oxígeno y rica en enzimas microsomales llega a la

zona 3. La sangre y los solutos se entregan a los capilares sinusoidales o sinusoides que irrigan las distintas zonas de los acinos hepáticos. Este espacio sinusoidal está definido por las células endoteliales y fenestraciones que permiten el paso de moléculas hacia el espacio de Disse antes de entrar en contacto con las microvellosidades de los hepatocitos (Lautt, 2009). En el lumen sinusoidal también residen las células de Kupffer, macrófagos, que participan en el sistema de defensa del hígado al eliminar endotoxinas de la sangre y secretan mediadores que intervienen en la respuesta inflamatoria como citoquinas, endotelinas y óxido nítrico (Clemens *et al.*, 1994) (Fig. 1B). Otro tipo celular del hígado son las células estrelladas o células de Ito que se encuentran en el espacio perisinusoidal (Rockey, 1997) (Fig. 1B). Por último, los colangiocitos son las células epiteliales de los conductos biliares que intervienen en el transporte de proteínas desde la linfa o el plasma al interior del ducto biliar y en el metabolismo de los ácidos biliares (Ross and Pawlina, 2007).

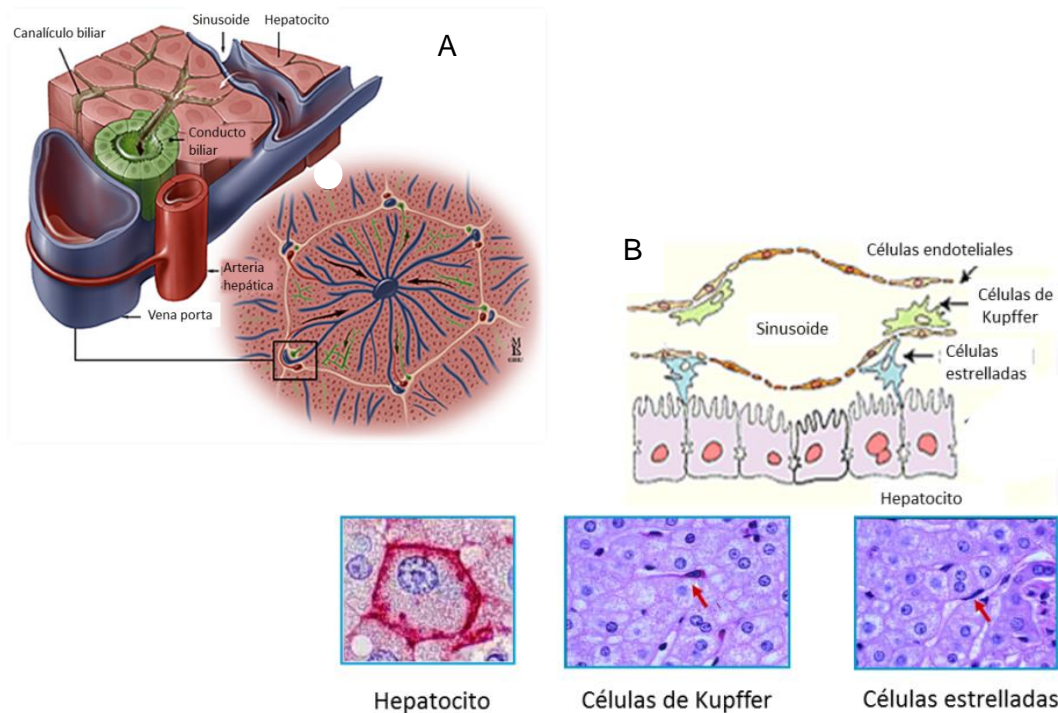


Fig. 1: A) Ilustración que muestra el lobulillo hepático con una vena centrolobulillar y los espacios porta en los extremos de la estructura hexagonal, que incluyen una rama de la vena porta, de la arteria hepática y un conducto biliar. B) Tipos celulares



presentes en el hígado: hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas y células endoteliales. Figura modificada de Catalano *et al.* (2008).

### **1.1.2 Fisiología hepática**

El hígado es un órgano que cumple una función esencial en el metabolismo de los nutrientes. En efecto, interviene en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas, lípidos, en el almacenamiento de glucógeno, vitamina A, y también en la biotransformación de fármacos y tóxicos (Tortora and Grabowski, 2003).

La producción de bilis es una función única del hígado. Esta secreción originada por los hepatocitos consiste en un 95% de agua y varios compuestos tales como sales biliares, bilirrubina, colesterol, aminoácidos, esteroides, vitaminas, xenobióticos, etc. Además, contiene inmunoglobulina A y citoquinas que estimulan el sistema inmune innato en el intestino, y por lo tanto protege al organismo de infecciones entéricas. Las sales biliares son los principales solutos de la bilis y emulsionan las grasas de la dieta facilitando su absorción intestinal (Boyer, 2013).

El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los carbohidratos mediante la formación de glucógeno y bloqueo de la producción de glucosa en estados de hiperglucemia y activación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis en estados de hipoglucemia. En el metabolismo de las proteínas los hepatocitos son capaces de captar los aminoácidos de la circulación portal y a través de transaminación los recomponen en proteínas estructurales y plasmáticas. Sintetizan proteínas plasmáticas como la albumina, la protrombina, la alfa y beta globulinas, etc. Además, el hígado metaboliza compuestos tóxicos derivados del nitrógeno, como lo es el amoníaco que se convierte en urea y luego se excreta en la orina (Lautt, 2009). Los hepatocitos participan en la degradación de fármacos, toxinas y proteínas extrañas al organismo. El hígado convierte estas sustancias en formas más solubles en agua para ser eliminadas por los riñones. Este proceso consiste en dos fases, la oxidación que ocurre en el retículo endoplasmático liso y las mitocondrias, y la conjugación que comprende la asociación con ácido glucurónico o glicina (Dianzani, 1987).

Respecto del metabolismo de lípidos, los hepatocitos almacenan triglicéridos, degradan ácidos grasos para generar ATP, sintetizan lipoproteínas, colesterol, y usan el colesterol para formar sales biliares. Las células estrelladas de Ito poseen depósitos de lípidos e intervienen en el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A (Rockey, 1997).

Por último, las células hepáticas sirven como reservorio de vitaminas A, B12, D, E y K, y de minerales (hierro y cobre). El hígado participa en el metabolismo y la homeostasis del hierro mediante la síntesis de proteínas como la transferrina, que intervienen en su transporte y también mediante su almacenaje en el citoplasma de los hepatocitos (Tortora and Grabowski, 2003). El hígado también lleva a cabo funciones inmunológicas mediante células NK (*Natural Killer*), linfocitos granulares de gran tamaño con actividad citotóxica y principalmente células de Kupffer que se localizan en el lumen sinusoidal. Estos macrófagos son las primeras que entran en contacto con el material particulado proveniente del tracto gastrointestinal y lo eliminan mediante fagocitosis. También regulan la respuesta inflamatoria e inmunitaria actuando como células presentadoras de antígenos (Knolle and Gerken, 2000).

## **1.2 Tumorigénesis**

Tumorigénesis es un proceso por medio del cual células de algún órgano o tejido adquieren nuevas capacidades en términos de proliferación y crecimiento. Las poblaciones de células normales humanas están facultadas de replicarse solamente un número limitado de veces, y que una vez alcanzado cesan de proliferar convirtiéndose en células senescentes, metabólicamente activas, o pueden entrar en muerte celular programada o apoptosis (Kufe *et al.*, 2003). El crecimiento anormal puede producirse conservando algunas de las características biológicas de las células y en este caso el producto sería una masa tumoral benigna. Sin embargo, en ocasiones se produce la conversión maligna de las células mediante la adquisición de características biológicas diferentes o anormales, capacidad de invasión de estructuras tisulares adyacentes y metástasis a órganos distantes (Kufe *et al.*, 2003; Hanahan and Weinberg, 2011). Actualmente se considera que múltiples factores intervienen en el desarrollo del cáncer, pero que los cambios genéticos

y epigenéticos juegan un papel fundamental (Ryan and Faupel-Badger, 2016; Tarrado-Castellarnau *et al.*, 2016). Mediante diferentes combinaciones de estos cambios se afectan los mecanismos moleculares que controlan la progresión del ciclo celular, la proliferación, diferenciación y muerte celular, entre otros procesos biológicos, y que conducen al origen, promoción y progresión de los tumores (Jones and Baylin, 2002).

### **1.2.1 Genes asociados a neoplasias**

Hace ya más de un siglo Theodor Boveri observó que las células malignas tenían alteraciones cromosómicas y mitóticas y propuso que las anomalías genéticas son importantes, inclusive esenciales, para el desarrollo del cáncer (Boveri, 1914). En efecto, la teoría de las mutaciones somáticas del cáncer postula que el desarrollo tumoral es un proceso de múltiples pasos que involucra cambios somáticos, a veces también heredados, en un grupo de genes que pertenecen a distintas clases funcionales, tales como oncogenes, genes supresores de tumor (TSG: del inglés *Tumor Supressor Gene*), genes de reparación de ADN, etc. (Parada, 1999).

#### **1.2.1.1 Oncogenes**

Un oncogén es un gen anormal originado por la alteración de un proto-oncogén. Actúan de manera dominante a sus contrapartes normales y sus productos proteicos tienen el potencial, bajo ciertas circunstancias, de producir transformación celular y/o promover el crecimiento celular. Diferentes mecanismos, tales como rearrreglos cromosómicos, mutaciones puntuales, amplificaciones génicas, inserciones virales, etc., pueden conducir a la formación de un oncogén (Parada, 1999).

##### **1.2.1.1.1 Gen del receptor tirosina quinasa *MET***

El gen *MET* es el receptor tirosina quinasa para el factor de crecimiento de hepatocitos y mapea en el cromosoma 7q31. La proteína es un heterodímero compuesto por una cadena  $\alpha$  y una cadena  $\beta$ , que localiza en la membrana citoplasmática (Maroun and Rowlands, 2014). Tiene una porción extracelular

que contiene secuencias ricas en cisteína seguidas de repeticiones ricas en prolina-glicina y es la región de interacción proteína-proteína. La estructura intracelular contiene residuos serina que inhiben la actividad del receptor quinasa cuando están fosforilados, un dominio tirosina quinasa que sufre transfosforilación, y dos tirosinas (Tyr1349 y Tyr1356) en C-terminal que reclutan adaptadores (Gentile *et al.*, 2008). La activación de este oncogén en tumores está asociada frecuentemente a eventos de amplificación génica, aunque también su elevada actividad se demostró que puede ser debida a un mecanismo autócrino o parácrino de estimulación del receptor y a modificaciones epigenéticas, tales como metilación y acetilación de histonas, que conducen a un incremento de la transcripción del gen (Zhang and Babic, 2016). La sobreexpresión del oncogén *cMET* induce proliferación celular anormal, invasión y metástasis de células tumorales, procesos en los que intervienen, entre otras, las vías de señalización RAS-MAPK, PI3K, PLC $\gamma$ , SRC y STAT (Boccaccio and Comoglio, 2006).

#### 1.2.1.1.2 Oncogén homólogo al virus de la mielocitomatosis aviar (*MYC*)

El gen *MYC* (*MYC*: del inglés *v-myc avian Myelocytomatosis viral oncogene homolog*) mapea en la región cromosómica 8q24 y codifica una fosfoproteína nuclear, c-MYC. La proteína c-MYC funciona como factor de transcripción y tiene un rol en el control del ciclo celular, apoptosis y transformación celular (Sipos *et al.*, 2016). Diversas vías de señalización se ven alteradas en los tumores con anomalías de c-MYC debido a la variedad de genes blancos regulados por esta proteína. Este factor de transcripción controla la transcripción de ciclinas D1, D2, CDK4 y B1, factores importantes que intervienen en el control del ciclo celular. También regula la expresión de proteínas ribosomales, ARN polimerasa I y III y de muchas proteínas que intervienen en vías de señalización del metabolismo celular, como elonasa A, hexoquinasa II y transportador de glucosa I. Más recientemente, se identificó que c-MYC regula microARNs los cuales controlan la estabilidad y la eficiencia en la traducción de mARNs (Dang *et al.*, 2006). La activación de este oncogén ocurre por alteraciones cromosómicas estructurales, tales como translocaciones e inversiones, que involucran a la región 8q24. Estos

rearreglos llevan a la sobreexpresión del oncogén por intercambio de promotores, más que por las alteraciones de la secuencia codificante y este tipo de desregulación de sus funciones es común en una variedad de tumores hematopoyéticos, tales como leucemias y linfomas (Dang *et al.*, 2006). En cáncer de próstata, mama y pulmón se detectaron amplificaciones génicas que se corresponden con un fenotipo pro-proliferativo (Prochownik, 2008; Fiorentino *et al.*, 2016).

#### 1.2.1.1.3 Oncogén homólogo a virus de sarcoma de rata (*RAS*)

La familia de los proto-oncogenes *RAS* (*RAS*: del inglés *Rat Sarcoma viral oncogene homolog*) consiste de tres miembros: Harvey-*RAS* (*H-RAS*) (11p15), Kirsten-*RAS* (*K-RAS*) (12p12) y *N-RAS* (1p13). Las proteínas *RAS* son pequeñas GTPasas que unen receptores de la superficie celular con efectores intracelulares regulando proliferación celular, diferenciación, organización del citoesqueleto y supervivencia. La expresión de las tres isoformas, que presentan alta divergencia en la secuencia C-terminal, está regulada de manera específica en los tejidos y durante el desarrollo, y existen diferencias entre ellas en la transducción de señales (Shin *et al.*, 2005). Los efectores moleculares activados incluyen RAF, RAC, PI3K y RAL y la consecuente estimulación de la vía MAPK/ERK, MMP-2 y MMP-9. Los efectos biológicos de las proteínas Ras producidos por estas vías fueron estudiados en líneas celulares de cáncer de mama (MCF10A). Los resultados obtenidos demostraron que *K-RAS* activa RAF-1 más efectivamente que *H-RAS* y *N-RAS*. *H-RAS* es un activador más potente de PI3K, mientras que *K-RAS* activa RAC más eficientemente que *H-RAS*. El efector p38 también se encuentra regulado principalmente por *H-RAS* induciendo migración e invasión celular. Esta especificidad de inducción puede ser debida no sólo a variaciones en la secuencia de aminoácidos sino también a la microlocalización de las isoformas en la membrana plasmática, retículo endoplasmático o aparato de Golgi (Kim *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2005). La desregulación de las vías de señalización mediadas por *RAS* es uno de los eventos más frecuentes en cánceres humanos, y es debida a la activación del oncogén fundamentalmente por mutaciones puntuales (Arroyo *et al.*, 2016).

### 1.2.1.2 Genes supresores de tumor

Los TSG codifican proteínas que intervienen en la regulación de la progresión del ciclo celular o proteínas cuya función es inhibir la proliferación celular. El concepto de TSG fue introducido por Knudson hace más de cuatro décadas para explicar el origen de los retinoblastomas esporádicos y heredados (Knudson, 1971). Según su hipótesis, los casos congénitos se producirían por la ocurrencia de dos mutaciones sucesivas en el gen *RB1* (*RB1* del inglés: *Retinoblastoma 1*), la primera en la línea germinal y la segunda adquirida en las células de la retina. Mientras que en los casos esporádicos la inactivación de este TSG ocurriría por mutaciones somáticas de los dos alelos. Análisis moleculares identificaron ambos tipos de mutaciones en el gen *RB1* y dieron el sustento a este modelo de las dos mutaciones (Knudson, 1985; Knudson, 1987). Desde entonces una serie de genes que normalmente inhiben la formación de tumores, entre ellos *p53*, *p21*, *PPAR $\gamma$* , *PLAGL1*, etc., han sido identificados, y además se ha demostrado que se encuentran estructural o funcionalmente alterados en las células tumorales.

#### 1.2.1.2.1 Gen supresor de tumor *p53*

Este gen mapea en el cromosoma 17 (17p13) y codifica para una proteína de 53 kDa y 393 aminoácidos organizados en diferentes dominios, incluyendo el de transactivación (TA), el dominio rico en repeticiones de prolina (PR), el sitio de unión a ADN, el de oligomerización (DO) y la región carboxi terminal (C-ter) (Fig. 2A). *p53* tiene una vida media de 20 min y su degradación por ubiquitinización se inicia por la unión a la proteína MDM2. Sin embargo, en condiciones de estrés celular o daño al ADN, esta sufre fosforilación en el dominio N-terminal, lo que la estabiliza, bloquea la formación del complejo con MDM2 y consecuentemente su degradación (Fig. 2C). Esta proteína participa en la señalización molecular de múltiples procesos biológicos, entre estos el de reparación del ADN, el de regulación del ciclo celular, senescencia y apoptosis (May and May, 1999; Machado-Silva *et al.*, 2010).

En el control del ciclo celular o ante una daño en el ADN, *p53* activada induce la transcripción del gen *p21* la cual inhibe CDK2 y por lo tanto la progresión del ciclo celular (Fig. 2B y 2C). Mientras que en el caso que el daño genómico es

irreparable p53 va a desencadenar la vía apoptótica mediante la inducción de la transcripción de genes tales como *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, del receptor *FAS* y de *IGFBP-3*, entre otros, que codifican para proteínas que intervienen en las vías intrínsecas y extrínsecas de este proceso (Yousefi *et al.*, 2014).

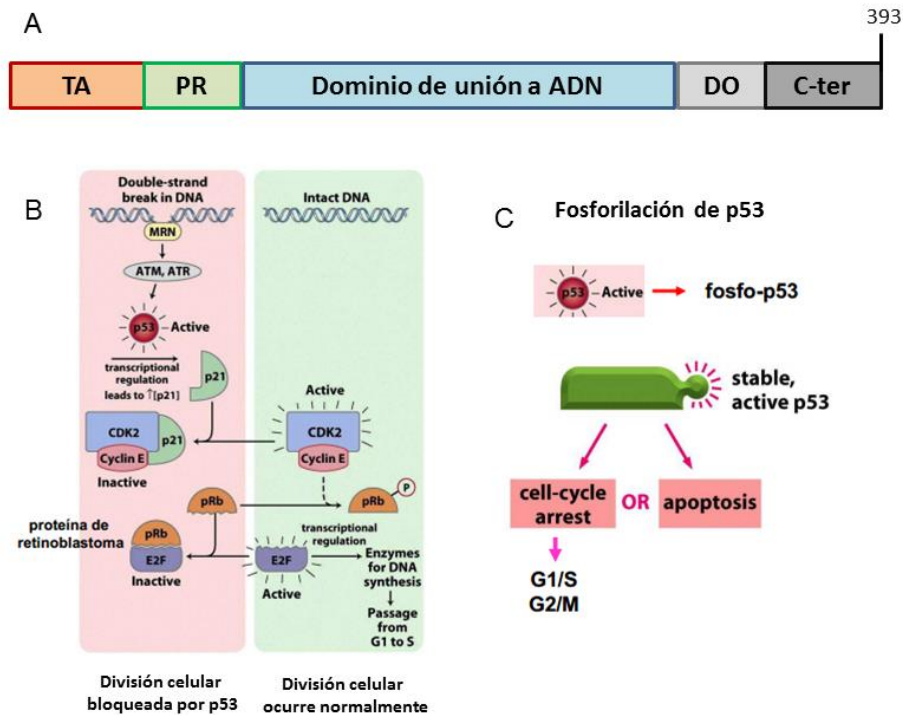


Fig. 2: Proteína humana p53. A) Esquema de los diferentes dominios de la proteína p53. B) Diagrama del mecanismo molecular por el cual p53 regula el ciclo celular. Por un lado, cuando se produce un daño en el ADN, p53 es activada y la misma induce la transcripción de p21 la cual inhibe CDK2 y por lo tanto la progresión del ciclo celular (diagrama de la izquierda). Por otro lado, cuando no hay daño en el ADN, p53 se encuentra inactivada y el ciclo celular ocurre normalmente (diagrama de la derecha). C) Activación de p53 por fosforilación, lo cual puede producir arresto de ciclo celular o apoptosis. Esquema modificado de Weinberg (2007).

La mayoría de los cánceres exhibe pérdida de la actividad de p53 debido a mutaciones o deleciones del gen (Baker *et al.*, 1990; Petitjean *et al.*, 2007; Achatz *et al.*, 2009). En efecto, se detectaron mutaciones puntuales en 30504 de 116811 (26%) muestras de varios tipos de tumores humanos, de acuerdo al Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer a febrero 2017 (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). La presencia de mutaciones puntuales alteran la función de p53 no sólo causando pérdida de la actividad de la

proteína wt (del inglés: *wild type*), sino también ejerciendo un efecto dominante negativo al unirse o inhibir wt p53, o adquiriendo ganancia de actividades relacionadas con la progresión tumoral (Lozano, 2010). El 50% de las mutaciones de p53 son con cambio de sentido y están localizadas en el dominio de unión de ADN, inhibiendo la actividad como factor de transcripción. Las mismas conducen a una alteración en los residuos de la secuencia específica de unión a ADN (por ej. mutantes en los codones 248 o 273), o un cambio en el plegamiento de la proteína (por ej. mutantes en el codón 175) (Cho *et al.*, 1994). En células tumorales la proteína p53 mutada mantiene su estabilidad debido a defectos en su normal degradación y al ambiente celular incluyendo activación de moléculas pro-proliferativas, entre ellas K-RAS, c-MYC, y reducción de p16 (Oren and Rotter, 2010).

En carcinoma hepatocelular (HCC: del inglés *HepatoCellular Carcinoma*) p53 fue identificado como un TSG frecuentemente mutado ( $\approx 35\%$ ) (Kan *et al.*, 2013; Knudsen *et al.*, 2014). Además, en HCC las mutaciones de este gen fueron asociadas con una tasa significativamente alta de recurrencia y menor supervivencia (Cleary *et al.*, 2013).

#### 1.2.1.2.2 Gen Inhibidor 1A de Quinasa Dependiente de Ciclinas (CDKN1A)

El gen Inhibidor 1A de Quinasa Dependiente de Ciclinas (*CDKN1A*: del inglés *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*) mapea en el cromosoma 6p21, es uno de los más conocidos genes blancos de p53, y codifica para una proteína de 165 aminoácidos y 21 kDa. También es conocido como *wild-type p53-activated fragment 1* (WAF1) o *CDK interacting protein 1* (CIP1), de allí su denominación  $p21^{WAF1}$  o  $p21^{CIP1}$  (Warfel and El-Deiry, 2013). La proteína p21, como regulador del ciclo celular, se une a complejos de ciclinas dependientes de kinasas (CDK2 y CDK1). Además, inhibe la fosforilación de la proteína retinoblastoma (pRb), la cual a su vez interacciona con E2F tornándola inactiva produciendo el arresto del ciclo celular en la transición G1-S (Abbas and Dutta, 2009). Por otro lado, p21 también activa el complejo ciclina D-CDK4/6 y de esta manera promueve la progresión del ciclo en la fase temprana de G1. Este complejo activo retiene el regulador p21 e impide su unión con las ciclinas en la fase tardía de G1 (punto R) (Fig. 3A y 3B). Además, p21 compete con la polimerasa-



δ por la unión con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA: del inglés *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), inhibiendo la síntesis de ADN (Warfel and El-Deiry, 2013; Yousefi *et al.*, 2014). Aparte de su función principal como regulador del ciclo celular, frente a ciertos estímulos p21 sufre fosforilación en Thr145 y Ser146 lo que impide su translocación al núcleo celular y permaneciendo en el citoplasma inhibe proteínas de señalización de apoptosis (Caspasa 8, Caspasa 10, proCaspasa 3, etc). Esta función de protección celular contra la apoptosis, puede promover crecimiento tumoral (Abbas and Dutta, 2009).

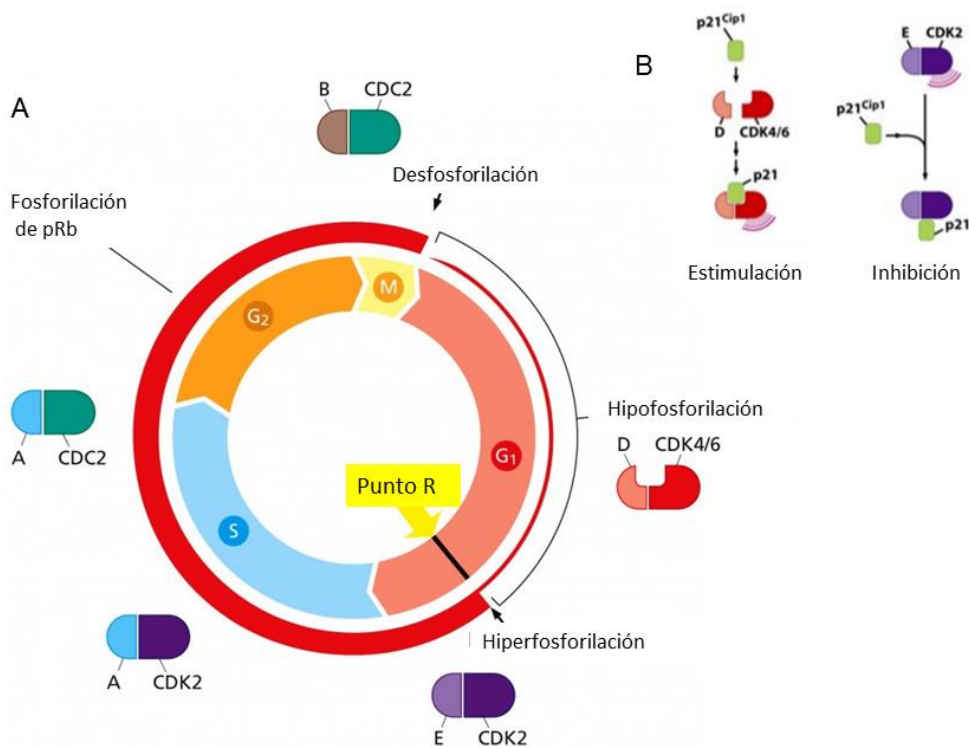


Fig. 3: Ciclo celular dependiente de la interacción de p21 con las CDKs y de la fosforilación de pRb. A) Esquema del ciclo celular. Distintas CDKs regulan las fases del ciclo celular y durante la transición M/G<sub>1</sub>, pRb se encuentra en su configuración no fosforilada. Una vez que la célula pasa el punto R la ciclina E-CDK2 fosforila pRb. B) Esquema de la activación del complejo D-CDK4/6 e inhibición de la E-CDK2 por interacción con p21. Esquema modificado de Weinberg (2007).

En muchos cánceres humanos p21 se encuentra desregulado, pero su expresión, dependiendo del contexto celular, sugiere que puede actuar como

supresor tumoral u oncogén. Esta alteración en la expresión de p21 está frecuentemente correlacionada con la pérdida de función de sus activadores transcripcionales como p53, y de su control postranscripcional (Abbas and Dutta, 2009). A nivel genómico, las mutaciones puntuales detectadas son poco frecuentes, 94 de 29702 (0.3%) muestras de varios tipos de tumores humanos, de acuerdo al Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer a febrero 2017 (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

En HCC se observó un aumento de la expresión de p21 en pacientes con HCV (HCV del inglés: *Hepatitis C Virus*), mientras que la localización citoplasmática de la proteína se correlacionó con HCC pobre y moderadamente diferenciado (Shiraki and Wagayama, 2006).

#### 1.2.1.2.3 Receptor de peroxisoma-proliferador- activado gamma (PPAR $\gamma$ )

El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR $\gamma$ : del inglés *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*) mapea en el cromosoma 3p25 y es un miembro de la familia de receptores nucleares que funcionan como reguladores de transcripción inducidos por ligandos incluyendo ácidos grasos polinsaturados, eicosanoides, entre otros. Cumple su rol principalmente en la diferenciación de adipocitos y regula un gran número de genes que median gliceroneogénesis, absorción, síntesis y almacenamiento de lípidos, y lipólisis. En este proceso, PPAR $\gamma$  forma heterodímeros con los receptores X Retinoide (RXRs) y se une a secuencias específicas de ADN (Jeninga *et al.*, 2009).

Adicionalmente, variaciones en la expresión de PPAR $\gamma$  se asociaron con el proceso de tumorigénesis. Estas alteraciones encontradas frecuentemente en tumores son débilmente explicadas por posibles mutaciones ya que su frecuencia es baja, 124 de 29515 (0.4%) muestras de varios tipos de tumores humanos, de acuerdo al Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer a febrero 2017 (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). En efecto, Pancione y colab. (2010) evidenciaron alteraciones epigenéticas en su promotor relacionadas con la represión génica observada en cáncer colorrectal (Pancione *et al.*, 2010). La función inhibitoria que ejerce PPAR $\gamma$  sobre el crecimiento y progresión celular fue estudiada principalmente en cáncer de

tiroides. Por un lado, PPAR $\gamma$  es estimulado por agonistas sintéticos y bloquea la progresión del ciclo celular por inhibición del receptor de insulina (Bonfiglio *et al.*, 2008). Por otro lado, la activación de PPAR $\gamma$  inhibe no sólo la proliferación celular en HCC a través de la inducción del efector p21, sino también la actividad metastásica mediante la regulación de la expresión de las metaloproteinasas de matriz intercelular (Shen *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Estudios realizados en HCC demostraron que la estimulación de PPAR $\gamma$  induce apoptosis a través de las vías intrínseca y extrínseca, mientras que su inhibición produce apoptosis dependiente de anclaje (anoikis) (Schaefer *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010).

#### 1.2.1.2.4 Gen de adenoma pleomórfico tipo 1 (PLAGL1)

El gen de adenoma pleomórfico tipo 1 (*PLAGL1*: del inglés *Pleomorphic Adenoma Gene-Like 1*) fue mapeado mediante análisis FISH en cromosoma 6q25, y codifica para la proteína homónima que interviene en la señalización molecular del arresto del ciclo celular y apoptosis (Abdollahi *et al.*, 1997). Su papel como TSG fue demostrado hace casi dos décadas por Abdollahi *et al.* (1997), quienes detectaron marcadas diferencias respecto de su estado transcripcional entre líneas celulares normales de ovario de rata y las líneas celulares neoplásicas derivadas de estas (transformadas). Estos autores hallaron que la expresión de este gen después de la transformación tumoral disminuía drásticamente y por ello lo denominaron *Lot1* (*Lot1* del inglés: *Lost On Transformation*). Posteriormente fue demostrado que estas alteraciones de la expresión del gen *PLAGL1* ocurren frecuentemente también en cánceres humanos y que estos defectos funcionales son debido a cambios epigenéticos más que a alteraciones estructurales del gen (Vega-Benedetti *et al.*, 2017). En efecto, mutaciones puntuales de este gen se detectaron sólo en 71 de los 21.029 (0.3%) muestras de casi todos los tipos de tumores humanos que fueron registrados en el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer a febrero 2017 (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

### **1.3 Cáncer de hígado**

Cirrosis hepática y el cáncer de hígado son las enfermedades hepáticas con mayor impacto negativo para la salud y la economía de la sociedad occidental. El cáncer de hígado es el quinto cáncer más común en el mundo y representa la tercera causa de muerte por cáncer (Knudsen *et al.*, 2014; IARC, <http://gco.iarc.fr/today>). Aproximadamente un 5% de los tumores de hígado son benignos, el resto de las neoplasias de hígado son malignas e incluyen hemangiosarcoma, hepatoblastoma, carcinoma colangiocelular (CCC: del inglés *CholangioCellular Carcinoma*) y carcinoma hepatocelular (El-Serag and Rudolph, 2007; Bosetti *et al.*, 2014).

#### **1.3.1 Hemangiosarcoma**

Hemangiosarcoma, también llamado angiosarcoma, es una neoplasia maligna de células endoteliales de vasos sanguíneos y linfáticos. Aunque su incidencia es baja ( $\leq 200$  casos/año mundialmente), el hemangiosarcoma es un tumor agresivo, compuesto de células pleomórficas con núcleos hipercromáticos que crecen en el lumen de espacios vasculares como los sinusoides y vénulas hepáticas terminales (Iacobuzio-Donahue and Montgomery, 2011). La proliferación de estas células causa atrofia de hepatocitos, formación de canales vasculares y a veces masas sólidas de tumor. Como en la mayoría de los tipos tumorales, este no tiene una etiología definida, pero se ha demostrado que la exposición industrial al cloruro de vinilo, que estaría asociada con mutaciones del gen *p53* y *KRAS-2*, es uno de los factores predisponentes más importantes (Chaudhary *et al.*, 2015).

#### **1.3.2 Hepatoblastoma**

Hepatoblastoma es un raro tumor embrionario, pero representa el tipo de tumor primario de hígado más frecuente en niños menores de 3 años, y con una mayor incidencia en varones que en mujeres (2:1) (Perilongo and Shafford, 1999). Los pacientes con Síndrome de Beckwith-Wiedemann o poliposis adenomatosa familiar tienen una predisposición mayor al desarrollo de este tipo tumoral. El tumor se origina de células precursoras de hígado (hepatoblastos) y puede presentar características histológicas epiteliales, es decir constituidos

solamente por hepatocitos inmaduros que adquieren a veces un patrón macrotrabecular o epitelio-mesenquimal cuando contienen además células del mesénquima primitivo (Buendía, 2002). Este tumor embrionario se caracteriza por poseer un perfil citogenético compuesto de un número limitado de anormalidades cromosómicas en comparación con la alta complejidad cariotípica que se observa en HCC. Sin embargo se ha demostrado que las trisomías (aisladas o simultáneas) de los cromosomas 2, 8 y 20, y los cambios estructurales en cromosoma 1q y 2q son alteraciones citogenéticas específicas de hepatoblastoma (Parada *et al.*, 2000; Buendía, 2002).

### **1.3.3 Carcinoma colangiocelular**

El CCC es un tumor de vías biliares, es decir se origina a partir de los colangiocitos que componen los conductos biliares, pero que puede tener una localización anatómica intrahepática, perihilar y distal, por lo que se lo considera como el segundo tumor de hígado hepático más común. Es una enfermedad que por lo general se diagnostica en personas alrededor de los 50 años de edad y su incidencia presenta una distribución geográfica heterogénea, con un alto porcentaje de casos en Asia (Blechacz and Gores, 2008). Entre los principales factores de riesgo se encuentran la infección por tremátodos hepatobiliares ingeridos al comer pescado crudo, colangitis esclerosante primaria y mal funcionamiento del drenaje biliar. Estos factores etiológicos crean inflamación crónica predisponiendo al epitelio biliar a una transformación maligna mediante un proceso en el que la expresión de múltiples citoquinas, entre ellas IL-6 (IL-6 del inglés: *InterLeukin 6*), induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas, telomerasa y óxido nítrico sintasa, inhibiendo de este modo la reparación del ADN y la apoptosis (Blechacz and Gores, 2008; Razumilava and Gores, 2013).

### **1.3.4 Carcinoma Hepatocelular**

El HCC es el tumor primario de hígado más común, el 85-90% de los casos son de este tipo y afecta principalmente a adultos mayores de 40 años de edad (El-Serag and Rudolph, 2007). Se desarrolla a partir de hepatocitos diferenciados y los tumores pueden presentar varios patrones histológicos, incluyendo

trabecular, pseudoglandular, sarcomatoso, escirro y diferentes grados de diferenciación (Schlageter *et al.*, 2014). Citológicamente, los hepatocitos tumorales son poligonales, presentan citoplasma eosinófilo granular, núcleos redondeados y nucléolos prominentes, aunque es común observar pleomorfismo celular, que varía de acuerdo al grado de diferenciación (Paradis, 2013).

Las áreas de mayor incidencia de HCC incluyen África subsahariana, sudeste Asiático, China, Taiwan y Japón. Países del mediterráneo como Italia, España y Grecia tienen una incidencia intermedia, mientras que el resto de los países occidentales de Europa y América pertenecen a la zona de baja incidencia. Sin embargo, datos epidemiológicos más recientes muestran que la frecuencia de casos aumentó gradualmente en el oeste de Europa y Estados Unidos (El-Serag and Rudolph, 2007; Mittal and El-Serag, 2013). En particular, en Argentina los datos de incidencia de HCC son muy limitados. De acuerdo a la página web del programa GLOBOCAN (<http://globocan.iarc.fr>), en el año 2012 la incidencia anual de cáncer hepático en ambos sexos en Argentina fue de 3.3/100000 habitantes mientras que la mortalidad anual fue de 3.4/100000 habitantes. Esta neoplasia, como otros tipos de cánceres, es una enfermedad de personas mayores, y esto probablemente sea el reflejo del tiempo necesario para la acumulación de alteraciones genéticas requeridas para el desarrollo de HCC. Por otro lado, el desarrollo de HCC en adultos jóvenes ocurre en países endémicos para las infecciones por virus de hepatitis B y C (HBV del inglés: *Hepatitis B Virus*, HCV del inglés: *Hepatitis C Virus*) y esto podría deberse a que estas condiciones generan un mayor riesgo de adquirir anomalías genómicas (El-Serag and Rudolph, 2007). En efecto, la infección por HBV o HCV figuran entre los factores predisponentes para HCC más importantes y mejor estudiados. En Asia continental y en África es más común la infección por HBV, mientras que en Japón la hepatitis es más frecuentemente debida a HCV. Pero indistintamente de cuál sea el tipo, se considera que la infección viral por una lado estimula la proliferación celular para reemplazar los hepatocitos dañados por el virus y por otro el sistema inmune al eliminar las células infectadas genera un estado inflamatorio crónico en el hígado, que favorecen el desarrollo de HCC (Bosetti *et al.*, 2014). Otros estudios mostraron

que la inserción de secuencias del HBV en el genoma del huésped, durante la hepatitis crónica, ocurre en regiones del genoma de forma no aleatoria. Por ejemplo, se detectaron secuencias virales insertadas en genes tales como *TERT* (*TERT*: del inglés *Telomerase Reverse Transcriptase*) que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa humana (Murakami *et al.*, 2005) o *CCNA2* que codifica para la ciclina A2 (Wang *et al.*, 1990), y se propuso que el mecanismo por el cual estas inserciones juegan un papel importante en tumorigénesis hepática es por su capacidad de generar inestabilidad genómica (Buendia and Neuveut, 2015). La inserción también puede llevar a la transcripción del gen *HBVx* del virus en los hepatocitos del huésped. Este gen codifica para una proteína con capacidad transactivadora que estimula la transcripción de genes tales como *MYC* y *JUN*, ambos potentes estimuladores de la proliferación celular (Robinson, 1994).

La ingesta excesiva de alcohol está altamente asociada con el desarrollo de cirrosis, aunque hay poca evidencia sobre su efecto carcinógeno. Sin embargo, se ha detectado que puede existir un efecto sinérgico entre la ingesta de alcohol y la infección crónica por HBV o HCV, incrementando el riesgo de HCC (Bosetti *et al.*, 2014). De acuerdo al Consenso Argentino de Hepatocarcinoma del año 2015 de la AAEEH (<http://aaeeh.org.ar>), en Argentina el HCC se observa principalmente en pacientes con cirrosis asociada a hepatitis crónica C y a alcoholismo crónico, representando aproximadamente el 76 % de los casos. La exposición a Aflatoxina B1, es otro factor importante que predispone para el desarrollo de HCC. Esta es una micotoxina producida por el hongo *Aspergillus* que crece sobre alimentos almacenados en malas condiciones ambientales, principalmente en regiones de Asia y Africa (Yu and Yuan, 2004). Una vez ingerida, este compuesto es metabolizado a un intermediario epóxido activo que tiene alta afinidad de unión al ADN y produce mutaciones en el mismo. En efecto, están ampliamente demostradas las mutaciones del gen *p53* producidas por Aflatoxina B1 (Bosetti *et al.*, 2014).

En los EEUU y otros países occidentales, en las últimas décadas se ha detectado un aumento en la incidencia del HCC atribuido a enfermedades no alcohólicas de hígado graso (NAFLDs del inglés: *Non Alcoholic Fatty Liver Diseases*), esto es esteatosis y esteatohepatitis asociadas con obesidad y diabetes (Boffetta *et al.*, 2006). Adicionalmente, otros estudios epidemiológicos

muestran que el riesgo de HCC es significativamente más alto en pacientes con diabetes, con lo cual el HCC comparte los dos principales factores de riesgo con NAFLDs: obesidad y diabetes (El-Serag and Rudolph, 2007).

En resumen, la epidemiología de HCC presenta una variabilidad geográfica que en ocasiones está asociada a factores de riesgo particulares de esas regiones, pero en todos los casos se observa una mayor incidencia de la enfermedad en hombres que en mujeres.

La patogénesis de HCC es parcialmente conocida y los mecanismos moleculares que intervienen en su desarrollo y progresión probablemente guardan relación con los factores etiológicos asociados (Buendia and Neuvet, 2015). Sin embargo, está ampliamente aceptado que los cambios genéticos tienen un papel relevante en el desarrollo del hepatoma. Las primeras investigaciones sobre el estado del genoma en tumores hepáticos fueron realizadas hace más de dos décadas utilizando citogenética convencional (Tsuda *et al.*, 1990; Simon *et al.*, 1991; Parada *et al.*, 1998). Estos estudios revelaron que la mayoría de los HCCs son aneuploides y que los cromosomas 1, 6, 7, 8, 17 y 19 están frecuentemente alterados en hepatomas (Parada *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2000). Posteriormente, y mediante citogenética molecular se confirmaron estos hallazgos e inclusive se ampliaron, demostrando que el perfil genómico de HCC está caracterizado por pérdidas de material genético de 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16q, y 17p, y ganancias de 1q, 6p, 8q, y 17q (Midorikawa *et al.*, 2006). Estos resultados, sobre las regiones frecuentemente afectadas de anomalías en las células tumorales, concuerdan con los obtenidos mediante estudios moleculares de polimorfismos de microsatélites de ADN en HCC respecto de la pérdida del número de copias en distintas regiones cromosómicas incluyendo 1p, 4q, 5q, 8p, 10q, 11p, 13q, 16q, 17p y 22q (Buendia, 2000). Análisis complementarios con un panel de marcadores de microsatélites más amplio, revelaron pérdida de heterocigosidad (LOH del inglés: *Loss Of Heterozygosity*) con mayor sensibilidad cariotípica en los siguientes loci: 8p23, 4q22-24, 4q35, 17p13, 16q23–24, 6q27, 1p36 y 9p12–14 (Buendia, 2000).

Entre las modernas metodologías para el análisis genómico se encuentra la Hibridación Genómica Comparativa mediante matrices (array-CGH del inglés: *Comparative Genomic Hybridization*). Este procedimiento analítico está basado



en hibridar una serie de oligonucleótidos de secuencia conocida, fijamente ordenados sobre una matriz sólida, con una mezcla en cantidades iguales de ADN problema y de referencia marcados con dos fluorocromos distintos. Esta hibridación competitiva resulta en una tinción diferencial proporcional a las cantidades presentes en la muestra original y que son cuantificables por métodos computacionales (Veltman *et al.*, 2003). Esta tecnología se ha aplicado extensamente para la investigación detallada del perfil genómico de la mayoría de los tumores que afectan al ser humano, incluido HCC. Tanto es así que más de 20 artículos científicos sobre el perfil citogenético molecular de los HCC se han publicado desde su introducción (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), demostrando que los cambios cromosómicos que más frecuentemente se detectan en los hepatomas incluyen las ganancias de cromosoma 1q, 6p, 8q, 17q y 20q, y pérdidas de 1p, 4q, 6q, 8p, 13, 16 y 17p (Villanueva *et al.*, 2007; Kakar *et al.*, 2009; Roessler *et al.*, 2012). Inclusive, del estudio comparativo entre aberraciones cromosómicas y parámetros clínicos se propuso que las ganancias de cromosoma 1q y 8q podrían considerarse cambios tempranos en el desarrollo de HCC, mientras que las pérdidas de cromosoma 4q estarían asociadas con mayor agresividad de los tumores (Crawley and Furge, 2002). Estos estudios han sido fundamentales para guiar la búsqueda de aquellos genes que hoy sabemos que juegan un papel relevante en el desarrollo de HCC, cuando sufren alteraciones cualitativas y/o cuantitativas. Por ejemplo, mediante análisis moleculares se pudieron confirmar mutaciones o deleciones de los TSG *CTNNB1* (3p22), *M6P/IGF-IIR* (6q27), *PRLTS* (8p21-22), *PTEN* (10q23), *BRCA2* (13q12), *RB1* (13q14), *AXIN1* (16p13) y *p53* (17p13) en HCC (Midorikawa *et al.*, 2006; Minguez *et al.*, 2009). Otros genes candidatos incluyen *PVT1* (8q22-24), *S100A4* y *HDGF* (1q21-24) y *TOP2A*, *CDC27* y *TUBG1* (17q21) que por su implicancia en el ciclo celular son de particular interés (Wong *et al.*, 2009).

Mucho más recientemente se introdujo la tecnología *Next Generation Sequencing* (NGS) como método de análisis genómico de alto rendimiento. Varias empresas ofrecen distintas metodologías que en definitiva permiten determinar pequeñas deleciones o inserciones, inclusive variaciones en un único nucleótido (Schulze *et al.*, 2016). La secuenciación puede hacerse sobre

el genoma completo o sobre un panel de genes predefinidos, como así también del conjunto de ARN presentes en una muestra. La aplicación de esta tecnología en la investigación del perfil genómico de HCC demostró que *TERT* es un gen muy frecuentemente alterado en este tipo tumoral, 60% de los casos analizados por Schulze *et al.* (2015), aunque las mutaciones de los genes *CTNNB1* (16-37%) y *p53* (21-35%) se detectaron también con elevada frecuencia (Tabla 1). Cambios estructurales de otros genes de la vía de señalización Wnt, tales como *AXIN1*, *APC*, también fueron detectados mediante NGS, aunque con menor frecuencia (Tabla 1). Esto hace a la vía de señalización Wnt la más comprometida durante hepatocarcinogénesis. Según estos estudios, no solamente genes que intervienen en el control del ciclo celular se encuentran desregulados, sino también genes que codifican proteínas relacionadas con la remodelación de la cromatina tales como *ARID1A* y *KMT2* (Tabla 1) (Schulze *et al.*, 2016).

Referencia	Secuenciación (Muestra)	Genes (Frecuencia)	Vías de señalización desreguladas (Frecuencia)
(Guichard <i>et al.</i> , 2012)	Exoma completo (24 HCC) Set de validación (125 HCC)	<i>CTNNB1</i> (33%) <i>p53</i> (21%) <i>ARID1A</i> (17%) <i>AXIN1</i> (15%) <i>RPS6KA3</i> (10%) <i>CDKN2A</i> (7%)	Vía de señalización Wnt (49%) Vía de señalización <i>p53</i> (33%) Remodelación de la cromatina (23%) Vía de señalización PI3K/RAS (13%) Estrés oxidativo (6%)
(Kan <i>et al.</i> , 2013)	Genoma completo (88 HCC)	<i>p53</i> (35%) <i>CTNNB1</i> (16%) <i>LRP1B</i> (11%) <i>JAK1</i> (9%) <i>AXIN1</i> (5%)	Vía de señalización Wnt (63%) Vía de señalización JAK/STAT (46%) Apoptosis (46%) Vía de señalización <i>p53</i> (43%)
(Totoki <i>et al.</i> , 2014)	Genoma completo (608 HCC)	<i>TERT</i> (54%) <i>CTNNB1</i> (31%) <i>p53</i> (31%) <i>ARID1A</i> (8%) <i>AXIN1</i> (6%) <i>TSC2</i> (5%)	Vía de señalización <i>p53</i> (72%) Mantenimiento de los telómeros (68%) Remodelación de la cromatina (67%) Vía de señalización Wnt (66%) Vía de señalización PI3K/mTOR (45%) Estrés oxidativo (19%)
(Schulze <i>et al.</i> , 2015)	Exoma completo (235 HCC)	<i>TERT</i> (60%) <i>CTNNB1</i> (37%) <i>p53</i> (24%) <i>ARID1A</i> (13%) <i>ALB</i> (13%) <i>AXIN1</i> (11%) <i>CDKN2A</i> (9%)	Mantenimiento de los telómeros (60%) Vía de señalización Wnt (54%) Vía de señalización PI3K/mTOR (51%) Vía de señalización <i>p53</i> (49%) Vía de señalización MAP kinase (43%) Diferenciación hepática (34%) Regulación epigenética (32%) Remodelación de la cromatina (28%)

Tabla 1: Resumen de los resultados de estudios realizados usando NGS en HCC. Se indican los genes candidatos (mutados frecuentemente) y las vías de señalización alteradas. Tabla modificada de Schulze *et al.* (2016).

Además de los cambios cualitativos descritos anteriormente, mediante NSG se detectaron alteraciones en el número de copias de ADN en HCCs. Por ejemplo amplificaciones en las regiones correspondientes a los loci de *VEGFA*, *FGF3/4/19* y *CCND1*, y deleciones en las regiones de *IRF2*, *PTEN*, *RB1* (Schulze *et al.*, 2016).

Los desbalances de la región cromosómica 6q2, aunque ocurren con una menor frecuencia que los de cromosoma 1, 7, 8 y 17, son considerados de gran importancia para el desarrollo de HCC (Parada, 1999). Por ejemplo, el TSG *M6P/IGFIIR* mapea en 6q25.3, y codifica para el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGFII del inglés: *Insulin-like Growth Factor 2*). La unión de IGFII a su receptor IGF2R tiene como resultado la internalización y degradación de este ligando en los lisosomas, de esta manera suprime su actividad mitogénica. En consonancia con su carácter de TSG, mutaciones y LOH fueron detectados en una variedad de tumores (Schaffer *et al.*, 2003). En la misma región cromosómica mapea el gen *PLAGL1*, que codifica una proteína C2H2 *zinc finger* que tiene actividad unión a ADN y de transactivación y aparentemente juega un papel igualmente relevante en el desarrollo de HCC (Midorikawa *et al.*, 2006). Katoh y colab. (2006) propusieron que no sólo las alteraciones genéticas, sino también los cambios epigenéticos juegan un papel importante en hepatocarcinogénesis. La metilación del ADN es la alteración epigenética más estudiada, la cual se lleva a cabo a través de la adhesión de un radical metilo a una base citosina adyacente a una guanina de islas CpG (CpG: del inglés *Cytosine and Guanine connected by a Phosphodiester bond*), frecuentemente asociadas a los promotores de genes (Li and Dahiya, 2002). Cuando el ADN es metilado en la región promotora de un determinado gen, el mismo puede ser inactivado o silenciado. Este evento es ampliamente estudiado en el desarrollo y la progresión de cáncer debido al silenciamiento aberrante de TSG (Leal *et al.*, 2007). Katoh y colab. (2006) demostraron en HCC metilación aberrante de varias islas CpG correspondiente a los siguientes genes: *MINT31*, *p16*, *RASSF1A*, *APC*, entre otros. Mientras, Midorikawa y colab. (2006) examinaron casos de HCC que presentaban LOH del cromosoma 6q y observaron metilación del promotor de *PLAGL1* del alelo remanente en concordancia con una reducción de su expresión génica.

Resumiendo, en la patogénesis de HCC ocurren eventos genéticos y epigenéticos que gobiernan un proceso de múltiples pasos que conducen al desarrollo del tumor. Buendia y colab. (2015) propusieron un modelo secuencial para el origen y progresión de la enfermedad hepática desde estadios preneoplásicos a neoplásicos (Fig. 4). Además y a pesar de la identificación de eventos genéticos y epigenéticos que pueden conducir a la aparición de HCC, los protocolos de tratamiento generalmente no se establecen en base a estos perfiles.

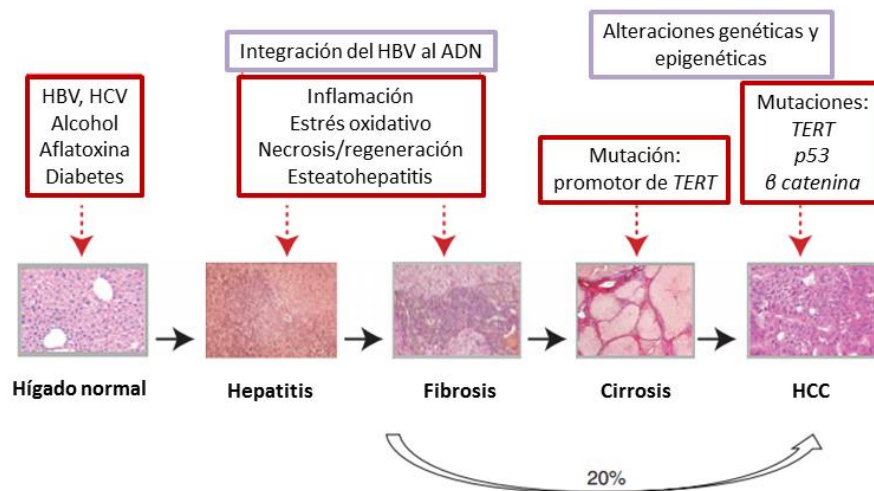


Fig. 4: Desarrollo secuencial del HCC. Durante la hepatitis crónica se producen ciclos de apoptosis, necrosis y regeneración compensatoria. Los nódulos cirróticos de alto grado (nódulos displásicos, precursores inmediatos de HCC) frecuentemente muestran aberraciones cromosómicas, mutaciones génicas (*TERT*) y cambios epigenéticos de genes supresores de tumor. Un 20% de los casos de HCC también se puede desarrollar debido a hepatitis con varios grados de fibrosis. HBV: virus de hepatitis B; HCV: virus de hepatitis C. Modelo modificado de Buendia y colab. (2015).

#### 1.4 Gen de adenoma pleomórfico tipo 1 (*PLAGL1*)

El gen *PLAGL1* codifica para la proteína homónima que interviene en el mecanismo molecular que conduce a arresto del ciclo celular y apoptosis. Este gen humano fue mapeado mediante análisis FISH (FISH del inglés: *Fluorescence in situ hybridization*) originalmente en cromosoma 6q25 (Abdollahi *et al.*, 1997). *PLAGL1* fue identificado junto a *PLAGL2* por alineamiento de secuencias debido a su similitud con *PLAG1*, el miembro más

estudiado de esta familia de genes y que es el principal blanco de alteraciones estructurales en los adenomas pleomórficos de glándulas salivales (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>). Las 3 proteínas presentan alta homología en los dominios *zinc fingers* (ZFs) pero diferente capacidad transcripcional en los dominios C-terminal respecto a PLAG1 (Kas *et al.*, 1998). PLAGL1 y PLAGL2 son 73 y 79% idénticos en la secuencia de aminoácidos a PLAG1, respectivamente, en la región ZF. Mientras que la identidad en la región carboxi terminal no excede el 40%, excepto por los últimos 28 aminoácidos en PLAG1 y PLAGL2 que presentan 79% de identidad. La primera parte de esta región contiene 4 residuos consecutivos (STSY) conservados entre estos 3 miembros de la familia PLAG (posición 338 –341 en PLAG1, posición 307–310 en PLAGL1, posición 346 –349 en PLAGL2) (Kas *et al.*, 1998) (Fig. 5).

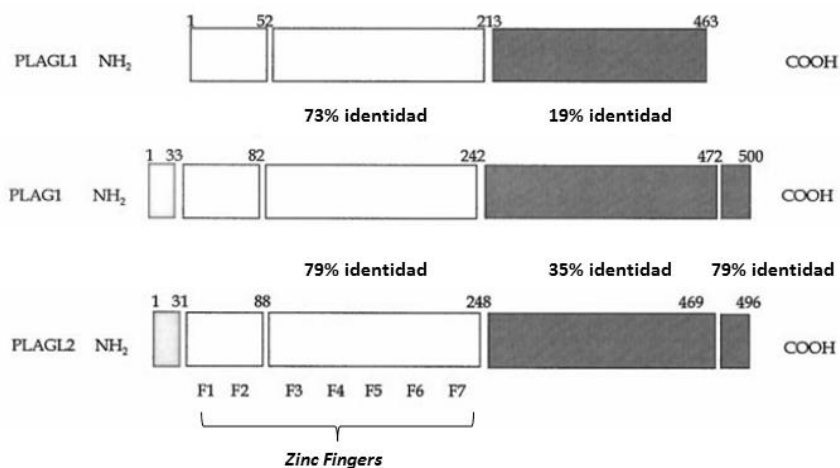


Fig. 5: Familia PLAG de factores de transcripción *zinc fingers*. La figura muestra la arquitectura estructural de las proteínas PLAG y la identidad entre los distintos dominios respecto a PLAG1. Los números denotan el contenido total de aminoácidos. Modelo modificado de Kas y colab. (1998).

El gen ortólogo de *PLAGL1* en rata fue identificado en 1997, mediante experimentos con células epiteliales de ovario de rata se observó que este gen experimentaba una reducción dramática en su nivel de transcripción cuando se inducía transformación tumoral (Abdollahi *et al.*, 1997). Estos autores designaron al gen *Lot1* y fue mapeado en cromosoma 1 (Abdollahi *et al.*, 1997). El gen ortólogo de ratón, *Zac1*, fue aislado de una biblioteca de plásmidos construida a partir de tejido de glándula pituitaria de ratones BALB/c

(Spengler *et al.*, 1997). Estudios de sobreexpresión y experimentos de *knock-down* demostraron la función antiproliferativa de la proteína que codifica este gen y de allí su designación como *Zac1* (*Zac1* del inglés: *Zinc-finger protein which regulates Apoptosis and Cell cycle arrest*) (Spengler *et al.*, 1997). El gen de ratón fue mapeado en la región proximal del cromosoma 10 (10A2), una región que comparte una alta homología con la región del cromosoma humano 6q24 donde mapea *PLAGL1* (Varrault *et al.*, 1998; Piras *et al.*, 2000). Las tres variantes codifican para una proteína ZF, compuesta por 463 (PLAGL1), 693 (ZAC1) y 583 (LOT1) aminoácidos, con un peso molecular de 54 kDa, 75 kDa y 66 kDa, respectivamente (Abdollahi *et al.*, 1997; Varrault *et al.*, 1998). ZAC1 difiere de LOT1 y PLAGL1 en la región central caracterizada por 34 repeticiones de prolina (RP), mientras que ZAC1 y LOT1 difieren de PLAGL1 por la región C-terminal, rica en ácido glutámico (*E-clusters*). El dominio *linker* (L) que se encuentra al lado de la región de unión a ADN, existe en ratón, humano y rata, y en él radica la actividad de transactivación junto con el dominio RP en ratón (Fig. 6). La parte N-terminal del C-terminal contiene el dominio de unión a coactivador que puede reclutar los coactivadores generales p300/CBP (Theodoropoulou *et al.*, 2010). La unión a ADN ocurre a través de los ZF 2, 3, 4, 6 y 7, mientras que la actividad transcripcional de PLAGL1 es controlada por interacciones de los ZF 6 y 7 con los coactivadores p300 y PCAF (Hoffmann *et al.*, 2003; Vega-Benedetti *et al.*, 2017).

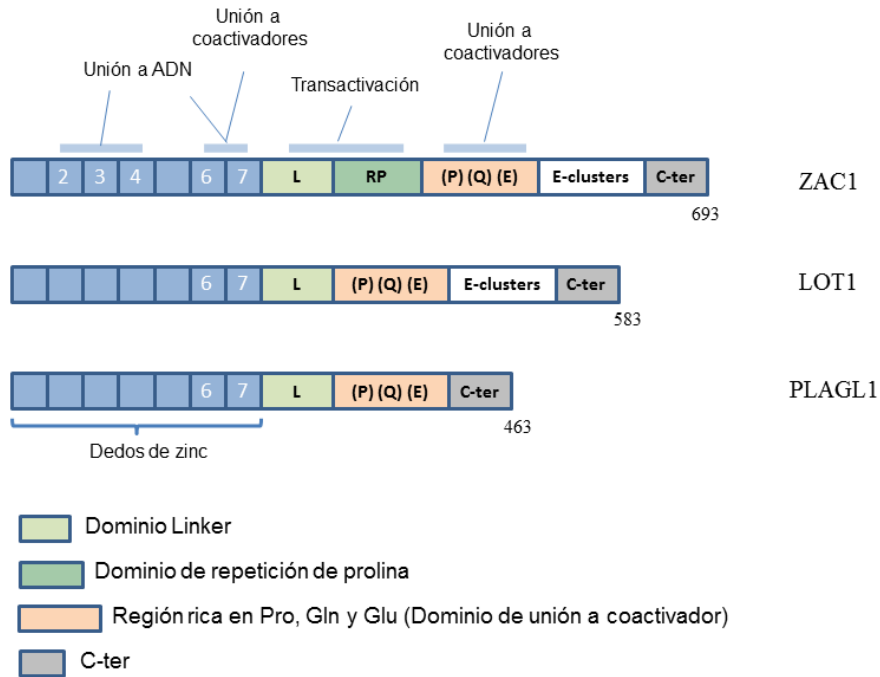


Fig. 6: Esquemas de las proteínas ZAC1, LOT1 y PLAGL1. Los números denotan el contenido total de aminoácidos. Los dominios ZF se encuentran altamente conservados entre las proteínas de las tres especies.

*PLAGL1* es un gen que durante el desarrollo embrionario se expresa exclusivamente del alelo paterno en varios tejidos (Kamiya *et al.*, 2000). Como la mayoría de los genes con impronta genética, en la regulación de su transcripción interviene un proceso de metilación del promotor, rico en secuencias CpG, de uno de los alelos. Un modelo in vitro de la regulación de *PLAGL1* demostró efectivamente que su transcripción se reprime debido a metilación de las islas CpG que induce modificación de la heterocromatina (Varrault *et al.*, 2001). La transcripción del gen *PLAGL1* ocurre principalmente a partir del promotor P1 pero también puede originarse a partir de dos promotores adicionales; P2-*PLAGL1* distante de P1 en una isla CpG no metilada y P3 que produce transcritos que incluyen solamente los últimos 3 exones del gen (Iglesias-Platas *et al.*, 2012). Además de estos transcritos alternativos, la región de *PLAGL1* codifica para ARNs no codificantes: *HYMA1* y *PLAGL1it*, importantes para el reclutamiento de histonas metiltransferasas hacia el promotor y para la interacción con la cromatina (Iglesias-Platas *et al.*, 2012).

PLAGL1 actúa como factor de transcripción y cofactor de otras proteínas y receptores nucleares. Esta proteína modula la progresión del ciclo celular a través de vías convergentes. Por un lado, interacciona con p53 y el complejo induce la expresión del Receptor del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa Pituitario tipo I (PACAP<sub>1</sub>-R del inglés: *type 1 Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor*). Los ligandos que se unen a PACAP<sub>1</sub>-R inducen transcripción génica a través de la Proteína Activadora 1 (AP-1), esencial para la proliferación y diferenciación de algunos tipos celulares y en cierta medida para la muerte celular programada (Huang *et al.*, 2001). Además, PLAGL1 y p53 inducen p21<sup>WAF1/Cip1</sup> que bloquea la transcripción de la Ciclina A causando arresto en la fase celular G1. Respecto de esta función, PLAGL1 es reclutado por p73, un miembro de la familia p53, junto a los coactivadores p300 y PCAF hacia el promotor del gen *p21*, induciendo su transcripción (Fig. 7) (Hoffmann *et al.*, 2006; Hoffmann and Spengler, 2008).

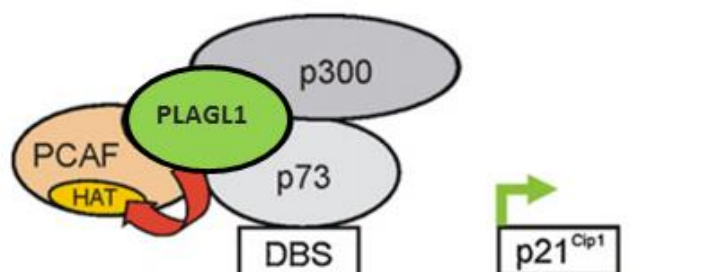


Fig. 7: Esquema de las interacciones moleculares de PLAGL1 conducentes a la activación de la transcripción de *p21* (Theodoropoulou *et al.*, 2010).

Por otro lado, y mediante la interacción con la proteína Sp1 y formación del complejo Sp1-PLAGL1, alternativo al complejo Sp1-Sp1, PLAGL1 estimula la transcripción de *p21* a través de un mecanismo independiente de p53. Por el contrario, la proteína Histona Deacetilasa1 (HDAC1) compite con PLAGL1 por la formación de este complejo y reprime la transcripción de *p21* (Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011) (Fig. 8). PLAGL1 también interactúa con AP-1,



incluyendo las proteínas c-JUN y c-FOS, y de este modo regula las actividades transcripcionales de las mismas sobre el promotor p21 (Wang *et al.*, 2011).

#### Interacción proteína-ADN



#### Interacciones proteína-proteína y proteína-ADN



#### Interacción proteína-proteína

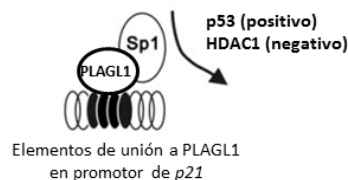


Fig. 8: Modelo de regulación de la transcripción de *p21* mediado por Sp1. Modelo modificado de Liu y colab. (2011).

Además, PLAGL1 induce la expresión de PPAR $\gamma$  que inhibe la progresión del ciclo celular a través de la inducción de  $p21^{Cip1}$  (Theodoropoulou *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). El gen *TCF4* fue identificado como otro gen blanco de PLAGL1. Experimentos de neurogénesis demostraron que PLAGL1 activa la transcripción del gen *TCF4*, llevando a un arresto del ciclo celular en G1 mediado por p57 (Schmidt-Edelkraut *et al.*, 2014).

En la figura 9 se muestra el panel de proteínas que interaccionan con PLAGL1 y las consecuencias moleculares de esas interacciones.

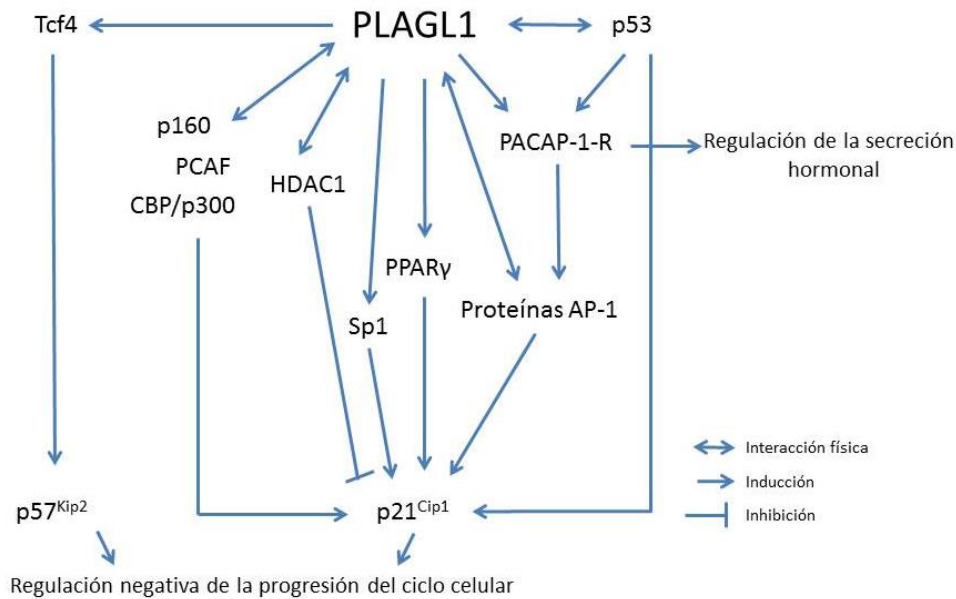


Fig. 9: Interacciones moleculares y vías de señalización en las que interviene PLAGL1.

PLAGL1 a través de diferentes mecanismos moleculares participa en múltiples procesos biológicos, tales como el desarrollo embrionario, metabolismo y la proliferación celular. Debido a ello, alteraciones genéticas y epigenéticas de este gen están relacionadas con la fisiopatología de enfermedades tan diversas como Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria, Síndrome de Beckwith-Wiedemann y cáncer. El papel de este gen en la patogénesis del cáncer fue demostrado hace casi dos décadas por Abdollahi y colab. (1997), mediante experimentos de transformación celular *in vitro* en los que se demostró la pérdida funcional de este gen en las células de ovario transformadas. Estos hallazgos fueron posteriormente confirmados para muestras de cáncer de ovario y mama humanos, es decir se demostró que el 40% de las muestras de estos tumores poseían bajos o indetectables niveles de mRNA, como así también una alta frecuencia de LOH en el locus de este gen (Cvetkovic *et al.*, 2004).

Pagotto y colab. (2000) y Viera Neto y colab. (2013) también demostraron LOH del locus de *PLAGL1* y reducidos niveles de mRNA y proteínas en muestras de Adenoma de la glándula Pituitaria No Funcionante (NFPA del inglés: *Non Functioning Pituitary Adenoma*), respecto del tejido normal. Además, ensayos *in vitro* realizados con un modelo celular de tipo tumoral demostraron que induciendo el aumento de la expresión de PLAGL1, se produce arresto del ciclo

celular (Theodoropoulou *et al.*, 2006; Theodoropoulou *et al.*, 2009). El linfoma difuso de células B grandes, una forma agresiva del linfoma no Hodgkin, es otro tipo de tumor en el que se detectaron bajos niveles de expresión de *PLAGL1*, pero en este caso estos autores encontraron que la desregulación era debida a la pérdida de transcripción a partir del promotor P2 (Valleley *et al.*, 2010). Disminución de su expresión también se demostró en tejidos tumorales de pacientes con cáncer colorrectal y estos bajos niveles de mRNA y proteínas se correlacionaron con la evolución de la enfermedad metastática (Kowalczyk *et al.*, 2015). Alteraciones del gen *PLAGL1* se demostraron estar asociadas también al desarrollo de cáncer gástrico y de próstata. Pero en estos casos se han detectado en las muestras tumorales hipermetilación del promotor P1 del gen *PLAGL1*, y en menor medida deleciones (Jacobs *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Ribarska *et al.*, 2014).

En resumen las alteraciones funcionales del gen *PLAGL1* han sido estudiadas en una variedad de tipos tumorales, sin embargo se ha encontrado sólo un trabajo sobre el papel de *PLAGL1* en HCC (Midorikawa *et al.*, 2006). Entre otras cosas, no se ha estudiado el nivel de transcripto y expresión de este gen durante proliferación de células de HCC, a pesar que *PLAGL1* actúa como cofactor de p53, una de las proteínas más extensamente estudiada en relación a proliferación celular en general y hepatocarcinogénesis en particular.

# Hipótesis y Objetivos

## 2 Hipótesis

*PLAGL1* codifica una proteína C2H2 *zinc-finger* que promueve el arresto del ciclo celular y apoptosis celular, por lo que es considerado un gen supresor de tumores. El perfil de alteraciones de la región cromosómica 6q, donde mapea el gen *PLAGL1*, no fue estudiado en detalle en HCC. Inclusive nuestros conocimientos sobre el estado transcripcional y expresión proteica de este gen en HCC, es aún limitado. De lo expuesto anteriormente se deduce que un abordaje integrando una caracterización detallada de las aberraciones del cromosoma 6 en las que esté involucrado el gen *PLAGL1* con el nivel de expresión y la respuesta celular podría aportar conocimientos sobre la biología de este gen y su rol en el desarrollo de HCC. Además, puede ser muy efectivo a la hora de identificar potenciales marcadores de importancia diagnóstica y pronóstica en HCC. Se ha demostrado que las pérdidas de determinados genes en ocasiones están asociadas con metilación anormal del alelo remanente y que esto conduce a una disminución de la expresión de la proteína. Hasta el presente, una cantidad importante de genomas de muestras de HCC han sido analizadas mediante las modernas tecnologías de alto rendimiento. Sin embargo, el perfil de alteraciones genómicas de la región cromosómica 6q24, donde mapea *PLAGL1*, aún no está completamente definido, como lo está por ejemplo la región cromosómica 17p (Buendia, 2000; Midorikawa *et al.*, 2006; Kakar *et al.*, 2009). Nuestra hipótesis es que si bien las alteraciones conducentes a desbalances genómicos cuantitativos (pérdidas de material) tienen un rol en el desarrollo tumoral, otros cambios, tales como los epigenéticos (estado de metilación anormal del promotor de *PLAGL1*) podrían influenciar en la expresión de *PLAGL1* y por consiguiente la función de la proteína durante el desarrollo de HCC.

### 3 Objetivos

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Caracterizar detalladamente las alteraciones genómicas cuantitativas del cromosoma 6 especialmente de aquellas regiones donde mapea *PLAGL1* (6q24) y el estado de metilación de su promotor en carcinomas hepatocelulares.
2. Determinar las consecuencias de las aberraciones genómicas cuantitativas sobre la transcripción y expresión de *PLAGL1* y genes relacionados funcionalmente, mediante RT-qPCR, Western blot (WB) e Inmunohistoquímica (IHQ).
3. Caracterizar el estado de las vías de señalización en las que intervienen la proteína *PLAGL1*, elucidar cómo las alteraciones cuantitativas y/o funcionales del gen modifican estas vías durante la proliferación de células de HCC.

# Materiales y métodos

## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Líneas celulares y cultivo celular

El trabajo experimental se realizó con cuatro líneas celulares derivadas de HCC: PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1, obtenidas de “*American Type Culture, Colection*”. Fibroblastos normales humanos (no tumorales) fueron usados como control y los mismos fueron elegidos ya que su nivel de transcripto y expresión es similar al detectado en hepatocitos no tumorales (<http://genecards.org>).

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado con penicilina (10000Unidades/ml)/estreptomicina (10mg/ml) (1% v/v) y suero fetal bovino (SFB) (10% v/v), en una estufa a 37°C, saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Alícuotas de cada línea celular se preservaron en nitrógeno líquido, previa suspensión en SFB suplementado con 10% v/v de DMSO.

#### 4.1.1 Línea celular PLC/PRF/5

PLC/PRF/5 fue derivada de un hepatoma de un varón joven (24 años). Mediante citogenética convencional se determinó que tiene un cariotipo hiperdiploide, con una media de 56 cromosomas (Alexander *et al.*, 1976). Se demostró que el ADN del HBV está integrado al genoma de PLC/PRF/5 y las células secretan el antígeno de superficie de la hepatitis B (<https://www.atcc.org/>). Además, esta línea celular porta la mutación R249S, una de las mutaciones más comunes de *p53* en cáncer, que origina una proteína incapaz de unirse a los sitios consenso del ADN y por lo tanto la misma no es funcional (Gouas *et al.*, 2010; Iwao and Shidoji, 2014).

#### 4.1.2 Línea celular HepG2

HepG2 fue obtenida de un HCC bien diferenciado de un paciente joven (15 años). Citogenéticamente es hiperdiploide (50-60 cromosomas). No hay evidencia de inserciones de HBV en las células HepG2 (<https://www.atcc.org/>).



#### **4.1.3 Línea celular Huh7**

Huh7 fue también derivada de un tumor hepático de un paciente varón adulto (57 años) con diagnóstico de HCC bien diferenciado. El cariotipo de las células Huh7 es hipotetraploide, con múltiples alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Análisis moleculares mostraron que no hay evidencia de inserción del genoma de HBV en estas células (<http://cellbank.nibiohn.go.jp/>). Estudios realizados con el objetivo de elucidar el mecanismo molecular de acción de la troglitazona demostraron que Huh7 carece de la proteína p21 constitutiva e inducida luego del tratamiento con esta droga (Koga *et al.*, 2001). Además, esta línea tumoral porta la mutación Y220C en el gen *p53*, sin embargo, esta alteración no afecta al dominio de unión a ADN de la proteína p53, esencial para la función de este receptor nuclear (Gori *et al.*, 2014); [www.p53.free.fr](http://www.p53.free.fr)).

#### **4.1.4 Línea celular SkHep1**

SkHep1 fue derivada de un varón adulto (52 años) con diagnóstico de HCC. Estas células exhiben un complemento cromosómico hipotriploide, con múltiples aberraciones numéricas y estructurales. Mediante estudios moleculares no se detectó la inserción de HBV en el genoma de estas células (<https://www.atcc.org/>).

### **4.2 Hibridación genómica comparativa mediante matrices**

Array-CGH o aCGH tal como se describió anteriormente (ver introducción), es un procedimiento de laboratorio para evaluar desbalances genómicos (pérdidas o ganancias). El fundamento del método radica en la competencia que se establece entre el ADN de la muestra problema y el de una control, marcados con dos fluorocromos diferentes, por hibridar con sus secuencias complementarias depositadas en una matriz sólida cuando son incubadas con estas de manera conjunta. Con el objeto de conocer el estado del genoma, se realizó array-CGH en las líneas celulares HepG2, Huh7, SkHep1 y PLC/PRF/5 y en diez muestras de tumores frescos con una matriz especialmente diseñada para investigar en detalle la región cromosómica donde mapea *PLAGL1*. El ADN se extrajo utilizando un kit comercial (Qiagen), de acuerdo a las

especificaciones del fabricante. Como ADN control se utilizó ADN del mismo sexo de la muestra, comercialmente disponible (Promega). Una alícuota de 500ng de ADN, de cada muestra fue digerida con las enzimas de restricción RsaI y AluI para generar fragmentos de hasta 200 bp. La eficiencia de esta digestión y la buena calidad del ADN se corroboró mediante electroforesis capilar en un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). Después, el ADN de las muestras a analizar y el de referencia fueron marcados con dos fluorocromos diferentes, purificados e hibridados sobre una matriz (array) de sondas de oligonucleótido de 60 bp que cubren la totalidad del genoma humano (*Human Genome 244K* Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones descritas en [www.agilent.com](http://www.agilent.com). Los datos fueron extraídos usando el software *FeatureExtraction* v.9.5.1 y analizados con el software *DNA Analytics* v.4. Los estudios de Array-CGH se realizaron por duplicado.

En este tipo de análisis, la relación entre la intensidad en un fluorocromo (genoma problema) respecto a la del otro fluorocromo (genoma de referencia, comercial) se expresa mediante una razón denominada "*logratio*", y que es calculada automáticamente por el equipo. Los valores positivos del mismo significan que en la muestra problema hubo una ganancia de material genético en la región correspondiente a esa sonda y viceversa los negativos. Con el objeto de normalizar el análisis, se definió que al menos 3 sondas consecutivas muestren un cambio por encima o por debajo de 0.25 (valor absoluto) en el *logratio* para ser considerados verdaderamente aberraciones. A partir del valor correspondiente de cada sonda (*logratio*), el software extrapola el valor del grado de ganancia o pérdida de todo un fragmento. Es decir que el software interpreta los resultados indicando zonas de aberración con igual valor, como si fuera una media de las sondas que componen ese fragmento. La robustez de estos resultados la dan muchas sondas y por eso los valores de centralización. El diseño del array-CGH se realizó en base a la versión 18 de la base de datos de secuencia del genoma humano (*UCSC version hg18/ NCBI Build 36.1*). En esta versión de esta base de datos el gen *PLAGL1* mapea en el cromosoma 6q24.2 desde el nucleótido 144303130 hasta el nucleótido 144427428, y las sondas representativas de este fragmento en el array son:

Nombre de la sonda	Comienzo	Final
A_16_P17754849	144312831	144312890
A_16_P01604392	144318226	144318285
A_14_P101276	144327592	144327651
A_16_P37831806	144335735	144335794
A_16_P37831828	144348550	144348609
A_14_P136836	144357257	144357316
A_16_P17754992	144363544	144363603
A_14_P112482	144370531	144370590
A_16_P17755012	144379890	144379949
A_16_P01604495	144399614	144399673
A_16_P17755062	144415649	144415708

### 4.3 PCR metil específica

Para conocer el estado de metilación del promotor P1 del gen *PLAGL1* en las cuatro líneas tumorales, en fibroblastos normales y en células de tumores primarios de hígado se empleó la técnica PCR metil específica (MS-PCR). La extracción de ADN se hizo mediante un kit comercial (Inbio Highway). El ADN genómico (500ng) fue tratado con bisulfito de sodio usando el kit *EZ DNA Methylation-Direct* (Zymo), que convierte las citosinas no metiladas del ADN a uracilos y deja inalteradas las citosinas que originalmente se encuentran metiladas. Los cebadores específicos para MS-PCR, localizados dentro de las islas CpG y previamente descritos como asociados a su expresión génica, fueron diseñados por Leal y colab. (2007). La posición de los cebadores en el promotor del gen *PLAGL1* fue corroborada en: [www.dbcat.cgm.ntu.edu.tw](http://www.dbcat.cgm.ntu.edu.tw).

Promotor P1 metilado

Sentido: 5' GTTTATTTTGGCGGAGATTTC 3'

Antisentido: 5' ACTAAACGACACCCACACGTC 3'

Promotor P1 no metilado

Sentido: 5' GGTTTATTTTGGTGGAGATTTTG 3'

Antisentido: 5' AAAAATAAACAACCCACACAT 3'

La mezcla de reacción de PCR contenía 100ng de ADN, 200µmol/L de dNTPs, 200µmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 200pmol/L de cebadores y 0.5µl de GoTaq (Promega), en un volumen total de 25µl. La desnaturalización inicial se realizó a 94°C por 3

min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 51°C por 45 seg y 72°C por 30 seg. La extensión final fue a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se separaron en un gel de poliacrilamida (10%) y visualizados con 0.0001% SYBR Green. Esta molécula se asocia al ADN y este complejo presenta un pico de emisión en  $\lambda=522\text{nm}$ . La señal fluorescente fue visualizada y capturada mediante un sistema de documentación de imágenes equipado con una cámara de alta resolución.

#### **4.4 Proliferación celular mediante recuento celular**

Los ensayos de proliferación se realizaron cultivando cada línea celular en medio nutritivo DMEM completo (10% SFB) hasta alcanzar un 80% de confluencia y una vez alcanzado este estado se cambió por medio DMEM suplementado al 3% con SFB por espacio de 24hs para sincronizarlas. Al final de esta incubación en medio con bajo contenido de SFB fueron disociadas con tripsina (0.25% p/v) y alícuotas de  $2.5 \times 10^4 \text{ cel/ml}$  se sembraron en 4 frascos de  $75\text{cm}^2$  (Tiempo 0= T: 0hs). Las células se cultivaron en DMEM (10% v/v SFB) por 48, 72 y 96hs, puntos temporales en los que se contaron las células viables en una cámara hemocitométrica previa tinción con una solución al 0.4% p/v de azul de tripán bajo microscopio. Las suspensiones celulares muy concentradas, principalmente las que se obtuvieron a las 72 y 96hs del experimento, se diluyeron 1:10 previamente a la tinción. La cámara hemocitométrica se cargó con 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión final coloreada y para el cálculo del número de células totales y de células viables se aplicaron las siguientes fórmulas:

**Células por ml:**

$$\text{CT} = \text{N}^{\circ} \text{ total de células} / \text{N}^{\circ} \text{ de cuadrantes} \times \text{factor de dilución} \times 10^4$$

**Viabilidad celular (%):**

$$\text{CV} = \text{N}^{\circ} \text{ de células vivas totales} / \text{N}^{\circ} \text{ de células totales (vivas + muertas)} \times 100$$

Con el propósito de estimar la capacidad proliferativa, se calculó el tiempo de duplicación (TD) de cada una de las líneas celulares, es decir el tiempo necesario para que la población celular alcance el doble de su número mediante la fórmula de la ecuación de crecimiento exponencial:

$$Y = Y_0 \times e^{(k \times T)}$$

Y= cantidad de células

$Y_0$ = cantidad de células iniciales

e= número de Euler o constante de Napier

k= tasa de crecimiento constante

X o T= tiempo

Una vez obtenido el valor de k se reemplazan los valores para obtener el TD. La cantidad de la población Y equivaldrá al doble de la cantidad inicial o  $2Y_0$ . Mediante operaciones algebraicas se aísla el término TD de la siguiente manera:

$$2Y_0 = Y_0 \times e^{(k \times TD)}$$

$$2 = e^{(k \times TD)}$$

$$\ln 2 = \ln e^{k \times TD}$$

$$\ln 2 = k \times TD$$

$$TD = \ln 2 / k$$

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es un estadístico que representa la proporción de la variación explicada mediante regresión. Esta medida relativa fue calculada con el programa GraphPad Prism a partir de los valores de la curva exponencial. El eje X de la curva corresponde a las horas de subcultivo (variable independiente) y el eje Y al número de células/ml (variable dependiente).  $R^2$  puede tomar valores entre 0 y 1, mientras más cercano a 1 mayor es la semejanza a una curva de crecimiento exponencial ideal. El mismo se obtiene a partir de la siguiente razón:

$$R^2 = SCR_{eg} / SCT = 1 - SCE / SCT$$

$$SCR_{eg} = \text{suma de cuadrados de la regresión} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$$

$$SCT = \text{suma de cuadrados total} = \sum (y_i - \bar{y})^2$$

$$SCE = \text{suma de cuadrados residual} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Cada ensayo de proliferación se realizó por duplicado.

#### **4.5 Proliferación y ciclo celular mediante citometría de flujo**

La capacidad proliferativa de las líneas celulares también se estudió mediante citometría de flujo. Para estos experimentos las células se cultivaron en las

mismas condiciones utilizadas para los ensayos de proliferación y recuento celular en cámara hemocitométrica. En cada punto temporal, las células se cosecharon y fijaron con etanol 70% durante 24hs a -20°C. Posteriormente, se lavaron dos veces mediante centrifugación en PBS (PBS del inglés: *Phosphate Buffered Saline*) a 4000rpm, a 4°C, durante 10 min, se trataron con 50µl de una solución de RNAsa (100µg/ml) directamente sobre el pellet y se tiñeron adicionando 400µl de Ioduro de Propidio (IP) (2µg/ml) por millón de células, e incubándolas por 15 min con el colorante. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determinó en un citómetro de flujo BD FACSCanto en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, Buenos Aires). Los estudios de citometría de flujo se realizaron por duplicado y a partir de dos ensayos independientes.

#### **4.6 Nivel de mRNA**

La determinación del nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPARγ* se realizó mediante retrotranscripción-PCR cuantitativa (RT-qPCR) con ARN extraído de las células de los ensayos de proliferación y en los mismos puntos temporales.

##### **4.6.1 Extracción de ARN**

El ARN se extrajo mediante TRIzol (Invitrogen) de las mismas células que se utilizaron para los recuentos celulares de los ensayos de proliferación anteriormente descritos. Los cultivos se lavaron con PBS y se realizó la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó 1ml de trizol por cada frasco de 75cm<sup>2</sup> y se incubó 5 min a temperatura ambiente. El extracto se transfirió a un tubo de centrífuga de 1.5ml y se agregaron 200µl de cloroformo, se mezcló cada tubo vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. El ARN se separó mediante centrifugación a 10000rpm por 15 min a 4°C. A continuación, se transfirió la fase acuosa conteniendo el ARN a un nuevo tubo y se agregaron 500µl de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. La solución se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 10000rpm por 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Luego, se realizó un lavado con 1ml de alcohol etílico

al 75%, y se resuspendió el ARN en 50µl de agua libre de ARNasas. La concentración de ARN se midió en un Nanofotómetro TM P-Class (IMPLEN) y la muestra se conservó a -80°C.

#### 4.6.2 Retrotranscripción

La obtención del cADN (cADN del inglés: *copy of DesoxyriboNucleic Acid*) correspondiente al ARN extraído de cada cultivo celular se realizó con un kit comercial (Invitrogen) mezclando en un tubo de microcentrífuga 1µg de ARN, 10µl de solución mezcla de reacción, 1µl de la enzima transcriptasa inversa y agua hasta un volumen final de 20µl. El procedimiento de retrotranscripción se llevó a cabo mediante incubación en un termociclador programado de la siguiente manera: 5 min a 65°C, 50 min a 37°C y finalmente 15 min a 72°C. Las muestras se almacenaron a -20°C.

#### 4.6.3 PCR cuantitativa

La cuantificación del nivel de expresión de mRNA de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$*  se hizo mediante PCR a tiempo real utilizando sondas TaqMan y un ciclador ADN Engine Opticon (BioRad).

Con el objeto de conocer la cantidad óptima de cADN a usarse para la determinación del nivel de transcripto de *PLAGL1* se realizó una curva de diluciones sucesivas que contenía 110ng, 55ng, 27.5ng, 13.75ng y 6.875ng de cADN. A partir de este ensayo de calibración de la curva estándar también se obtuvo la pendiente de la recta tanto para *PLAGL1*, como para el gen endógeno *PPIA* (*PeptidylProlyl Isomerase A*) considerado un gen de referencia estable para hepatocitos (Fox *et al.*, 2010; Boulter *et al.*, 2012). Las pendientes de ambos genes fueron equivalentes a -3.54 y -3.6, respectivamente. La eficiencia de la reacción de PCR cuantitativa se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

Los valores obtenidos y la similitud entre ambos indican que la técnica es eficiente ( $\approx 90\%$ ). Basados en este análisis preliminar, se decidió trabajar con 70ng de cADN, para la determinación del nivel de mRNA tanto de *PLAGL1*, como de *p53* y *PPAR $\gamma$* , a los fines de poder hacer comparaciones entre los 3.

Específicamente para la determinación del nivel de los transcritos, alícuotas de 70ng de cADN, 10µl de MixSso (BIO-RAD) o Master Mix (Life Technologies), 1µl de la solución conteniendo la sonda más el cebador 20X y 2µl de H<sub>2</sub>O se usaron para realizar la PCR cuantitativa. La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un primer paso de activación de la enzima polimerasa a 96°C durante 2 min; seguido por 50 ciclos en el que cada uno incluyó desnaturalización a 96°C durante 15 seg, unión de cebadores a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min. Los cebadores usados fueron sintetizados por Life Technologies: *PLAGL1* (Hs00414677\_m1); *p53* (Hs01034249\_m1); *PPARγ* (Hs01115513\_m1); *PPIA* (gen de referencia, P.N. 4333763F).

#### 4.6.4 Análisis de los datos

Los datos se colectaron y analizaron con el programa “*Gene Expression Analysis for iCycler iQ*” (BioRad). Este instrumento detecta la cantidad de fluorescencia en cada ciclo de PCR y lo representa gráficamente respecto al número de ciclos (Fig. 10). La cantidad de fragmentos de amplificación producidos es proporcional al número de moléculas de ARN inicial, de manera tal que a mayor expresión del gen, menor será el número de ciclos necesarios para detectar la misma intensidad de fluorescencia. Los resultados se expresaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , y de manera relativa a los del gen endógeno (*PPIA*), elegido como normalizador. Para cada gen, en cada muestra, se obtuvo un valor de ciclo umbral (Ct), definido como el número de ciclos en el cual la reacción alcanza el valor 0.02 de intensidad de fluorescencia (Fig. 10). Un menor valor de Ct implica una mayor concentración del transcrito en la muestra. El valor de Ct de la muestra corresponde a la media de los tres valores obtenidos en las repeticiones del experimento. Dicho valor se usa para normalizar cada muestra respecto al gen endógeno (*PPIA*) y luego respecto al calibrador de cada experimento, al cual se le asigna el valor= 1.

Normalización respecto del gen endógeno

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

Normalización respecto del calibrador

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$



Finalmente se aplica la fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

A partir de la aplicación de este método, una vez normalizadas las muestras respecto al gen endógeno, se graficaron los datos obtenidos, tomando un calibrador diferente, de acuerdo al tipo de comparación que se deseaba realizar. En primer lugar, se compararon los niveles de cada gen bajo estudio, durante las curvas de proliferación, respecto a su nivel de transcripto a T: 0hs (calibrador). En segundo lugar, y con el propósito de obtener una aproximación acerca de cómo es el nivel de transcripto de los genes *p53* y *PPAR $\gamma$*  respecto del de *PLAGL1*, se compararon los datos de los distintos tiempos respecto del nivel de *PLAGL1* a T: 0hs (calibrador). Además, se hicieron las comparaciones de los niveles de transcripto de estos genes con los de *PLAGL1* en sus respectivos puntos temporales (calibrador: *PLAGL1* T: 0hs, *PLAGL1* T: 48hs, *PLAGL1* T: 72hs y *PLAGL1* T: 96hs). Por último, se compararon los niveles de transcripto de cada uno de los tres genes entre las líneas celulares tomando como calibrador fibroblastos en cada punto temporal.

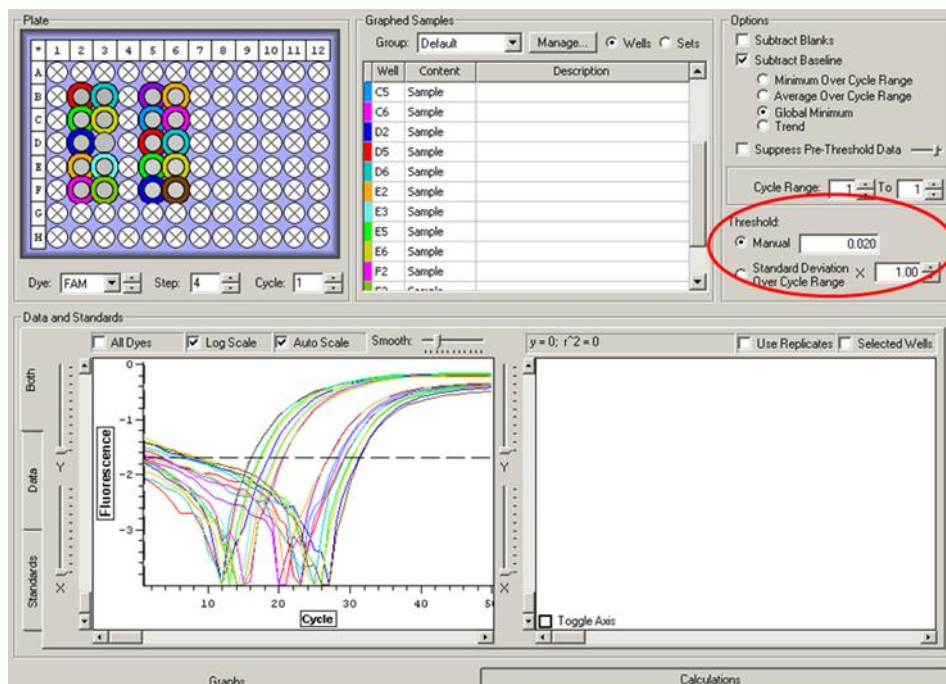


Fig. 10: Gráfico obtenido a partir del equipo de qPCR durante el ensayo de estandarización de la concentración de cADN óptima. Las curvas, abajo a la izquierda,

representan el desarrollo exponencial de la reacción de PCR y la línea horizontal que las corta corresponde al valor umbral (0.02) indicado también con un círculo rojo. Las curvas de la izquierda corresponde al gen endógeno *PPIA*, mientras que las de la derecha al gen *PLAGL1*. Para cada gen existe una diferencia de al menos 1 ciclo entre cada punto de las diluciones sucesivas, lo que equivale al doble de la concentración. Mientras que la diferencia de ciclos entre *PPIA* y *PLAGL1* es el  $\Delta Ct$ .

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado a partir de dos réplicas biológicas.

#### **4.7 Nivel de expresión**

Para estudiar el nivel de expresión de los genes *PLAGL1*, *p53* y *p21* durante la proliferación de las células de HCC, se hizo electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot.

##### **4.7.1 Extracción de proteínas**

Las células fueron dissociadas mecánicamente mediante espátulas de raspado plásticas para evitar posibles pérdidas de proteínas debido al uso de tripsina. Las células fueron lavadas en PBS, centrifugadas a 2000rpm durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente tratadas durante 30 min, a 4°C, con 50µl del buffer de lisis que contenía 50mM de Heppes, 150mM de NaCl, 0.5mM de EDTA, 1% de Nonidet P-40, suplementado con 10µl de inhibidores de proteasas (100X, Thermo Scientific) por cada 1ml de buffer. Luego el extracto celular se centrifugó a 12000rpm por 30 min a 4°C para su clarificación, y el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles totales se conservó a -20°C.

##### **4.7.2 Concentración de proteínas**

Para la determinación de la concentración de proteínas en el lisado celular se utilizó el método de Bradford. La curva de calibración necesaria, se preparó con distintas diluciones de albumina de suero bovino (ASB).

El reactivo de Bradford se preparó de acuerdo a las siguientes proporciones:

- 1 volumen de solución stock de reactivo de Bradford\*
- 2 volúmenes de ácido ortofosfórico

- 17 volúmenes de agua destilada

\*Solución stock: Azul brillante de Coomassie (G-250) 0,02% disuelta en etanol. Para cada medición se mezclaron 10µl del extracto proteico con 10µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y 200µl de reactivo de Bradford. Las cuantificaciones se realizaron por duplicado.

#### 4.7.3 Electroforesis en gel

Se realizaron electroforesis en geles de concentración variable, dependiendo del peso molecular de las proteínas de interés. En particular, las proteínas PLAGL1 y p53 se separaron en un gel de poliacrilamida al 10%, mientras que la proteína p21 se separó en un gel al 12%. En la tabla 2 se detallan los reactivos y sus concentraciones utilizadas en el orden específico para la preparación de los geles, tanto el de concentración como los de separación. Se cargaron 10µg de extracto proteico disuelto en un tampón de carga que contiene β-mercaptoetanol y SDS (SDS del inglés: *Sodium Dodecyl Sulfate*), previamente desnaturalizado por calentamiento durante 5 min. Las electroforesis se realizaron en una cubeta de migración BioRad con solución tampón Tris Glicina 1X SDS 0.1% a un voltaje de 80V durante 30 min, seguido de otro período de 1h a 100V. Para la identificación de las proteínas, en todos los experimentos se migró un marcador de peso molecular conocido.

Gel de concentración (4%)	
Reactivo	Volumen
Acrilamida/Bis (29:1) 40%	0.5ml
Tris 0.5M (pH 6.8)	1.25ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	3.2ml
SDS 10%	50µl
Persulfato de Amonio 10%	50µl
TEMED	5µl

Gel de separación		
Reactivo	Volumen (10%)	Volumen (12%)
Acrilamida/Bis (29:1) 40%	2.5ml	3ml
Tris 1.5M (pH 8.8)	2.5ml	2.5ml
H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	4.8ml	4.3ml
SDS 10%	100µl	100µl
Persulfato de Amonio 10%	100µl	100µl
TEMED	10µl	10µl

Tabla 2: Reactivos utilizados en la preparación de los geles de concentración y de separación para SDS-PAGE.

#### 4.7.4 Transferencia e inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas en gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (SIGMA) de 0.45µm y se bloquearon los sitios de unión de los anticuerpos primarios inespecíficos mediante la incubación de las membranas con una solución leche descremada al 5% en TBST 1X (TBST del inglés: *Tris Buffered Saline with Tween*) (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0.05% Tween 20) durante 12hs a 4°C. Posteriormente se incubó con la solución de cada anticuerpo primario durante 2hs a temperatura ambiente con agitación, siguiendo los detalles técnicos de la tabla 3. Los anticuerpos utilizados fueron PLAGL1 (Nº de catálogo: sc-22811, Santacruz Biotechnology), p53 (Nº de catálogo: sc-1311-R, Santacruz Biotechnology), p21 (Nº de catálogo: sc-397, Santacruz Biotechnology) y actina como control de carga (Nº de catálogo: sc-1615, Santacruz Biotechnology). Una vez finalizado el tiempo de reacción con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 3 veces con buffer TBST 1X y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP correspondiente como indica la tabla 3, durante 1h a temperatura ambiente con agitación. Las membranas se lavaron nuevamente 3 veces con buffer TBST y se revelaron por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial ECL para Western blot (Thermo Fisher Scientific). La detección de los anticuerpos se estudió a partir de dos réplicas biológicas del ensayo de proliferación para cada línea celular.

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución</b>
Actina	1:500 en TBST 1X	Anti-goat IgG-HRP	1:10000 en TBST 1X
PLAGL1	1:500 en TBST 1X	Anti-rabbit IgG-HRP	1:5000 en TBST 1X
p53	1:500 en TBST 1X	Anti-goat IgG-HRP	1:10000 en TBST 1X
p21	1:500 en TBST 1X	Anti-rabbit IgG-HRP	1:10000 en TBST 1X

Tabla 3: Concentraciones de los anticuerpos utilizados en la detección de las proteínas mediante Western blot.

Las intensidades de las bandas de las imágenes de Western blot se determinaron usando el programa ImageJ. Los valores obtenidos para cada proteína en estudio (PLAGL1, p53 y p21) en cada punto temporal de la curva

de proliferación se normalizaron respecto a la proteína control (Actina) mediante la razón de los valores de intensidades obtenidos (proteína en estudio/Actina). Una vez normalizadas las muestras se realizaron las mismas comparaciones que para los niveles de transcritos de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . En cada análisis el denominador de la razón fue el calibrador.

## **4.8 Migración celular**

La capacidad de migración de las células tumorales se investigó mediante el ensayo de cierre de la brecha. Para realizarlo se sembró cada línea celular en placas de cultivo de 60mm y se dejaron proliferar hasta que alcanzaron confluencia. En este estado y con la ayuda de una punta de micropipeta (p200) se hizo una brecha sobre la capa celular y se eliminaron los restos celulares mediante un lavado con PBS e inmediatamente se tomaron imágenes de la brecha (T: 0hs). Posteriormente la misma brecha fue fotografiada a las 24, 48 y 72hs en dos áreas diferentes con el objetivo microscópico 4X.

La capacidad migratoria se estimó midiendo un área determinada de la brecha en las dos imágenes digitales obtenidas en cada punto temporal. El área calculada corresponde a la de un trapecio:  $[(B+b) \times h] / 2$ . Los datos de superficie se graficaron relativizados al T: 0hs. Los ensayos de migración se realizaron por duplicado.

## **4.9 Sobreexpresión del gen *PLAGL1***

### **4.9.1 Crecimiento y purificación del plásmido**

Con el objeto de determinar el efecto de la sobreexpresión del gen *PLAGL1* sobre la proliferación de las células de HCC y sobre la expresión de otros actores (*p53* y *p21*) de la vía de señalización en la que participa en hepatomas, se realizaron experimentos de transfección en las líneas celulares PLC/PRF/5 y HepG2 con el plásmido prk7-*PLAGL1*, cedido gentilmente por el Dr. L. Journot (Centre National de la Recherche Scientifique, Montpellier, Francia). Estas líneas celulares se seleccionaron entre los cuatro modelos experimentales porque PLC/PRF/5 presenta mutación en el gen *p53* que produce una proteína no funcional, mientras que HepG2 es genótipicamente normal respecto de *p53*.

Las bacterias transformadas con el plásmido prk7-PLAGL1 se cultivaron en medio LB suplementado con 12.5µg/ml de ampicilina durante 24hs. El ADN plasmídico se aisló mediante un protocolo de extracción estándar (Green and Sambrook, 2012). La presencia del inserto que codifica la proteína PLAGL1 se corroboró mediante digestión con las enzimas de restricción Clal y MscI y posterior electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este procedimiento permitió visualizar fragmentos de aproximadamente 2500 bp, y que corresponderían al inserto (Fig. 11).

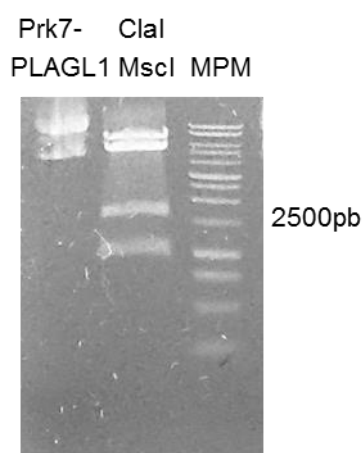


Fig. 11: Imagen del gel de agarosa correspondiente al plásmido sin digerir prk7-PLAGL1 y al plásmido digerido con las enzimas de restricción Clal y MscI. MPM: marcador de peso molecular.

#### 4.9.2 Transfección

El ADN plasmídico fue introducido en las células tumorales mediante transfección con Lipofectamina™2000 (Life Technologies), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Primeramente se determinó el volumen mínimo de reactivo necesario y si este induce sobreexpresión del PLAGL1 per se. Este ensayo preliminar se hizo con 10µg del ADN plasmídico usando dos volúmenes de Lipofectamina (8µl y 15µl). Esto mostró que la expresión de la proteína PLAGL1 es similar en ambos casos, y que el reactivo por sí solo no induce sobreexpresión. Por lo tanto, se decidió trabajar con 8µl del reactivo en los experimentos (Fig. 12).

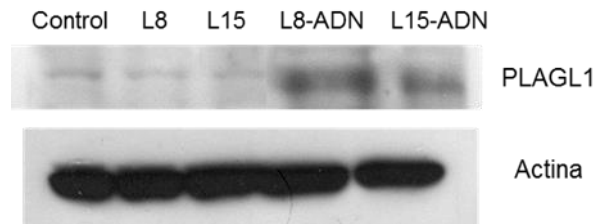


Fig. 12: Western blot con un anticuerpo anti-PLAGL1 a partir de extractos proteicos de células incubadas con lipofectamina sola (L8 y L15) y con lipofectamina + plásmido. (L8-ADN y L15-ADN). Se observa la sobreexpresión de PLAGL1 en aquellos experimento en los que se transfectó el ADN plasmídico. Como control de carga se usó actina. Control: sin lipofectamina ni ADN plasmídico, L8-ADN: 8µl de lipofectamina + 10µg de ADN plasmídico y L15-ADN: 15µl de lipofectamina + 10µg de ADN plasmídico.

Los ensayos de transfección propiamente dicho fueron realizados en placas de 6 pocillos en las que se sembraron  $5 \times 10^4$  células en cada uno y se cultivaron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), conteniendo penicilina (10000Unidades/ml)/estreptomicina (10mg/ml) (1% v/v) y suero fetal bovino (SFB) (10% v/v) a 37°C, y a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72hs. En este punto temporal, considerado T: 0hs de este experimento, las células fueron transfectadas de acuerdo al esquema presentado en la figura 13.

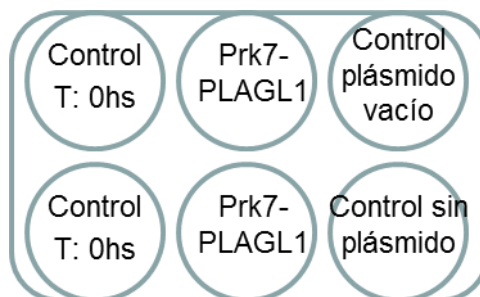


Fig. 13: Diseño del experimento de transfección en una placa de 6 pocillos. Control 72hs: Células cultivadas durante 72hs (T: 0hs) y cosechadas en este momento sin transfectar; prk7-PLAGL1: Células cultivadas durante 72hs, transfectadas con el plásmido prk7-PLAGL1 y cosechadas 30hs postransfección; Control plásmido vacío: Células cultivadas durante 72hs, transfectadas con el plásmido vacío y cosechadas 30hs postransfección; Control sin plásmido: Células cultivadas durante 102hs (72hs pretransfección + 30hs postransfección de los otros pocillos).

La transfección de las células tumorales se realizó siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente este consistió en diluir 10µg de ADN del plásmido y 8µl de lipofectamina en 50µl de medio DMEM en dos tubos de 1.5ml, separadamente. Después las dos soluciones se mezclaron e incubaron por espacio de 20 min a temperatura ambiente y se transfirieron los 100µl de este material al pocillo correspondiente con las células conteniendo 1.5ml de medio DMEM libre de suero y sin antibióticos. Una vez transcurridas 6 horas de transfección, el medio fue reemplazado por medio de crecimiento fresco suplementado al 10% con SFB.

La viabilidad de las células en los distintos puntos temporales se determinó mediante tinción con azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer de las células vivas. La eficiencia de la técnica se evaluó por inmunofluorescencia indirecta usando como anticuerpo primario el mismo utilizado para Western blot y un anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 488. El número de células que sobreexpresan PLAGL1 respecto del total de células se contaron bajo un microscopio de fluorescencia Olympus PM-10A en 10 campos microscópicos (60X) y se expresaron como el promedio entre los mismos.

El nivel de expresión de PLAGL1 y p21 se determinó mediante Western blot, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### **4.10 Inmunofluorescencia indirecta**

Para verificar la sobreexpresión de PLAGL1 y estimar la eficiencia del ensayo de transfección se realizó inmunofluorescencia indirecta sobre las líneas tumorales PLC/PRF/5 y HepG2. El experimento se hizo siguiendo el mismo diseño descrito anteriormente, excepto que en este caso se colocó un cubreobjeto estéril como soporte de las células. Una vez concluido el experimento, las células se lavaron 2 veces con PBS1X y se fijaron con paraformaldehído al 2% (PFA 2%) durante 15 min a 4°C. Después las células se lavaron nuevamente con PBS1X, se permeabilizaron con Tritón 0.05% en PBS1X durante 15 min a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron 4 veces con PBS1X. Para impedir la unión de anticuerpos a sitios inespecíficos, las células se incubaron con una solución de albumina bovina al 3% en PBS1X durante 30 min y



posterior lavado con PBS1X. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-PLAGL1 disuelto en PBS1X (1:100) durante 1h, se lavaron 3 veces con PBS1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con FITC (FITC del inglés: *Fluorescein IsoThioCyanate*) disuelto en PBS1X (1:200) durante 1h. Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS1X y la preparación se montó con 10µl de *Vectashield*® (Roche) que contiene DAPI (DAPI del inglés: *4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole*) para la contratinción de los núcleos.

#### **4.11 Inmunohistoquímica**

Para estimar el nivel de expresión de PLAGL1 in situ, realizamos inmunohistoquímica sobre preparaciones histológicas de paciente con HCC, con el mismo anticuerpo con el que se realizaron los ensayos Western blot. Se trabajó con preparaciones histológicas, tejido fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE), de 11 pacientes con cáncer hepático y también de un paciente sin cáncer de hígado (control sano) atendidos en el Hospital Italiano de Buenos Aires durante el período 2007 a 2009. Las mismas fueron tratadas de acuerdo a la reglamentación establecida por el comité de ética del hospital y con el consentimiento de los pacientes. Para realizar la técnica de inmunohistoquímica propiamente dicha se siguió un protocolo estándar que incluye desparafinación de la muestra mediante la incubación en xilol y posterior rehidratación mediante pasaje sucesivo por alcoholes 100%, 95%, 70% y 50% durante 1min en cada uno de estas concentraciones. El desenmascaramiento de antígenos se consiguió incubando las preparaciones en buffer citrato pH6 (10mM ácido cítrico, 10mM de citrato de sodio) en ebullición durante 15 min y dos lavados posteriores con PBS1X durante 5 min cada uno. A continuación, se permeabilizó con Tritón 0.05% en PBS1X durante 15 min y se lavó con PBS1X. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, los tejidos se incubaron en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4% en PBS1X durante 40 min. Luego, los preparados fueron lavados en PBS1X e incubados por 1h con una solución de albúmina bovina 3% en PBS1X y se incubaron con el anticuerpo primario anti-PLAGL1 en PBS1X (1:100) durante toda la noche a 4°C. Los portaobjetos se lavaron nuevamente dos veces en PBS1X y se

incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit HRP disuelto en PBS1X (1:200) durante 1h a temperatura ambiente. Después, las muestras se lavaron dos veces en PBS1X y se revelaron en una solución al 2.5% de 3,3'-diaminobezidina (DAB kit, Cell Marque - Sigma Aldrich) durante 1 min. La células se contracoloraron con hematoxilina de Mayer (Cicarelli) y posteriormente se lavaron en agua corriente (1 min) y agua destilada (2 min). Por último, los preparados se deshidrataron en pasajes por etanol a 50%, 70%, 95%, 100% y xilol, y se montaron con 10µl de bálsamo de Canadá. Los experimentos se realizaron por duplicado. En los controles negativos se excluyó el paso de la incubación con el anticuerpo primario.

Los preparados se observaron en un microscopio óptico y se capturaron imágenes mediante una cámara fotográfica. De acuerdo a la intensidad de las tinciones se valoró la expresión de las proteínas de una manera semicuantitativa, considerando expresión elevada (+++) a la más intensa y que fue similar a la del tejido no tumoral, escasa (+) a la de menor intensidad respecto del tejido control y moderada (++) a aquellos casos en los que el nivel fue intermedio entre estos dos extremos.

#### **4.12 Análisis de datos**

Los resultados de los array-CGH se extrajeron con el software *DNA analytics*, suministrado por Agilent. Los gráficos de dispersión de la región cromosómica donde mapea *PLAGL1* para cada línea celular se realizaron con la aplicación Microsoft Excel 2010.

Los gráficos de barras, las curvas de proliferación y los datos estadísticos de los experimentos se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism v 5.0. Se empleó la prueba ANOVA de un factor que permite comparar tres o más muestras independientes y se aplicaron las pruebas de comparación de Tukey y Dunnet. Se consideró el valor de  $p < 0.05$  como nivel de significancia estadística, lo que en los gráficos se indica con (\*).

Los resultados de citometría de flujo se analizaron mediante el programa FlowJo\_V10.

Las intensidades de las bandas de las imágenes de los experimentos de PCR metil específica y Western blot se determinaron usando el programa ImageJ.

En el ensayo de migración, una superficie definida de la herida fue medida a las distintas horas mediante el programa Photoshop CC.

# Resultados

## 5 Resultados

### 5.1 Desbalances genómicos en líneas celulares derivadas de HCC

El análisis del estado del genoma de las líneas celulares PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1 se realizó mediante array-CGH. El mismo mostró que las cuatro líneas tumorales presentan un perfil genómico diferente.

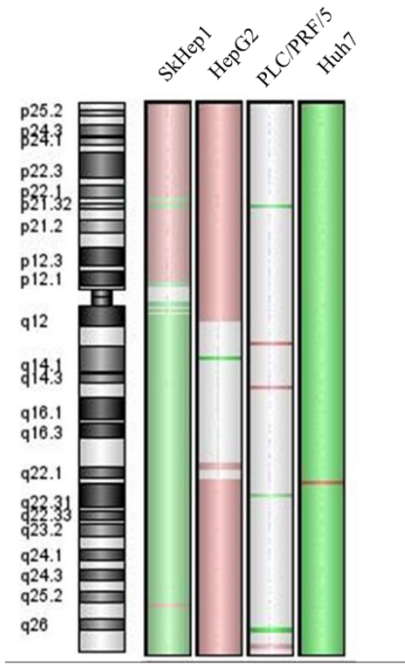
La línea tumoral HepG2 presenta una ganancia del brazo corto completo del cromosoma 6, mientras que el brazo largo exhibe un fragmento sin cambios desde q12 hasta q22, excepto por una deleción en q14 y ganancia a partir de la región q22-qter. Esta línea celular muestra valores positivos de logratio (~0.500) de las sondas utilizadas específicamente para el fragmento 6q24.2 donde mapea el gen *PLAGL1*, lo que implicaría una ganancia de esta esta región cromosómica respecto del nivel de ploidía de HepG2 (hiperdiploide) (Fig. 14).

En la línea Huh7 (hipotetraploide) se detectaron pérdidas de material genético de todo el cromosoma 6, excepto por una ganancia en 6q22.2. Respecto de la región específica donde mapea *PLAGL1*, el análisis arrojó un valor indicativo de pérdida (-1.368) para las sondas complementarias del gen (Fig. 14).

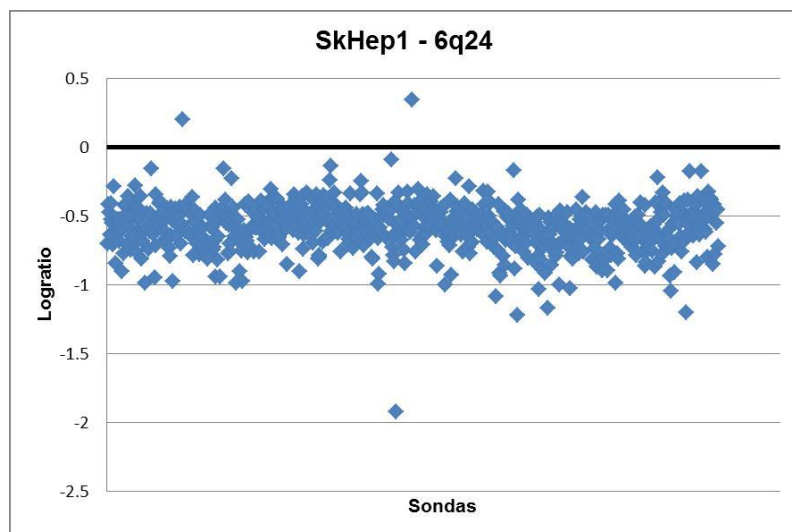
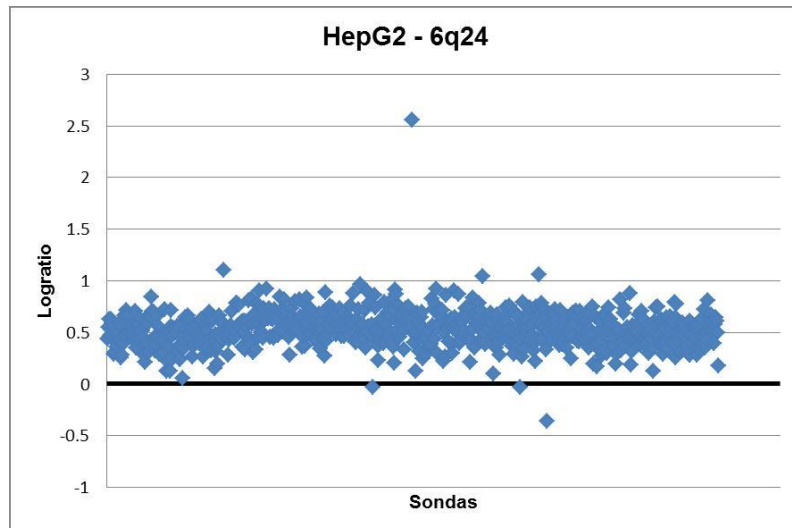
SkHep1 presenta un cariotipo hipotriploide, y excepto por una amplificación en 6q25.2, estas células muestran pérdida de material genético de todo el brazo largo. También se detectó ganancia del brazo corto completo, pero con deleciones en 6p21.32 y 6p21.33. Respecto a la región 6q24.2 donde mapea *PLAGL1*, se determinó un valor de pérdida de -0.582 para esta línea tumoral (Fig. 14).

La línea tumoral PLC/PRF/5 (hiperdiploide), salvo algunas amplificaciones y deleciones, no presenta mayores cambios a nivel de cromosoma 6. Tampoco se demostraron anomalías en la región de interés 6q24.2, ya que la comparación de las intensidades de los fluorocromos se encuentra por debajo del valor umbral 0.25 (Fig. 14).

A



B



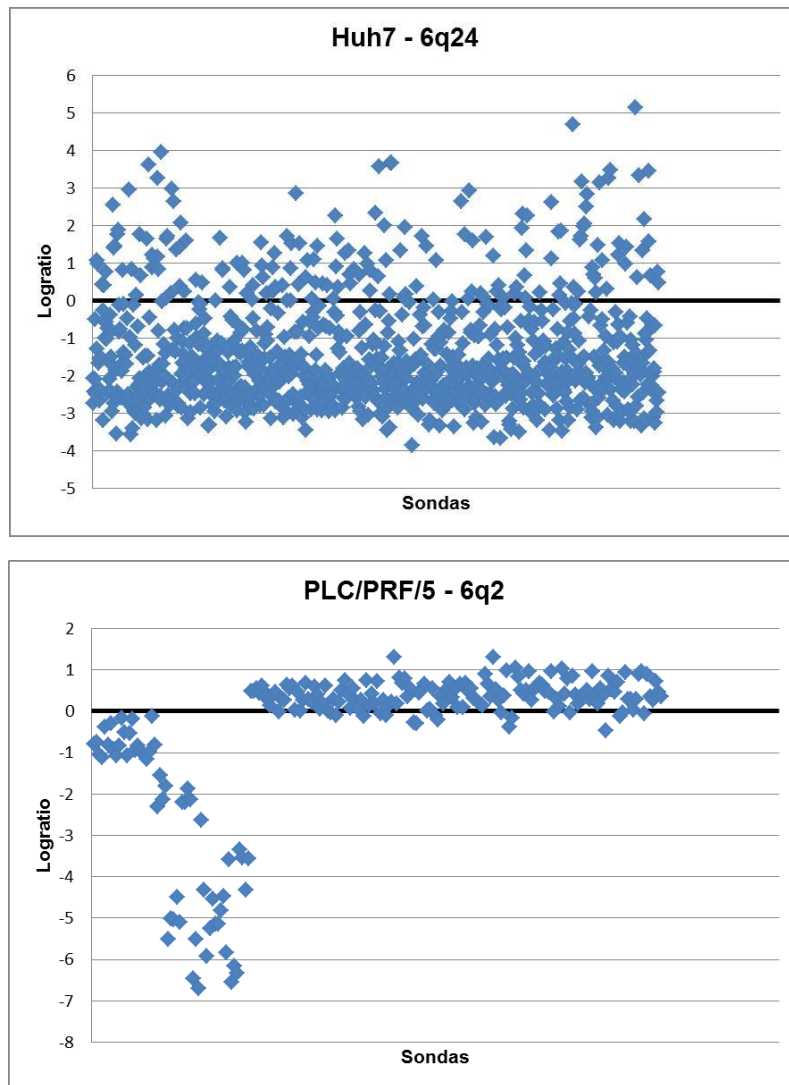


Fig. 14: Perfil genómico de las líneas SkHep1, HepG2, PLC/PRF/5 y Huh7 derivadas de hepatomas a partir de dos experimentos independientes. A) Ideograma del cromosoma 6 para cada línea tumoral. El color verde indica pérdida de fragmento cromosómico, el color rojo indica ganancia y el gris implica que la dotación génica en el ADN tumoral es la misma que en el ADN referencia o normal. B) Gráfico de los valores de logratio correspondiente a las distintas sondas para el fragmento cromosómico 6q24 en HepG2, SkHep1 y Huh7, y para la región cromosómica 6q2 en PLC/PRF/5.

Los datos de los estudios de array-CGH, se utilizaron también para investigar el estado de las regiones cromosómicas donde mapean los genes *p53*, *PPAR $\gamma$*  y *p21* que codifican proteínas homónimas que se encuentran involucradas en las vías de señalización donde interviene *PLAGL1* (Vega-Benedetti *et al.*, 2017). El gen supresor de tumor *p53* mapea en la región cromosómica 17p13.1

y nuestro análisis mostró que esta se encuentra amplificada en la línea tumoral SkHep1 (valor de ganancia= 0,398). Mientras que en las otras líneas tumorales HepG2, Huh7 y PLC/PRF/5 no se detectaron pérdidas, ni ganancias de esta región cromosómica. Respecto al gen *PPAR $\gamma$*  que mapea sobre cromosoma 3p25.2, HepG2, Huh7 y PLC/PRF/5 no presentan anomalías genómicas cuantitativas, pero los resultados del array-CGH en SkHep1 muestran pérdida de material genómico (valor de pérdida= -0.571) de esta región cromosómica. Los datos obtenidos para la región donde mapea el gen *p21* (6p21.31) indican amplificación de este gen en HepG2 y SkHep1, exhibiendo valores de ganancia de 0.517 y 0.277, respectivamente. En la línea tumoral PLC/PRF/5 no se detectaron aberraciones en la región 6p21. Al contrario, y a pesar que el array tenía una única sonda para el gen *p21*, en las células Huh7 se determinó un valor de pérdida (-1.277), lo que es indicativo de delección. Este resultado concuerda con datos publicados por otros autores, quienes no encontraron expresión de la proteína p21 en esta línea tumoral (Koga *et al.*, 2001). En la tabla 4 se presenta una compilación de los datos de ganancias y pérdidas genómicas en las regiones donde mapean los genes *PLAGL1*, *p53*, *p21* y *PPAR $\gamma$*  en las cuatro líneas celulares.

Línea Celular	Genes			
	<i>PLAGL1</i>	<i>p53</i>	<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	<i>p21</i>
HepG2	0.507	0.000	0.000	0.517
SkHep1	-0.582	0.398	-0.571	0.277
Huh7	-1.368	0.000	0.000	-1.277
PLC/PRF/5	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 4: Pérdidas y ganancias de material genómico en las regiones cromosómicas donde mapean los genes *PLAGL1*, *p53*, *PPAR $\gamma$*  y *p21* a partir de dos experimentos independientes. Los valores positivos indican ganancia, mientras que los negativos implican pérdida y el valor 0.000 se interpreta como ausencia de aberración cromosómica.

## 5.2 Estado de metilación del promotor de *PLAGL1*

Considerando la importancia que la metilación del promotor P1 de *PLAGL1* tiene para la transcripción de este gen y la observación de que su estado de



metilación se ve alterado en varios tipos de neoplasias, se realizó PCR metil específica (MS-PCR) del gen *PLAGL1* en muestras de ADN genómico de células tumorales y normales. Los productos de la MS-PCR tienen diferencias de tamaño según el promotor se encuentre metilado (147pb) o no metilado (152pb). Este experimento permitió determinar que en todas las líneas celulares analizadas el gen *PLAGL1* presenta una fracción de ADN con el promotor P1 metilada y otra no metilada. De la observación de las imágenes de los geles se infiere que hay una mayor proporción de ADN del P1 metilado que no metilado (Fig. 15).

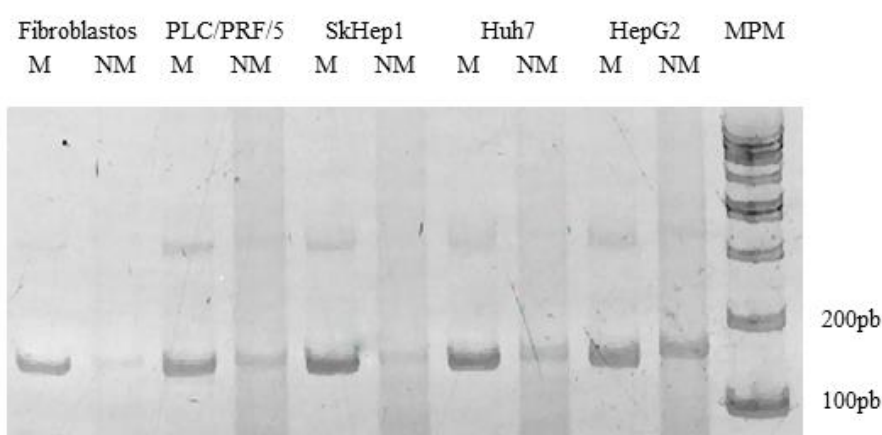


Fig. 15: Imagen del resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de los productos de MS-PCR en líneas celulares derivadas de HCC, PLC/PRF/5, SkHep1, Huh7 y HepG2 y de fibroblastos normales. Note que la fracción de ADN con el promotor metilado es mucho mayor que la de ADN no metilado. M: Metilado; NM: No Metilado; MPM: Marcador de Peso Molecular.

### 5.3 Proliferación, nivel de transcripto y de expresión proteica

#### 5.3.1 Fibroblastos

Los fibroblastos no tumorales se usaron como control de proliferación normal, como así también del nivel de transcripto y de expresión normal de las proteínas estudiadas. Para realizar los ensayos de proliferación y confección de la curva de crecimiento, alícuotas iniciales de  $2.5 \times 10^4$  cels/ml se sembraron en frascos de  $75\text{cm}^2$ , se cultivaron por espacio de 48, 72 y 96hs y se volvieron a contar al final de estos períodos. Este ensayo de proliferación mostró que los fibroblastos tienen un crecimiento lento aunque sostenido, alcanzando

alrededor de  $8.0 \times 10^4$  cels/ml a las 96hs (Fig. 16). En términos generales se puede decir que los fibroblastos duplicaron su número después de 48hs en cultivo. Esto lo demuestran los resultados obtenidos aplicando la fórmula de crecimiento exponencial  $Y = Y_0 \times e^{(k \times T)}$ , la que arrojó un valor de TD de 59hs, una tasa de crecimiento k equivalente a 0.012 y un valor de  $R^2 = 0.943$ . Este coeficiente  $R^2$  cercano a 1 nos indica que hay muy buen ajuste de los valores a una curva exponencial ideal. Mientras que la viabilidad celular, evaluada en una cámara hemocitométrica previa tinción con azul de tripán, se mantuvo elevada y constante a lo largo de la curva de crecimiento (~98%).

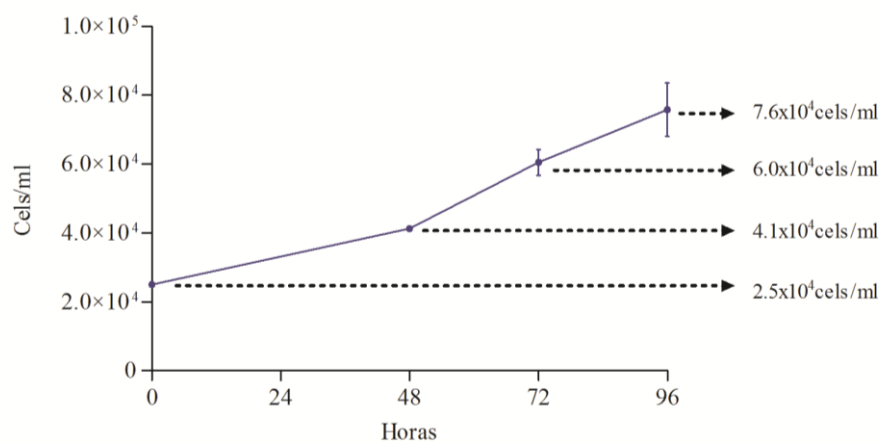


Fig. 16: Curva de proliferación de fibroblastos a partir de dos experimentos independientes.

Además de estudiar proliferación celular mediante el recuento celular en cámara hemocitométrica, se realizaron los análisis por citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células en cada una de las etapas del ciclo celular, y se encontró que la cantidad de células en fase G2/M incrementa hasta las 24hs posteriores al comienzo del experimento y luego disminuye gradualmente hasta las 96hs (final del experimento) (Fig. 17).

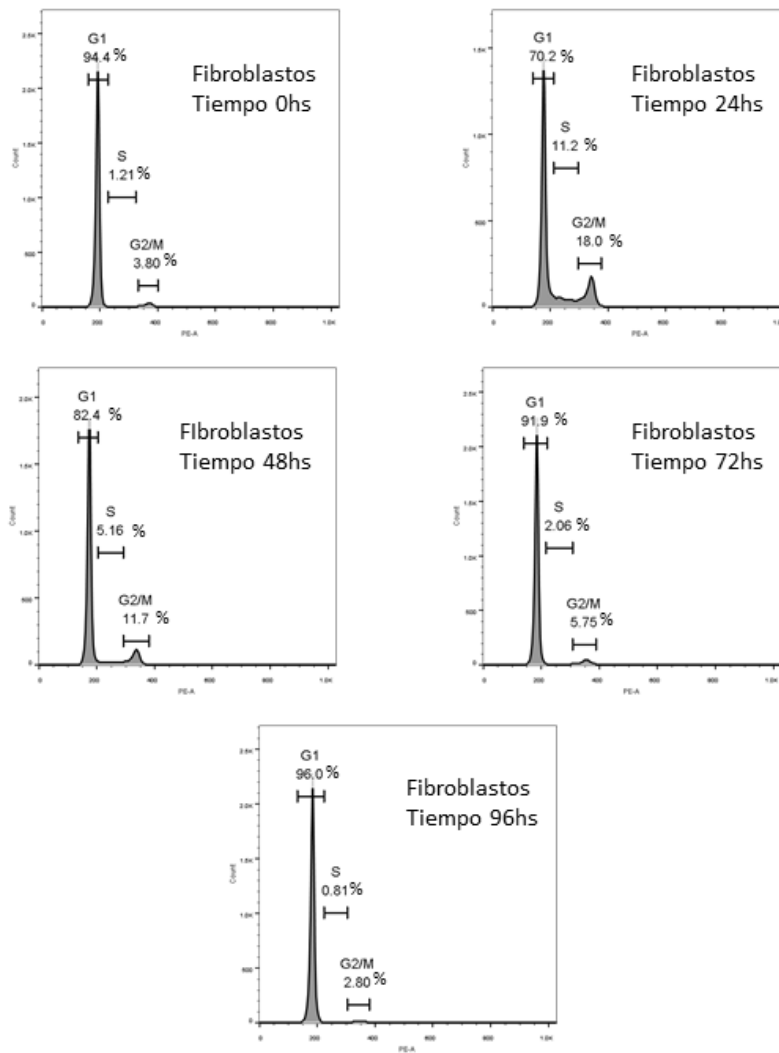
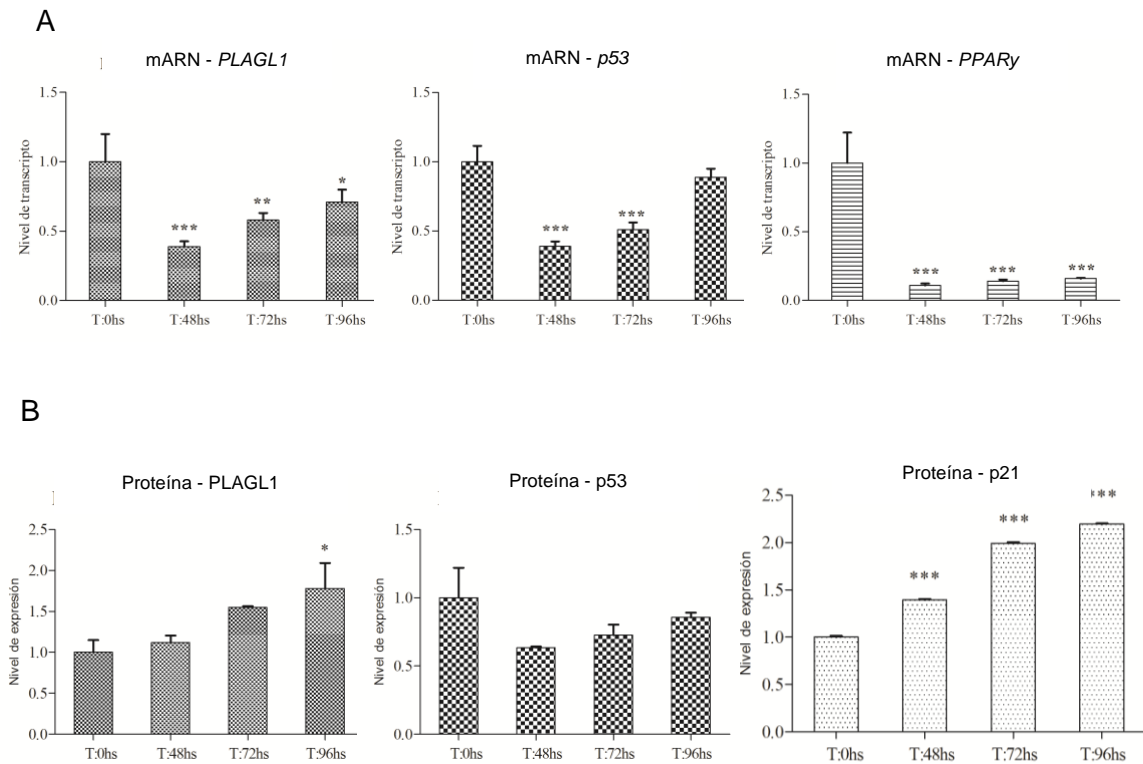


Fig. 17: Histogramas del ciclo celular de fibroblastos mediante citometría de flujo para cada punto temporal de la curva de proliferación. Este estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes.

En los distintos puntos temporales del ensayo de proliferación se estudió el nivel de transcritos de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , como así también el nivel de expresión de *PLAGL1*, *p53* y *p21*. Los resultados se expresaron respecto de los valores de Fibroblastos T: 0hs, que es considerado calibrador en estos experimentos. Con respecto al nivel de transcritos del gen *PLAGL1*, se detectó que este disminuye significativamente desde el momento del cambio a un medio nutritivo completo (10% SFB) y hasta las 48hs. Después el nivel de transcritos de este gen vuelve a aumentar gradualmente hasta las 96hs de cultivo (Fig. 18A). El nivel de expresión de la proteína *PLAGL1* sigue una dinámica similar, disminuye a las 24hs (dato no mostrado) y aumenta hasta las

96hs (Fig. 18B y 18C). Dada la relación funcional entre *PLAGL1*, *p53* y *p21* en la señalización celular durante proliferación, se estudió también el nivel de transcripto de *p53* y el nivel de expresión proteica de *p53* y *p21* en las mismas muestras obtenidas durante los ensayos de proliferación. Los análisis demostraron que el nivel de transcripto de *p53* sigue un patrón similar al presentado por *PLAGL1*, es decir un descenso transitorio posterior al cambio de condiciones de cultivo e incremento gradual hasta las 96hs, momento en el que alcanza un nivel estadísticamente no diferente al de T: 0hs (Fig. 18A). El nivel de transcripto de *p53* exhibe diferencias significativas respecto al T: 0hs (calibrador) a las 48 y 72hs, mientras que el nivel de la proteína si bien es más bajo, las diferencias respecto de T: 0hs no son estadísticamente significativas (Fig. 18B y 18C). Por el contrario, el nivel de expresión de la proteína *p21* durante la proliferación celular es mayor al determinado en T: 0hs (Fig. 18B y 18C). Además del estudio de estos genes, se realizó RT-qPCR para conocer el nivel de transcripto de *PPAR $\gamma$* , un gen diana del factor de transcripción *PLAGL1*. Este ensayo mostró que el nivel del transcripto fue siempre inferior en células en estado proliferativo respecto de aquellas que se encontraban en G0 (T: 0hs) (Fig. 18A).



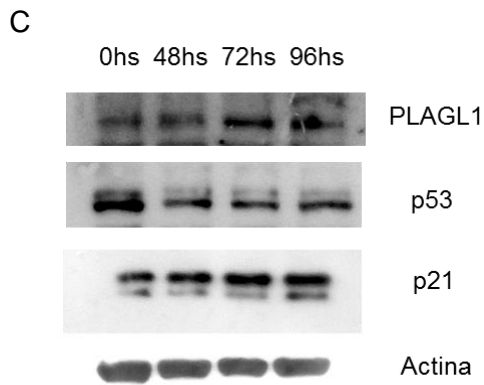


Fig. 18: Nivel de transcritos de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y nivel de expresión proteica de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en fibroblastos durante proliferación a partir de dos experimentos independientes. Los resultados de los análisis y las diferencias significativas se expresan respecto del valor obtenido para el punto temporal T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcritos de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$*  para los tiempos 0, 48, 72 y 96hs de proliferación. B) Nivel de expresión de *PLAGL1*, *p53* y *p21* para los tiempos 0, 48, 72 y 96hs de proliferación. C) Western blot de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en los distintos puntos temporales. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

La expresión de las proteínas *PLAGL1* y *p21* también fue estudiada in vitro mediante inmunocitoquímica indirecta. Tal como se esperaba se visualizó a *PLAGL1* tanto en citoplasma como en el núcleo de los fibroblastos normales. Mientras que la localización de la proteína *p21* fue principalmente nuclear (Fig. 19).

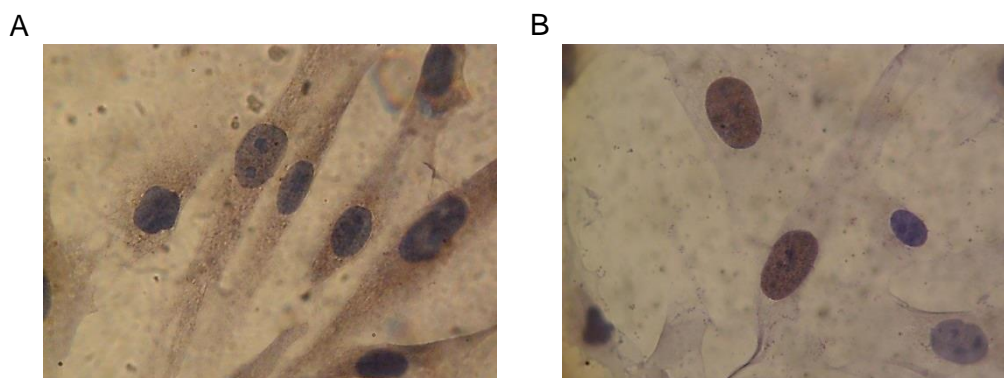


Fig. 19: Imágenes representativas de la inmunodetección de las proteínas *PLAGL1* (A) y *p21* (B) en células fibroblastos. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes. Aumento 100X.

Con el propósito de obtener una aproximación acerca de cómo es el nivel de transcripto de los genes *p53* y *PPAR $\gamma$*  respecto del de *PLAGL1*, se compararon los datos de RT-qPCR y Western blot con el T: 0hs de *PLAGL1* donde las células se encuentran en quiescencia (Fig. 20). Este estudio mostró que el nivel de transcripto de *PPAR $\gamma$*  es significativamente menor, mientras que *p53* presenta mayor concentración de mRNA. También se comparó el nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*, y se determinó que la concentración de *PLAGL1* es significativamente menor a la de las otras dos proteínas. Esta relación de los niveles de expresión se mantiene también al comparar los datos de expresión de estas dos proteínas con los de *PLAGL1* en cada punto temporal del experimento (Fig. 21).

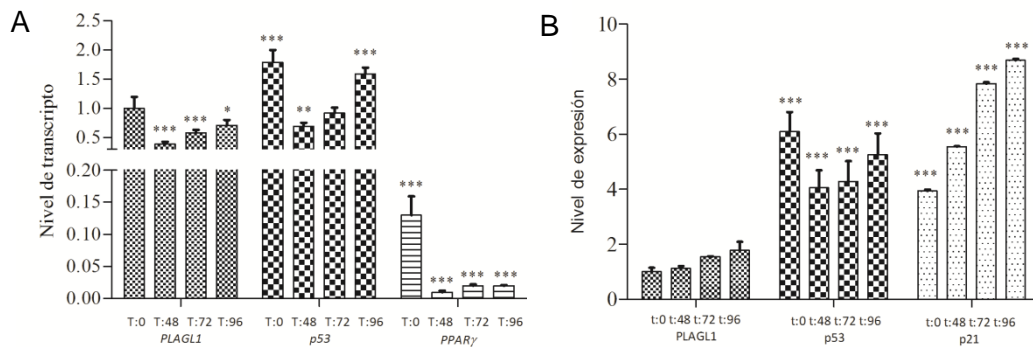


Fig. 20: Comparación del nivel de transcripto y expresión proteica entre genes en fibroblastos a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido para *PLAGL1* T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

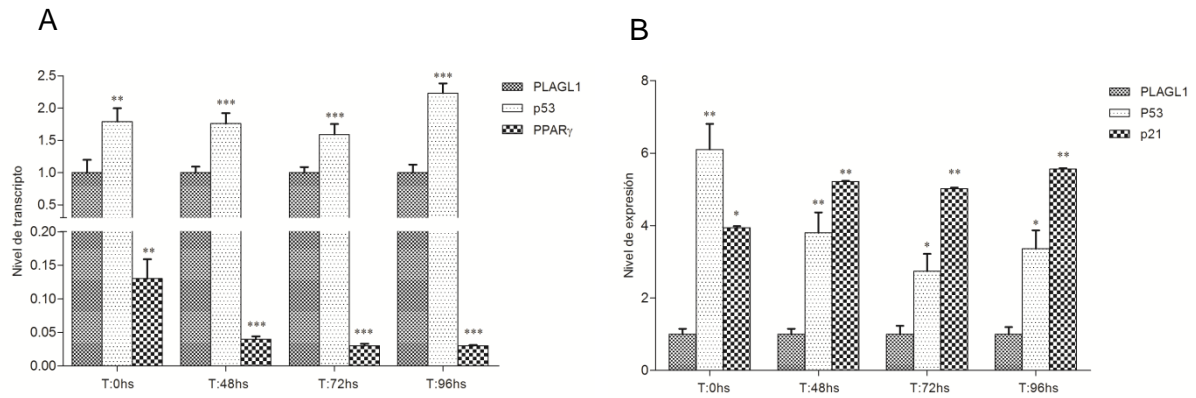


Fig. 21: Comparación del nivel de transcripción y expresión proteica entre genes en fibroblastos a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto a *PLAGL1* en los distintos puntos temporales al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripción de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

El estudio de la proliferación nos indica el aumento del número de células en unidad de tiempo y por lo tanto la velocidad con la que ocurre este proceso. Finalmente, también se estudió la capacidad migratoria de los fibroblastos mediante el ensayo de cierre de la brecha. Este test, consistente en medir la velocidad con la que la herida infringida sobre la capa de células que crecen adheridas a la placa de Petri se cierra, mostró que estas células normales cubren el espacio de la herida en 48hs (Fig. 22). La superficie medida en la brecha al inicio del experimento fue alrededor de  $1.4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  y a las 24hs se redujo un 53% ( $\sim 6.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ).

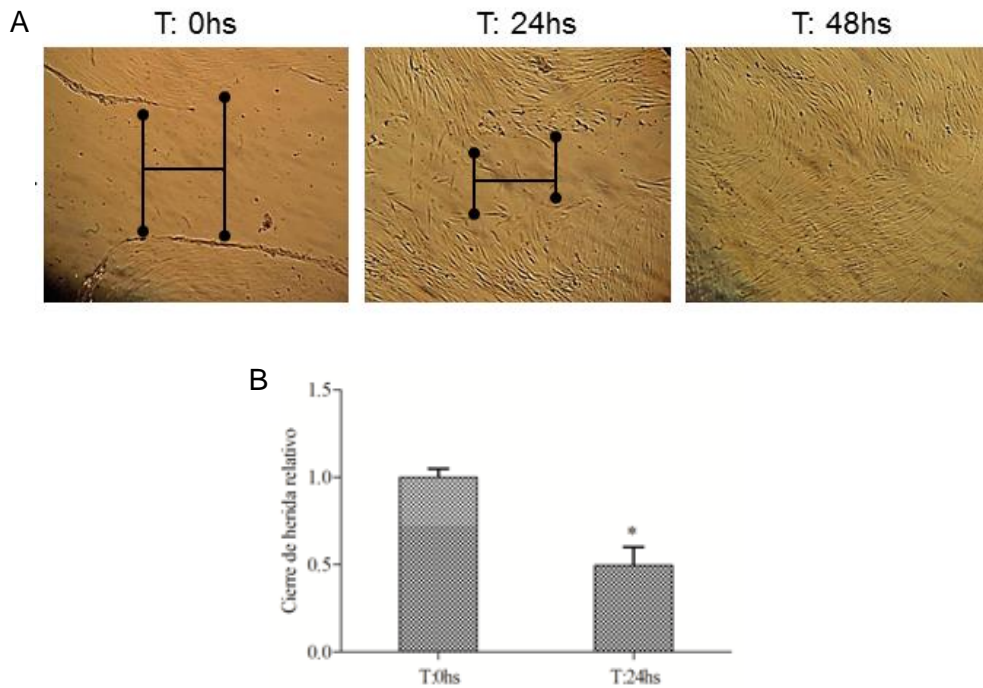


Fig. 22: Ensayo de migración de los fibroblastos a partir de dos experimentos independientes. A) Las imágenes muestran la disminución del ancho de la brecha realizada con una punta de pipeta de 200 $\mu$ l (p200) luego de 24 y 48hs. B) Gráficos de barras que representan la reducción relativa de la brecha respecto al T: 0hs. \*Diferencia significativa;  $p < 0.05$ .

### 5.3.2 Línea celular PLC/PRF/5

Entre las 4 líneas celulares de hepatoma incluidas en el sistema experimental, la línea PLC/PRF/5 presenta la mayor capacidad proliferativa. El crecimiento celular aumenta rápidamente después de establecidos los subcultivos, al punto que a las 72hs la cantidad de células es mayor al doble de las que se cuentan en el punto temporal anterior, mientras que a las 96hs el recuento celular arrojó un valor de  $4.0 \times 10^5$  cels/ml (Fig. 23). Aplicando la fórmula de crecimiento exponencial se obtuvo un TD= 23hs, una tasa de crecimiento  $k = 0.029$  y un factor  $R^2 = 0.885$ . En los distintos puntos temporales de la curva de proliferación también se calculó la viabilidad celular, la cual se mantuvo alrededor del 96%.



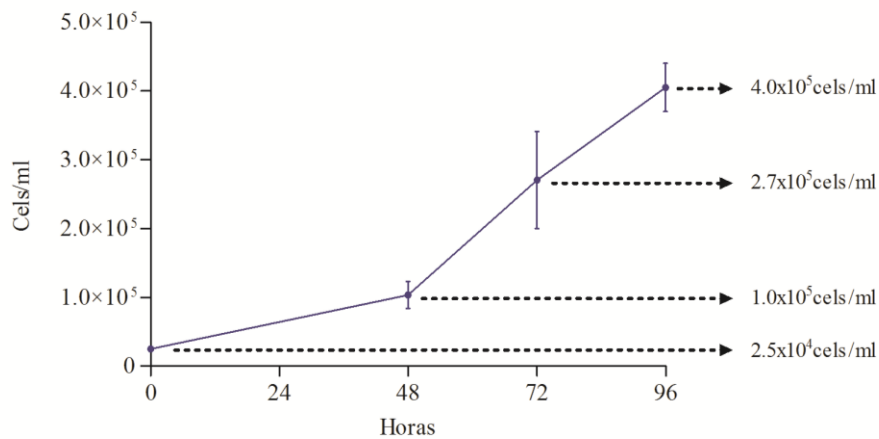


Fig. 23: Curva de proliferación de PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes.

Simultáneamente al recuento celular se determinó el porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular mediante citometría de flujo durante el ensayo de proliferación. Se observa que el porcentaje de células en fase G2/M se mantiene relativamente constante hasta las 48hs posteriores al comienzo del experimento y luego disminuye gradualmente hasta las 96hs a expensas de un incremento de la cantidad de células que permanecerían en G1 (Fig. 24).

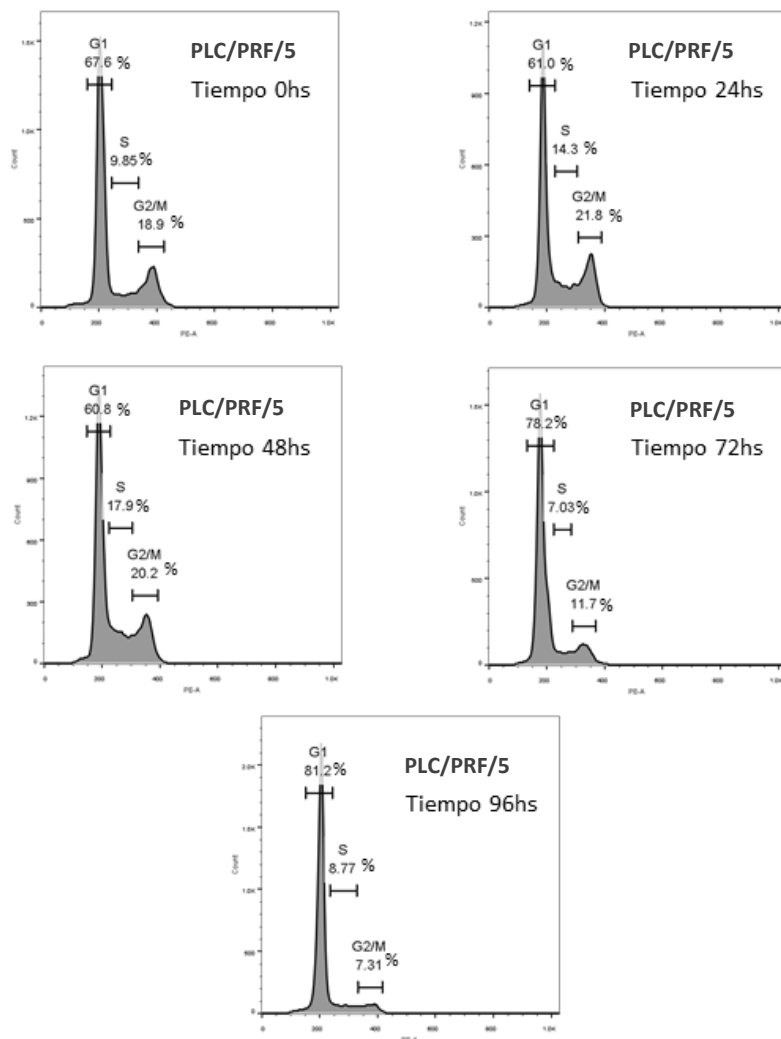


Fig. 24: Histogramas del ciclo celular de PLC/PRF/5 mediante citometría de flujo para cada punto temporal de la curva de proliferación. Este estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes.

De manera similar a lo efectuado sobre las muestras de fibroblastos obtenidas a diferentes tiempos durante proliferación, en las muestras de células tumorales se determinó el nivel de transcritos de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , como así también el nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21* mediante RT-qPCR y Western blot, respectivamente.

La línea tumoral PLC/PRF/5 exhibió cierto grado de uniformidad respecto del nivel de transcritos y expresión del gen *PLAGL1* a lo largo del experimento. En efecto el análisis estadístico demostró que no hay diferencias significativas entre los datos obtenidos para los diferentes puntos temporales (Fig. 25A, 25B

y 25C). Por el contrario, cuando las células son liberadas del bloqueo mediante la suplementación del medio nutritivo con 10% de SFB, se detectó que tanto el nivel de mRNA, como así también el de la proteína p53 disminuyen significativamente respecto del T: 0hs (Fig. 25A, 25B y 25C). Respecto de la expresión de la proteína p21 durante la proliferación de estas células tumorales, se determinó que esta disminuye, pero el análisis estadístico demostró que en comparación con el nivel de T: 0hs estas diferencias no son significativas (Fig. 25B y 25C). A partir del mismo ensayo de proliferación se estudió el nivel de mRNA de *PPAR $\gamma$*  mediante RT-qPCR y se encontró que este tipo celular transcribe significativamente menos en estado proliferativo que cuando se encuentran en condiciones de bajo porcentaje de SFB (T: 0hs) (Fig. 25A).

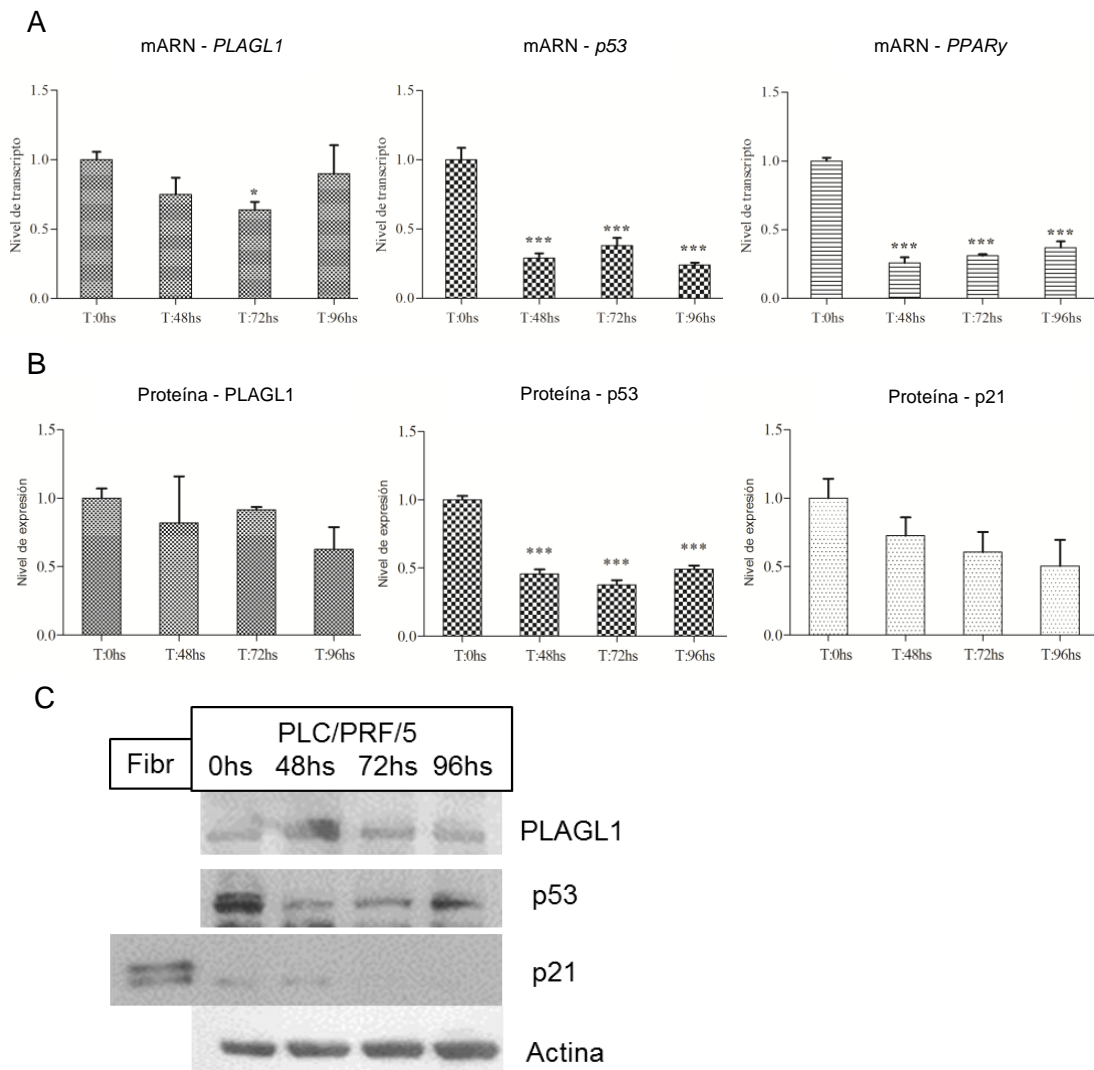


Fig. 25: Nivel de transcripción de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$*  y nivel de expresión proteica de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en PLC/PRF/5 durante proliferación a partir de dos experimentos

independientes. A) Nivel de transcripto de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y diferencias significativas expresados respecto del valor obtenido para el punto temporal T: 0hs. B) Nivel de expresión de *PLAGL1*, *p53* y *p21* y diferencias significativas expresados respecto del valor obtenido para el punto temporal T: 0hs. C) Western blot de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en los distintos puntos temporales. Dada la ausencia de señal con el anticuerpo anti-p21 en la células tumorales, se incluyó en el experimento un extracto proteico de fibroblastos como control de señal. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

El nivel de las proteínas *PLAGL1* y *p21* también se determinó in situ mediante inmunocitoquímica y los resultados de este análisis corroboraron los resultados de Western blot en que la expresión de estas en la línea tumoral PLC/PRF/5 es baja. Además, se demostró que la señal es citoplasmática (Fig. 26).

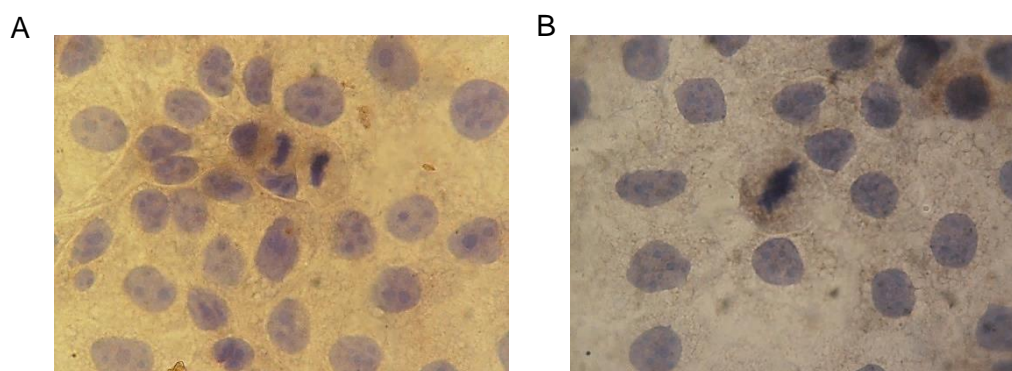


Fig. 26: Inmunodetección de las proteínas *PLAGL1* (A) y *p21* (B) en células PLC/PRF/5. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes. Aumento 100X.

También se compararon los niveles de transcripto y expresión entre los genes, tomando como calibrador *PLAGL1* T: 0hs, como se realizó para los fibroblastos. Este estudio mostró que el nivel de mRNA y de la proteína *p53* es superior durante los distintos tiempos de proliferación, existiendo diferencias significativas a las 0 y 72hs. El transcripto del gen *PPAR $\gamma$*  mantiene niveles similares a *PLAGL1*, excepto por el T: 0hs que es significativamente más elevado. Por último, la proteína *p21* exhibió niveles inferiores a *PLAGL1* T: 0hs, presentando diferencias significativas a las 96hs (Fig. 27). Las comparaciones de estos niveles de expresión también se realizaron respecto a *PLAGL1* en cada punto temporal respectivamente. El nivel de mRNA y de proteínas *p53* es

mayor a *PLAGL1* en cada tiempo de la curva de crecimiento, mientras que *PPAR $\gamma$*  y *p21* mostraron niveles inferiores o similares durante la proliferación, excepto *PPAR $\gamma$*  T: 0hs (Fig. 28).

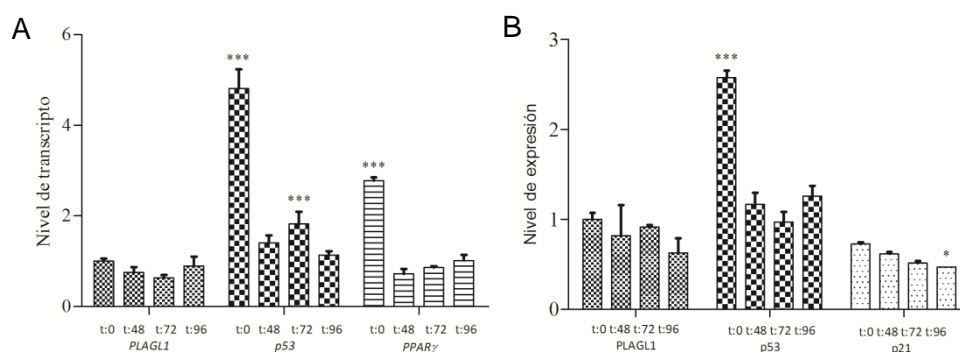


Fig. 27: Comparación del nivel de transcripto y expresión proteica entre genes en PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido para *PLAGL1* T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

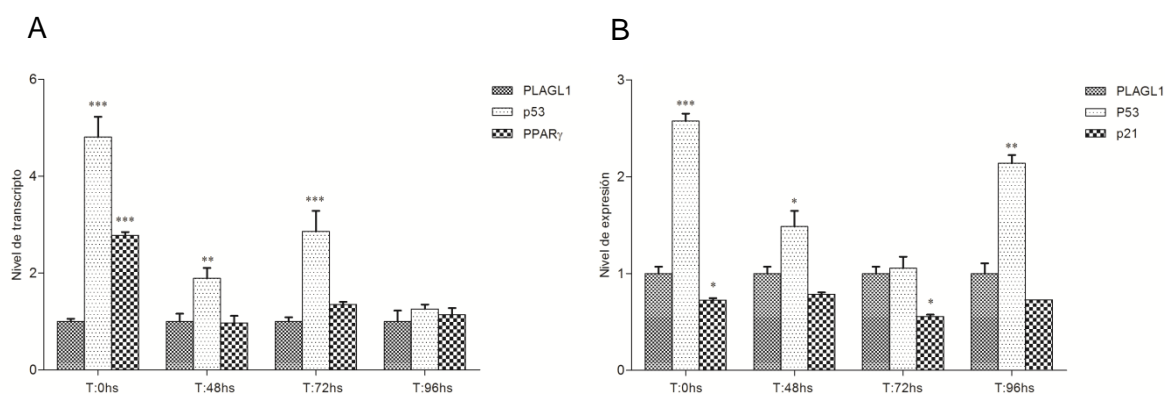


Fig. 28: Comparación del nivel de transcripto y expresión proteica entre genes en PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto a *PLAGL1* en los distintos puntos temporales al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

Finalmente, se evaluó la capacidad migratoria de las células PLC/PRF/5 en cultivo in vitro mediante el ensayo de cierre de la herida, de manera similar al

descrito para fibroblastos. Las células cubrieron la brecha infringida en la capa celular al cabo de 72hs en cultivo, es decir 24hs más que el tiempo empleado por los fibroblastos normales (Fig. 29). La cuantificación de la distancia o de la superficie cubierta por las células en función del tiempo y el análisis estadístico de estos datos permiten establecer que efectivamente hay una reducción estadísticamente significativa de esta medida recién a las 48hs (Fig. 29B). En este punto temporal el área medida en la brecha fue de  $\sim 2.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ , es decir que corresponde a un 20%, aproximadamente, de la superficie obtenida a T: 0hs ( $\sim 1.4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ).

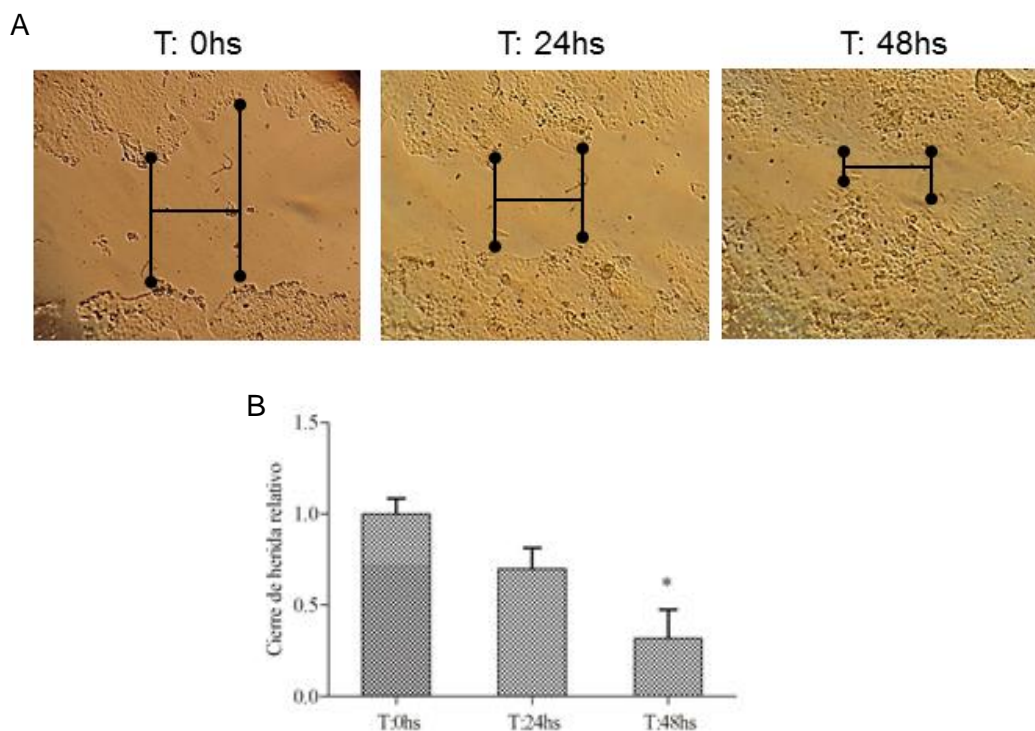


Fig. 29: Ensayo de migración de PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. A) Imágenes sucesivas obtenidas a las 0, 24 y 48hs luego de infringir la herida con un tip de 200 $\mu\text{l}$ . B) Los gráficos representan la reducción relativa de la misma y las diferencias significativas respecto al T: 0hs (inicio del experimento). \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

### 5.3.3 Línea celular HepG2

El ensayo de proliferación de las células HepG2 reveló que estas células tienen una capacidad proliferativa menor comparada con las células de la línea

PLC/PRF/5. En efecto, al momento de finalización del experimento (96hs) el recuento celular arrojó un valor de  $2.4 \times 10^5$  cels/ml, y el cálculo de TD para este tipo celular fue de 29hs, mientras que la tasa de crecimiento  $k$  de 0.024 y un  $R^2$  de 0.990 (Fig. 30). La viabilidad celular de HepG2 se mantuvo constante ( $\sim 92\%$ ), sin embargo la misma fue menor respecto a PLC/PRF/5.

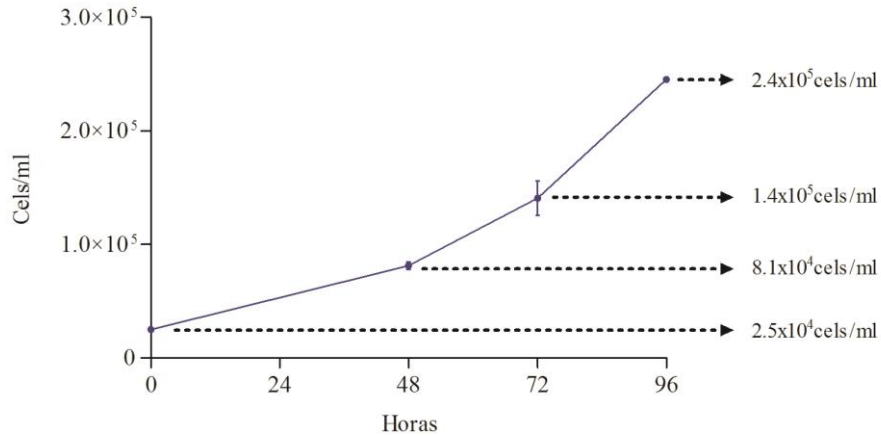


Fig. 30: Curva de proliferación de HepG2 a partir de dos experimentos independientes.

El análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo para esta línea tumoral reveló que el porcentaje de células en fase G2/M incrementa hasta las 48hs posteriores al comienzo del experimento y luego disminuye hasta las 96hs (final del experimento) (Fig. 31).

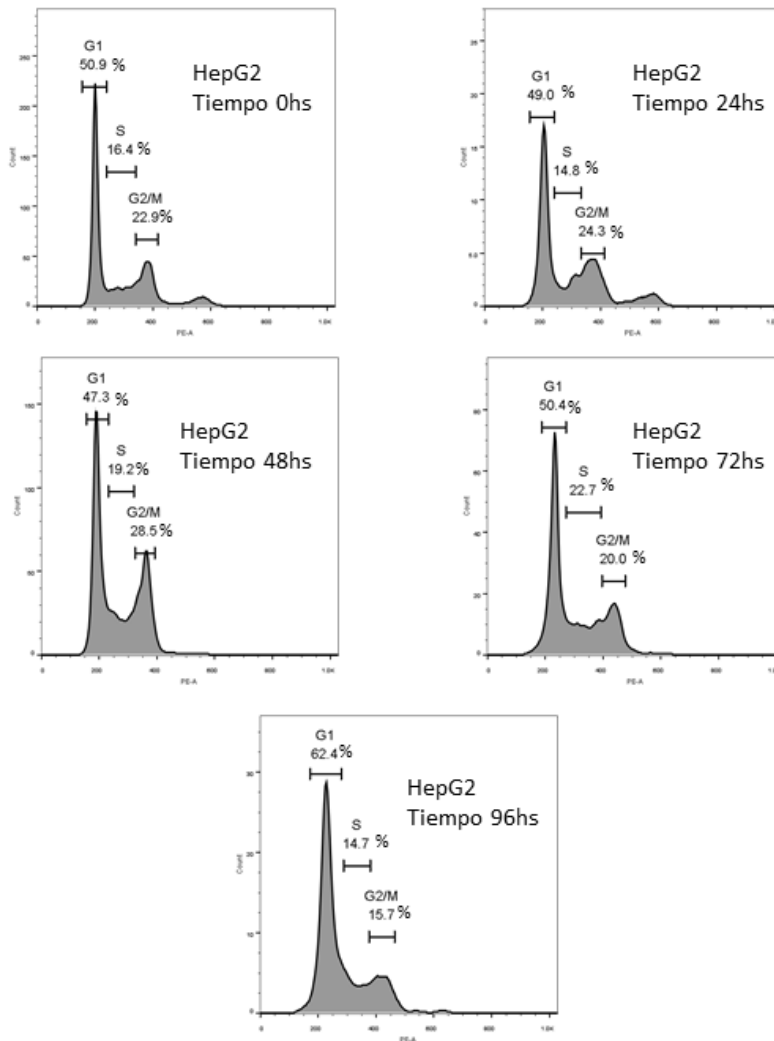


Fig. 31: Histogramas del ciclo celular de HepG2 mediante citometría de flujo para cada punto temporal de la curva de proliferación. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes.

El nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21* durante la proliferación fueron estudiados mediante RT-qPCR y Western blot, respectivamente. *PLAGL1* y *p53* exhibieron variaciones temporales en el nivel de mRNA durante la curva de crecimiento, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 32A). De la misma manera, la expresión de las proteínas *PLAGL1* y *p53* a lo largo de la curva de proliferación ocurre sin mostrar cambios estadísticamente significativos entre los puntos temporales (Fig. 32B y 32C). Respecto de la proteína *p21* se detectó un incremento transitorio estadísticamente significativo hacia las 48hs y luego una disminución a valores inclusive inferiores a los de



las células al comienzo del experimento (Fig. 32B y 32C). La determinación del estado del transcrito del gen *PPAR $\gamma$*  reveló que el nivel de mRNA de este gen disminuye durante la proliferación de estas células tumorales, es decir presenta un comportamiento similar al de los fibroblastos normales y PLC/PRF/5 (Fig. 32A).

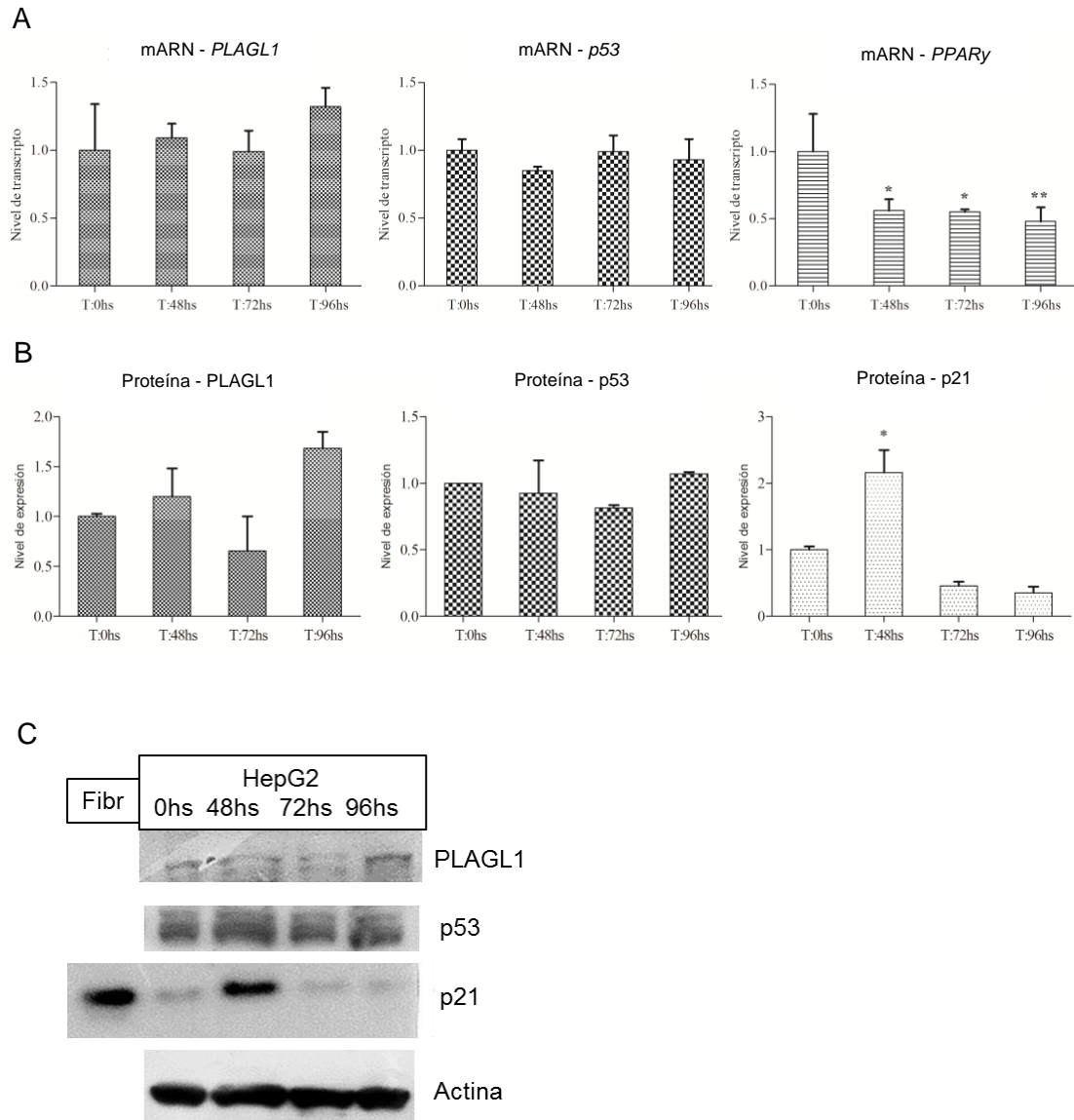


Fig. 32: Nivel de transcrito de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y nivel de expresión proteica de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en células HepG2 durante proliferación a partir de dos experimentos independientes. Los resultados y las diferencias significativas del estudio se expresan respecto de los datos obtenidos para T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcrito de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de *PLAGL1*, *p53* y *p21*. C) Western blot de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en los distintos puntos temporales. Para el anticuerpo anti-p21 se utilizó como control de

señal un extracto proteico de fibroblastos. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

El nivel de las proteínas PLAGL1 y p21 también se determinó in situ mediante inmunocitoquímica. Este análisis mostró, y concordante con los resultados de Western blot, que la expresión de PLAGL1 en la línea tumoral HepG2 es baja y fundamentalmente citoplasmática. Mientras que p21 a pesar de tener un nivel de expresión bajo, la proteína localiza tanto en citoplasma como en el núcleo (Fig. 33).

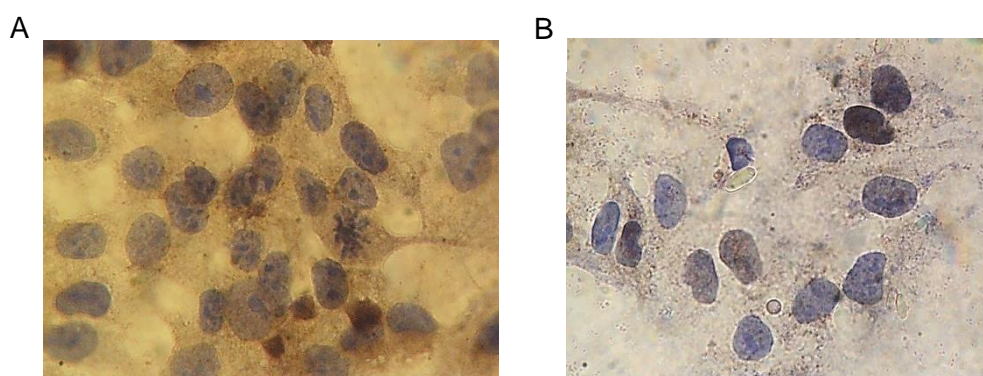


Fig. 33: Imágenes representativas de la inmunodetección de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en células HepG2. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes. Aumento 100X.

Luego, al igual que en la línea tumoral PLC/PRF/5, se compararon los niveles de transcripto y expresión entre los genes, y se graficaron tomando como calibrador *PLAGL1* T: 0hs. Este estudio mostró que el nivel de transcripto de *PPAR $\gamma$*  es similar a PLAGL1 durante la proliferación, mientras que p53 presenta la mayor concentración de mRNA. Por otro lado, se comparó el nivel de expresión de las proteínas PLAGL1, p53 y p21, y se determinó que la concentración de p53 mantiene niveles elevados respecto a los de las otras dos proteínas (Fig. 34). El análisis realizado respecto a PLAGL1 en cada punto temporal respectivo exhibió la misma relación de los niveles de mRNA y de proteínas a lo largo de la curva de proliferación (Fig. 35).

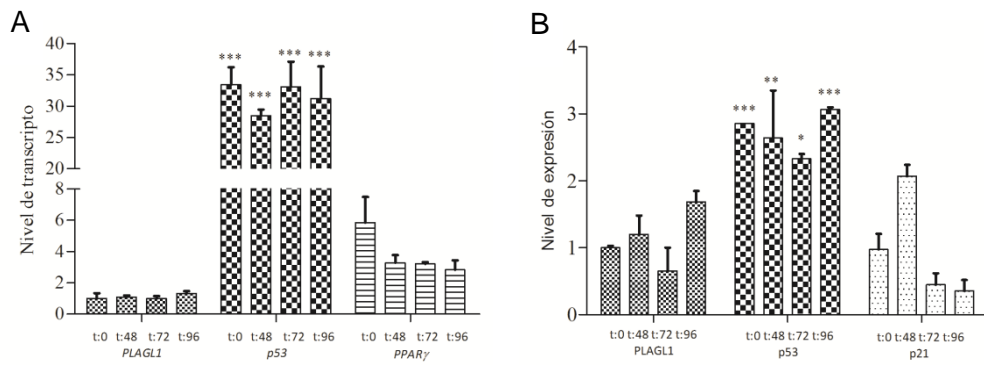


Fig. 34: Comparación del nivel de transcripción y expresión proteica entre genes en células HepG2 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido para *PLAGL1* T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripción de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

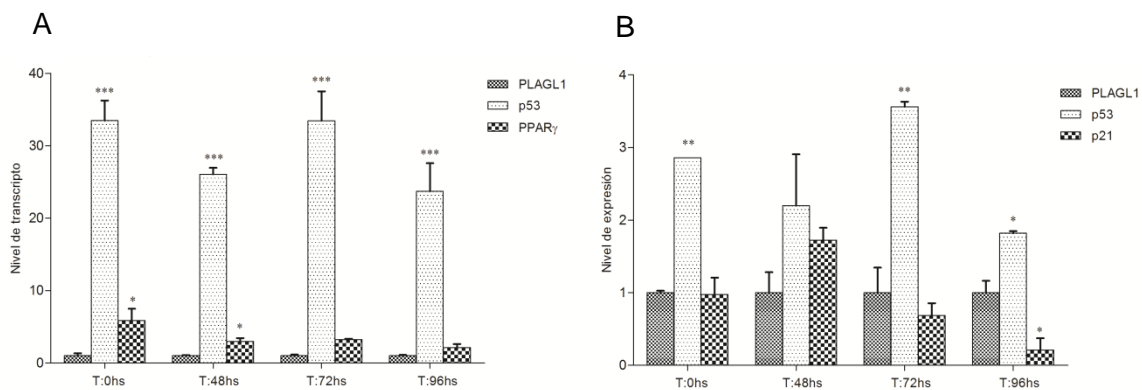


Fig. 35: Comparación del nivel de transcripción y expresión proteica entre genes en HepG2 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto a *PLAGL1* en los distintos puntos temporales al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripción de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

La capacidad migratoria de este tipo celular también fue estudiada a través del ensayo de cierre de herida. Este ensayo mostró que recién al cabo de 72hs el ancho de la herida infringida en la capa celular se redujo de manera estadísticamente significativa, sugiriendo una escasa capacidad de migración de esta línea tumoral (Fig. 36B). Esto se pudo observar a simple vista en las imágenes digitales y fue corroborado por el área medida en la brecha que varió

poco durante los distintos puntos temporales del experimento (T: 0hs:  $\sim 1.4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ; T: 24hs:  $\sim 1.2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ; T: 48hs:  $\sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) (Fig. 36A). Inclusive, aún después de una semana de mantener las células en cultivo la brecha continuó sin cerrarse completamente.

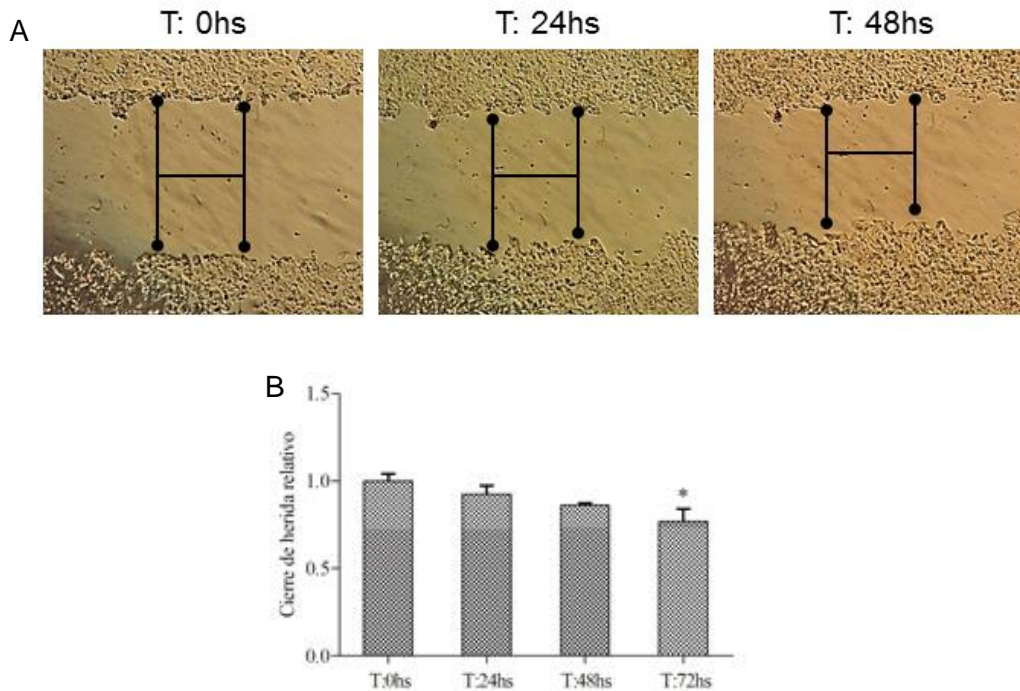


Fig. 36: Ensayo de migración de HepG2 a partir de dos experimentos independientes. A) Imágenes sucesivas obtenidas a las 0, 24 y 48hs luego de infringir la herida con un tip de 200 $\mu\text{l}$ . B) El gráfico de barras representa la reducción relativa de la misma y las diferencias significativas respecto al T: 0hs (inicio del experimento). \*Diferencias significativas respecto de T: 0hs;  $p < 0.05$ .

#### 5.3.4 Línea celular Huh7

La línea Huh7, como las otras líneas tumorales, exhibió una tasa de proliferación alta durante cultivo in vitro. Aún sin haber alcanzado el estado de confluencia en la placa de Petri, al cabo de 96hs el recuento en cámara hemocitométrica arrojó un valor de  $2.9 \times 10^5$  cels/ml y la aplicación de la fórmula de crecimiento exponencial reveló que estas células tienen un  $\text{TD} = 27\text{hs}$ , una tasa de crecimiento  $k = 0.025$  y un coeficiente  $R^2 = 0.960$  (Fig. 37). A partir del recuento en cámara hemocitométrica también se obtuvo el porcentaje de viabilidad en cada punto temporal, que fue similar en los distintos tiempos alrededor de 91%.

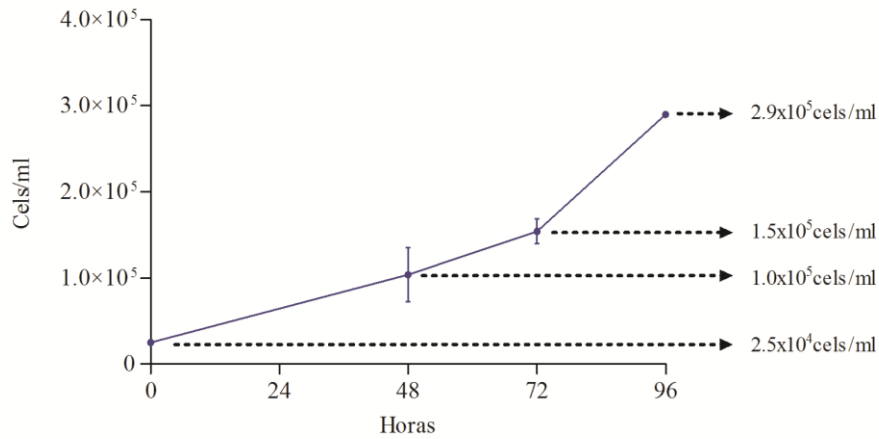


Fig. 37: Curva de proliferación de Huh7 a partir de dos experimentos independientes.

El estudio de ciclo celular mediante citometría de flujo de las muestras obtenidas de los distintos los puntos temporales del ensayo de proliferación, reveló que el porcentaje de células en fase G2/M y S aumenta a partir de las 48hs hasta las 72hs de cultivo donde se observa que alcanza picos de 20.7% y 20.8%, respectivamente. Luego, al final del experimento estas proporciones disminuyen y Huh7 alcanza un valor similar de células en G2/M respecto al T: 0hs (15.5%) (Fig. 38).

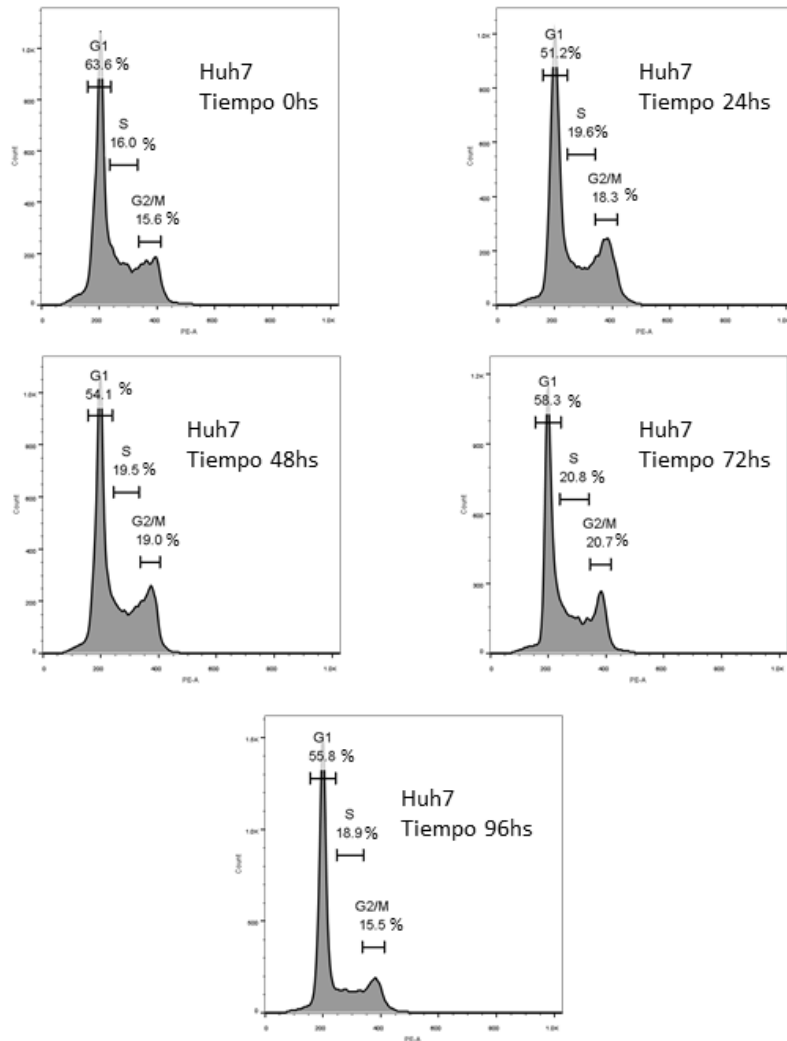


Fig. 38: Histogramas del ciclo celular de Huh7 mediante citometría de flujo para cada punto temporal de la curva de proliferación. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes.

El nivel de los transcritos de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21* durante la proliferación de estas células tumorales se realizó mediante RT-qPCR y Western blot, respectivamente. El análisis molecular mostró que la cantidad de mRNA de *PLAGL1*, y de la proteína que codifica este gen, se mantienen sin cambios estadísticamente significativos entre los puntos temporales del ensayo de crecimiento (Fig. 39A, 39B y 39C). Por el contrario el nivel del transcritos de *p53* aumenta significativamente a las 48hs y mantiene un nivel de transcripción elevado, inclusive mayor al determinado para T: 0hs, hasta la finalización del ensayo (Fig. 39A). A pesar

del alto nivel de mRNA de este gen, la expresión proteica no experimenta variaciones estadísticamente significativas (Fig. 39B y 39C). Respecto del gen *PPAR $\gamma$* , en esta línea tumoral se detectó una disminución significativa del nivel de su transcrito a las 48hs y luego un incremento hasta valores similares al T: 0hs al final del experimento (Fig. 39A). Finalmente, la proteína p21 no se pudo detectar mediante Western blot en ninguna de las muestras correspondientes a los distintos puntos temporales del ensayo de proliferación de la línea celular Huh7 (Fig. 39C).

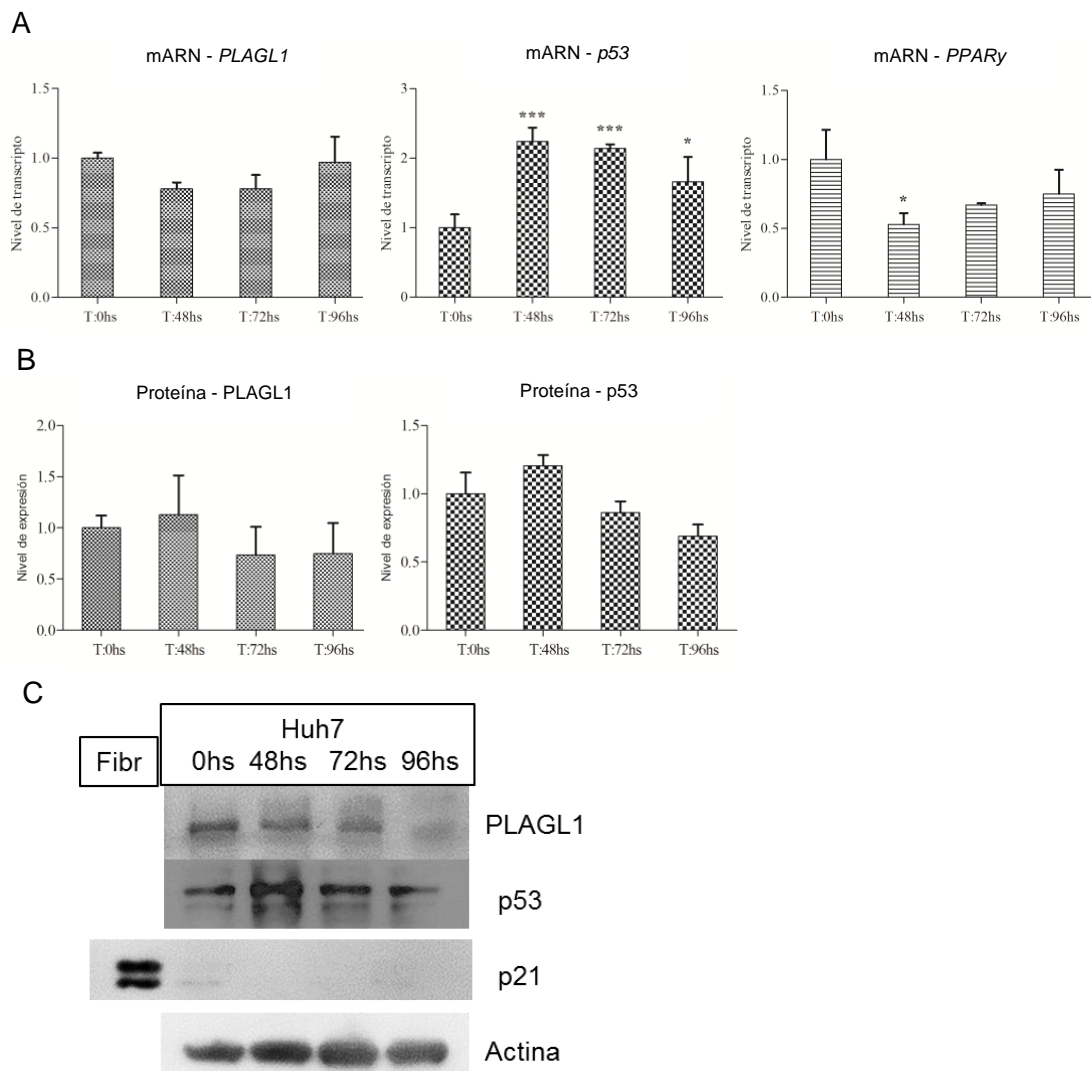


Fig. 39: Nivel de transcrito de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y nivel de expresión proteica de *PLAGL1* y *p53* en Huh7 durante proliferación a partir de dos experimentos independientes. Los resultados y las diferencias significativas del estudio se presentaron en gráficos de barras, relativizados con respecto de T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcrito de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de *PLAGL1* y *p53*. C) Western blot de *PLAGL1*,



p53 y p21 en los distintos puntos temporales. Para el anticuerpo anti-p21 se utilizó como control de señal un extracto proteico de fibroblastos. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

Los análisis mediante Western blot se complementaron con ensayos de inmunocitoquímica, con los mismos anticuerpos utilizados para Western blot. Estos experimentos confirmaron que la expresión de la proteína PLAGL1 en células Huh7 es sumamente baja y que la proteína p21 es indetectable (Fig. 40B). Respecto a PLAGL1, se observó que la expresión de la proteína es mayor en células que se encuentran en mitosis (Fig. 40A).

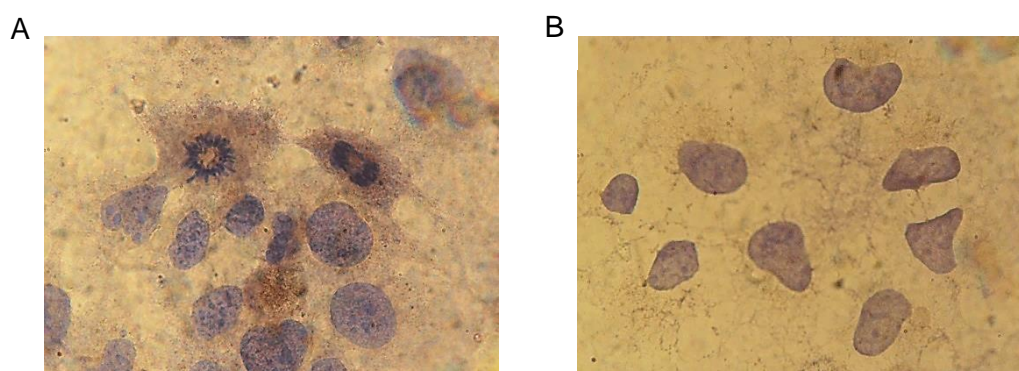


Fig. 40: Imágenes representativas de la inmunodetección de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en células Huh7. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes. Aumento 100X.

A continuación, se compararon los niveles de transcripción y expresión entre los genes respecto de *PLAGL1* T: 0hs. Este estudio mostró que *p53* y *PPAR $\gamma$*  exhiben una mayor cantidad de mRNA en comparación con *PLAGL1* T: 0hs y que estas diferencias son significativas. Mientras que los niveles de expresión proteica de p53 también son significativamente más elevados que los de PLAGL1, concordando con los resultados observados para sus transcritos (Fig. 41). El efector p21 no está incluido en este análisis ya que Huh7 no expresa niveles detectables de esta proteína, como fue mencionado previamente. La comparación de los niveles de expresión de mRNA y proteínas también se realizó respecto a PLAGL1 en cada punto temporal del experimento. Estos análisis mostraron que los niveles de p53 y PPAR $\gamma$  se



mantiene significativamente elevados durante la curva de crecimiento (Fig. 42).

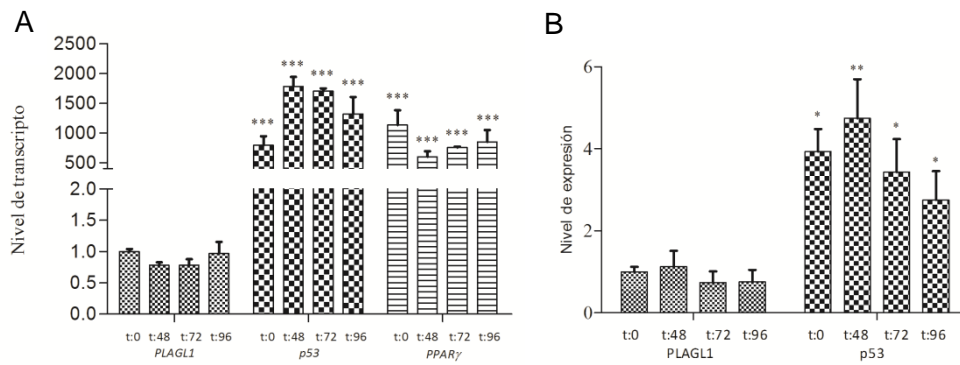


Fig. 41: Comparación del nivel de transcripto y expresión proteica entre genes en Huh7 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido para *PLAGL1* T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1* y *p53*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

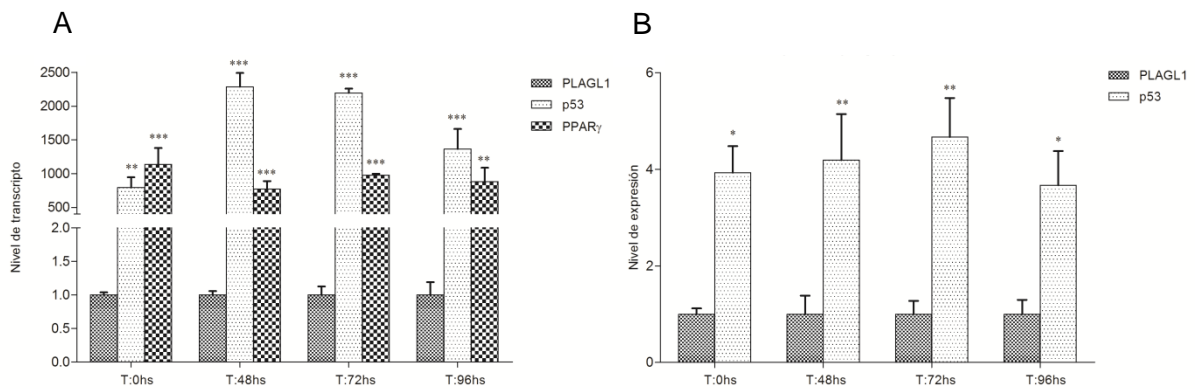


Fig. 42: Comparación del nivel de transcripto y expresión proteica entre genes en Huh7 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto a *PLAGL1* en los distintos puntos temporales al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripto de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

El ensayo de migración para la línea tumoral Huh7 reveló que estas células tienen alta capacidad migratoria. El área de la brecha medida al inicio del experimento ( $\sim 1.4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) se reduce significativamente a las 24hs

( $\sim 1.1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) y a las 72hs se cerró alrededor de un 77% el área de la herida (Fig. 43).

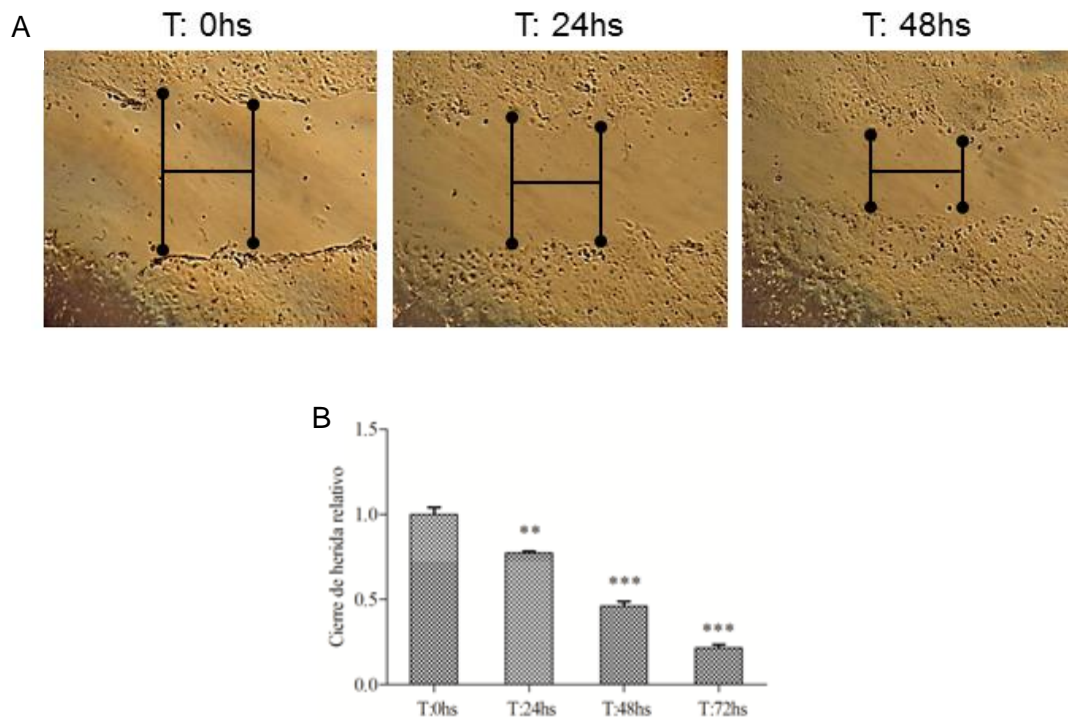


Fig. 43: Ensayo de migración de células Huh7 a partir de dos experimentos independientes. A) Las imágenes muestran la disminución del ancho de la herida luego de 24 y 48hs de haberla realizado. B) Los gráficos representan la reducción relativa de la brecha y las diferencias significativas respecto al T: 0hs (inicio del experimento). \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

### 5.3.5 Línea celular SkHep1

La línea tumoral SkHep1 exhibió una alta capacidad proliferativa, alcanzando  $3.3 \times 10^5$  cels/ml a las 96hs de cultivo (Fig. 44). De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la aplicación de la fórmula de crecimiento exponencial, SkHep1 presenta un TD= 26hs, una tasa de crecimiento  $k = 0.026$  y un coeficiente  $R^2 = 0.846$ . Mediante recuento celular también se obtuvo el porcentaje de viabilidad durante la proliferación que se mantuvo alrededor de 96%.

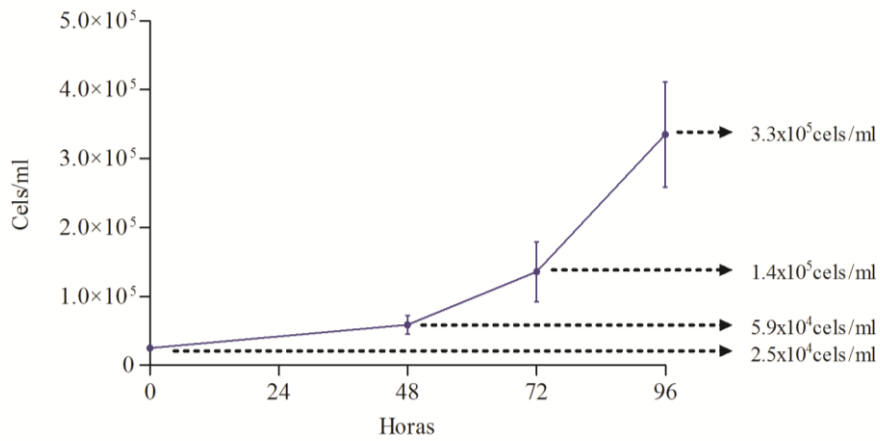


Fig. 44: Curva de proliferación de SkHep1 a partir de dos experimentos independientes.

Siguiendo el diseño experimental aplicado a las otras líneas tumorales, se estudió el ciclo celular mediante citometría de flujo. Este análisis reveló que el porcentaje de células en fase G2/M aumenta a partir de las 24hs y se mantiene elevado hasta las 72hs de cultivo. Al final del experimento (T: 96hs) esta línea tumoral alcanza confluencia y concordantemente un alto porcentaje de células se encuentran en G1 (Fig. 45).

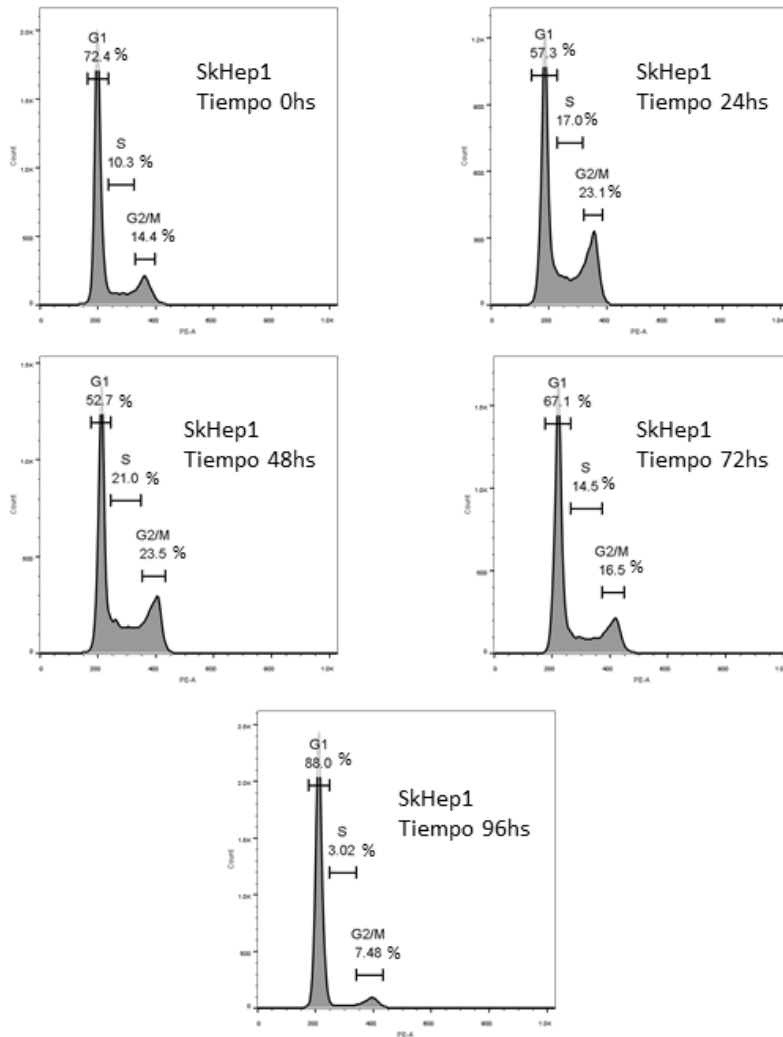


Fig. 45: Histogramas del ciclo celular de SkHep1 mediante citometría de flujo para cada punto temporal de la curva de proliferación. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes.

Se estudió el nivel de transcripto de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y el nivel de expresión de *PLAGL1*, *p53* y *p21* mediante RT-qPCR y Western blot, y los datos se presentan en relación de los mismos a T: 0hs. En lo que respecta al nivel de mRNA de *PLAGL1*, se detectó una disminución estadísticamente significativa a las 48 y 72hs de iniciados los experimentos de proliferación. Sin embargo, la expresión de la proteína codificada por este gen muestra un patrón ligeramente diferente; la disminución del nivel de transcripto a las 48hs es acompañada con una disminución significativa del nivel proteico, pero no ocurre lo mismo a las 72hs. Por el contrario a las 96hs se detectó un descenso marcado en el nivel de la proteína respecto del T: 0hs sin que haya habido una

disminución estadísticamente significativa del nivel de transcripto (Fig. 46A, 46B y 46C). Respecto del estudio del nivel de transcripto de *p53*, no se observaron cambios estadísticamente significativos cuando se compara los datos con el valor obtenido a T: 0hs. Por otro lado, la expresión proteica presenta variaciones cuantitativas importantes durante el ensayo de proliferación (Fig. 46A, 46B y 46C), que son acompañados de niveles de expresión de *p21* significativamente altos a partir de las 48hs de cultivo y hasta el final del experimento (Fig. 46B y 46C). Coincidentemente con lo obtenido para las otras líneas celulares tumorales, excepto Huh7, el nivel de transcripto de *PPAR $\gamma$*  en esta línea permanece uniformemente bajo durante la proliferación celular en comparación al T: 0hs (Fig. 46A).

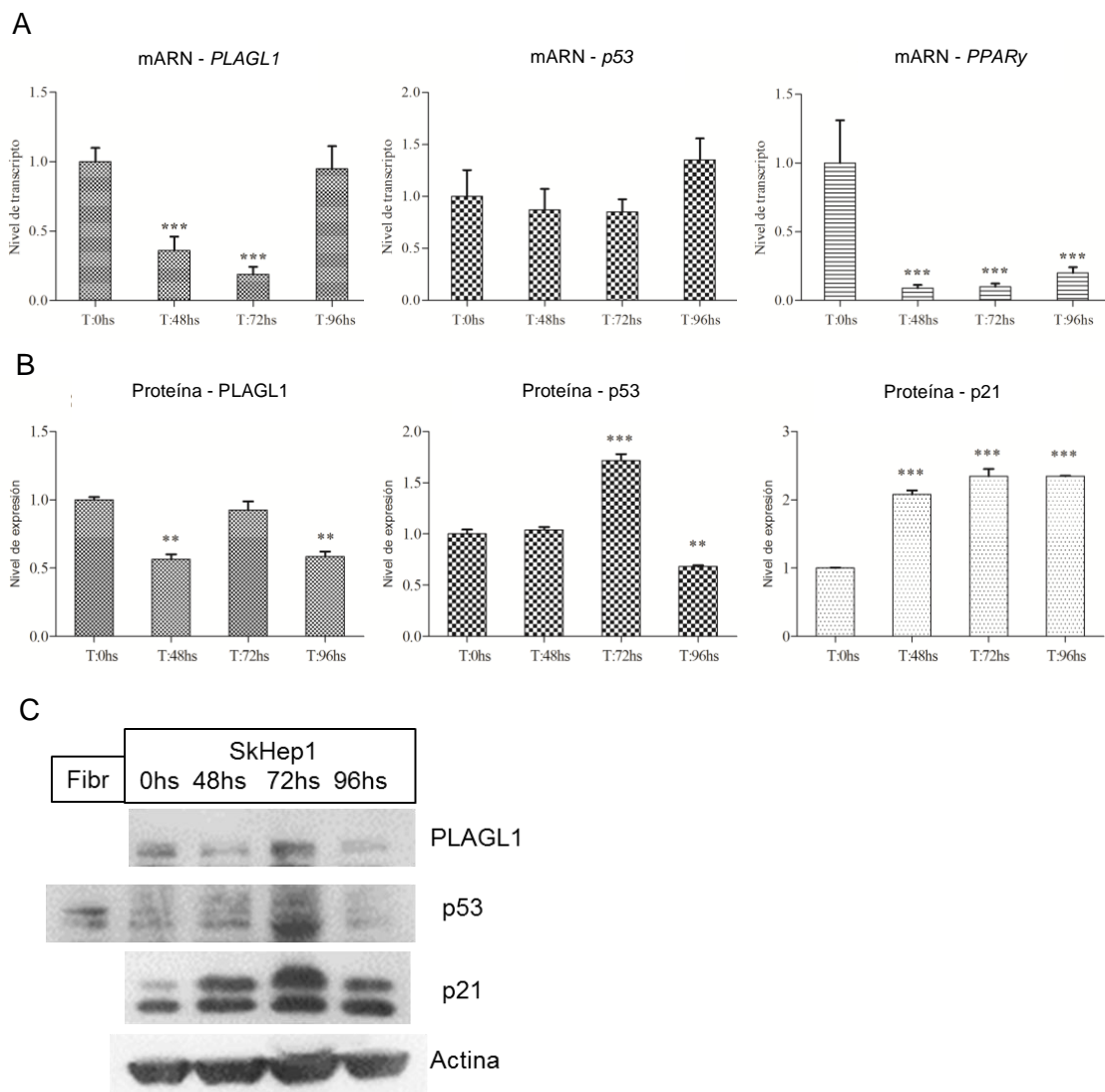


Fig. 46: Nivel de transcripto de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* , y nivel de expresión proteica de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en SkHep1 durante proliferación a partir de dos experimentos

independientes. Los resultados y las diferencias significativas del estudio se presentaron en gráficos de barras, relativizados con respecto de T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcritos de *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de *PLAGL1*, *p53* y *p21*. C) Western blot de *PLAGL1*, *p53* y *p21* en los distintos puntos temporales. Para el anticuerpo anti-*p53* se utilizó como control de señal un extracto proteico de fibroblastos. Las dobles bandas observadas corresponden a isoformas detectadas por los anticuerpos. El anticuerpo anti-actina se usó como control de carga. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

La expresión de *PLAGL1* y *p21* se investigó también in situ mediante inmunocitoquímica. Este análisis reveló una gran heterogeneidad en término de expresión de estas proteínas entre las células. Además se observó que en todas las células con tinción positiva para *PLAGL1*, la marca se detectó solamente en el citoplasma. Mientras que este mismo análisis efectuado con el anticuerpo contra la proteína *p21* reveló que la proteína en estas células tiene expresión citoplasmática y nuclear (Fig. 47).

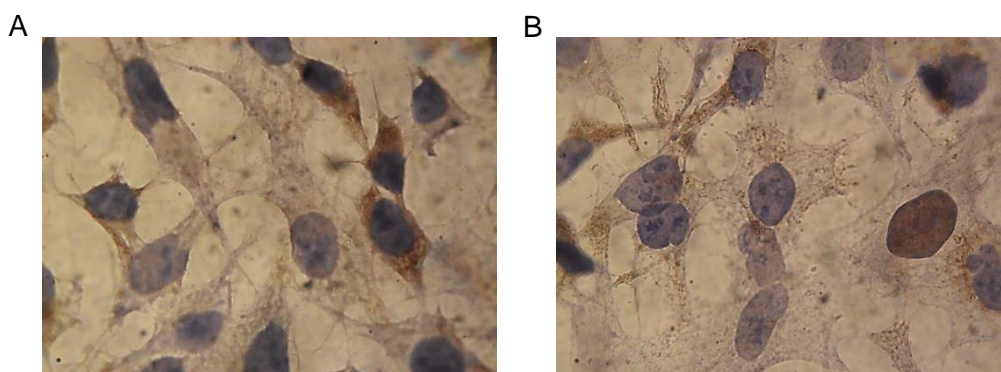


Fig. 47: Imágenes representativas de la inmunodetección de las proteínas *PLAGL1* (A) y *p21* (B) en células SkHep1. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes. Aumento 100X.

Con el objeto de complementar estos análisis, se compararon los niveles de transcritos y expresión entre los genes con los de *PLAGL1* a T: 0hs. Estos estudios mostraron que la cantidad de mRNA de *p53* y *PPAR $\gamma$*  en los distintos puntos temporales es significativamente más elevada que los transcritos de *PLAGL1*. Sin embargo, los niveles de expresión proteica de *p53* y *PLAGL1* son similares y sólo se observan diferencias significativas entre algunos tiempos de

la curva de crecimiento. Mientras que los valores de expresión de p21 durante la proliferación son significativamente mayores respecto a *PLAGL1* T: 0hs (Fig. 48). Estas comparaciones también se hicieron respecto a *PLAGL1* en cada punto temporal, lo que reflejó que el nivel de mRNA de *p53* es significativamente mayor, mientras que su proteína mantiene niveles similares durante el ensayo. Los niveles de *PPAR $\gamma$*  y p21 se comportan de la misma manera que en la comparación con *PLAGL1* T: 0hs (Fig. 49).

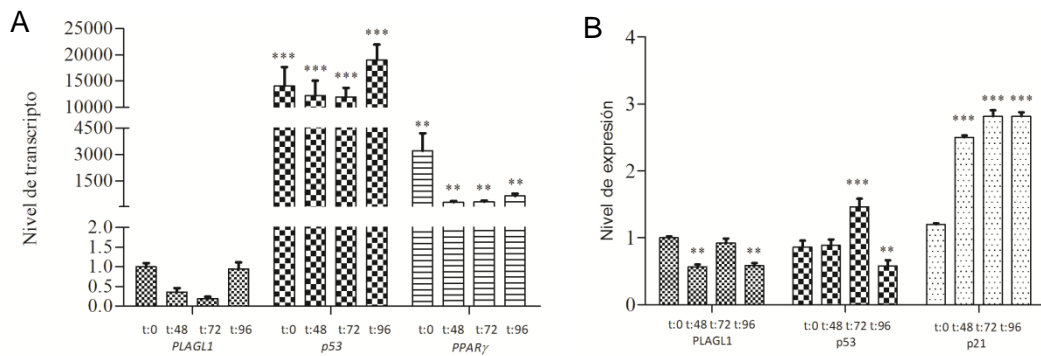


Fig. 48: Comparación del nivel de transcritpo y expresión proteica entre genes en SkHep1 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se analizaron respecto del valor obtenido para *PLAGL1* T: 0hs al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcritpo de los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPAR $\gamma$* . B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

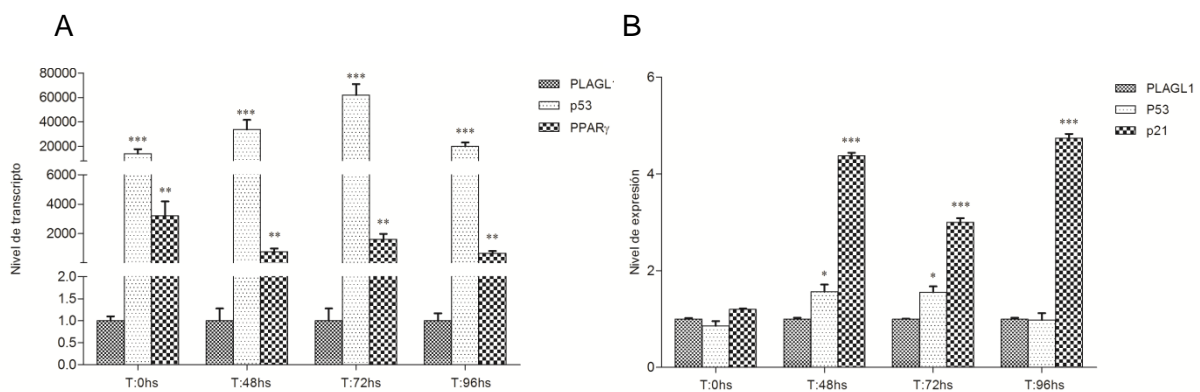


Fig. 49: Comparación del nivel de transcritpo y expresión proteica entre genes en SkHep1 a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se analizaron respecto a *PLAGL1* en los respectivos puntos temporales al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcritpo de



los genes *PLAGL1*, *p53* y *PPARy*. B) Nivel de expresión de las proteínas *PLAGL1*, *p53* y *p21*. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

La capacidad migratoria de las células SkHep1 se investigó mediante el ensayo de cierre de la brecha. El área de la misma se redujo un 65% a las 24hs ( $\sim 5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) respecto al T: 0hs ( $\sim 1.4 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ). Este estudio mostró que esta línea presenta una capacidad migratoria similar a la de los fibroblastos, cubriendo el espacio de la herida a las 48hs (Fig. 50).

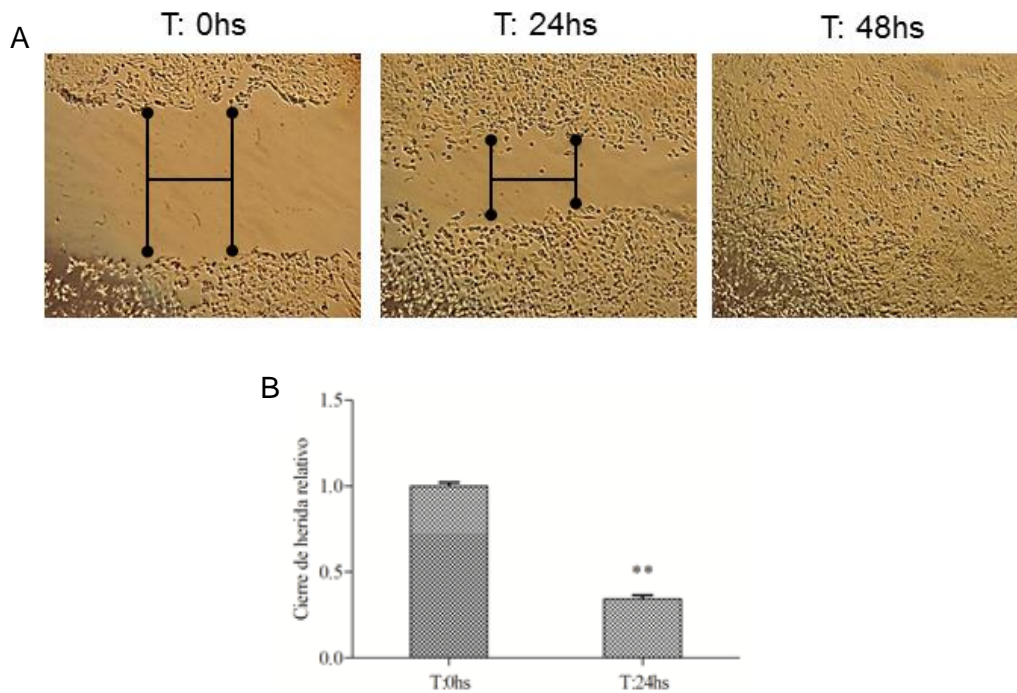


Fig. 50: Ensayo de migración de SkHep1 a partir de dos experimentos independientes. A) Las imágenes muestran la marcada disminución del ancho de la herida después de 24hs de iniciado el experimento. B) Los gráficos representan la reducción relativa de la misma y las diferencias significativas respecto a T: 0hs (inicio del experimento). \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

#### 5.4 Nivel de transcriptos (*PLAGL1*, *p53* y *PPARy*) y nivel de expresión (*PLAGL1*, *p53* y *p21*) entre las líneas celulares

Los niveles de transcriptos y expresión proteica se compararon entre todas las líneas celulares, incluyendo la de fibroblastos no tumorales, con el objeto de conocer si la cantidad de mRNA de *PLAGL1* y su proteína se encuentra reducida en tumores hepáticos respecto a células normales, como fue



demostrado para otros tipos de cánceres (Vieria Neto *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Por un lado, el nivel de transcritos de *PLAGL1* es significativamente menor en todas las líneas tumorales, teniendo en cuenta como calibrador los fibroblastos en cada punto temporal (respectivo). El nivel de mRNA en las líneas SkHep1 y Huh7 es despreciable al compararlo con el de fibroblastos. Mientras que las líneas PLC/PRF/5 y HepG2 presentan un nivel más elevado respecto a las otras dos líneas tumorales, pero este no supera el 20% del nivel de transcritos detectado en fibroblastos (Fig. 51A). Por otro lado, el nivel de expresión proteica de *PLAGL1* es menor en las líneas tumorales en todos los puntos temporales respecto a fibroblastos, excepto por PLC/PRF/5 y SkHep1 al inicio del experimento (T: 0hs). Sin embargo, estas diferencias no son significativas (Fig. 51B).

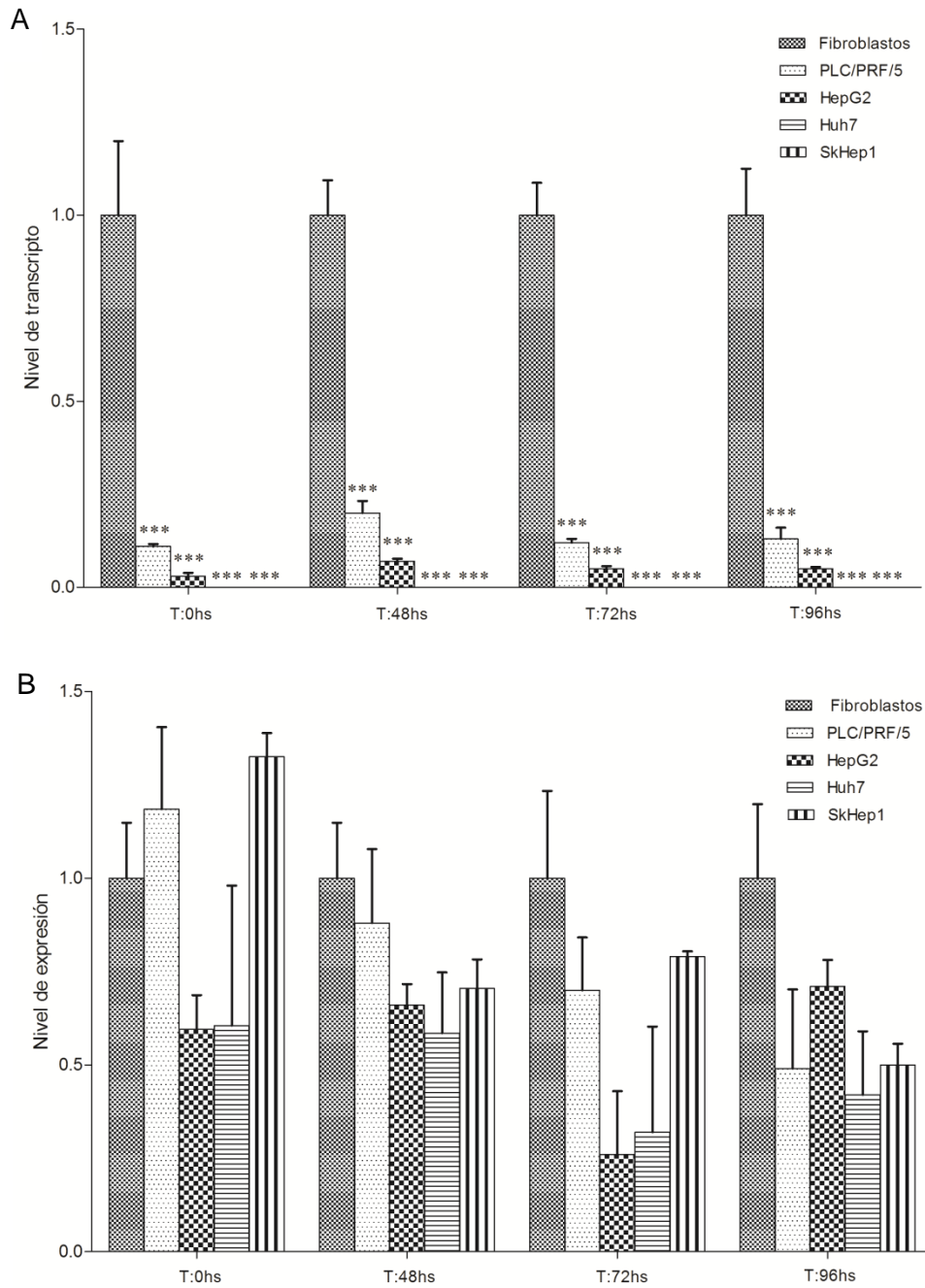


Fig. 51: Comparación del nivel de transcripto y expresión proteica de *PLAGL1* entre las líneas celulares: Fibroblastos, PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1, a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido en fibroblastos para *PLAGL1* en cada punto temporal (0, 48, 72 y 96hs), al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripto de *PLAGL1* durante la proliferación. B) Nivel de expresión de la proteína *PLAGL1* durante la proliferación. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

Esta comparación también se realizó para el nivel de transcripción y expresión de *p53*. La cantidad de mRNA de este gen es menor en las líneas tumorales comparado con fibroblastos en cada punto temporal, a excepción de HepG2 y Huh7 a las 48 y 72hs donde no se detectan diferencias significativas con el calibrador (Fig. 52A). Asimismo, la expresión proteica en Huh7 a las 48hs exhibe niveles similares a las células normales y no se observan diferencias significativas a las 72hs. Sin embargo, en las restantes líneas tumorales los valores de la proteína p53 son significativamente menores en todos los puntos temporales respecto a los fibroblastos (Fig. 52B).

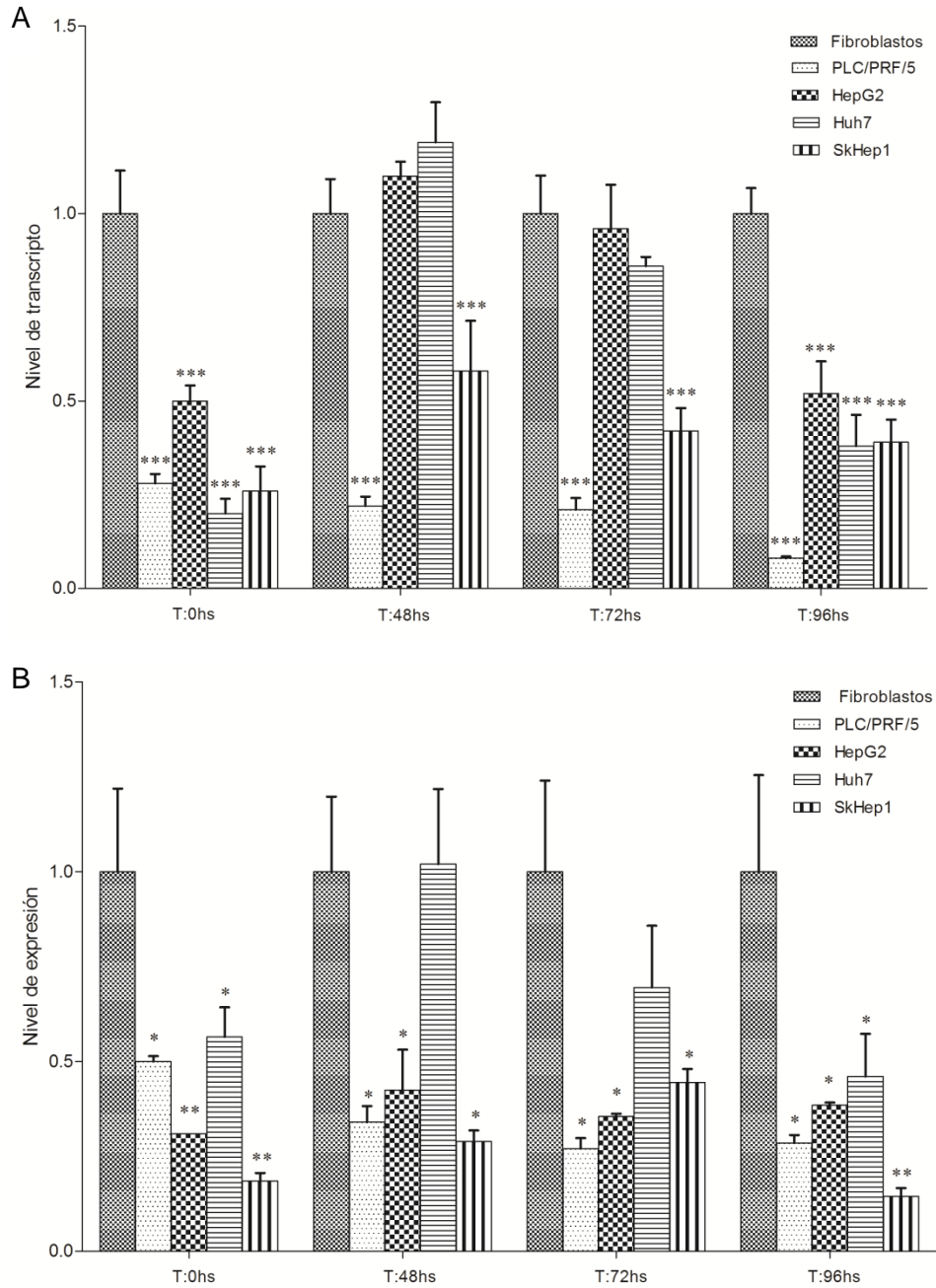


Fig. 52: Comparación del nivel de transcripción y expresión proteica de *p53* entre las líneas celulares: Fibroblastos, PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1, a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido en fibroblastos para *p53* en cada punto temporal (0, 48, 72 y 96hs), al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). A) Nivel de transcripción de *p53* durante la proliferación. B) Nivel de expresión de la proteína *p53* durante la proliferación. \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

Se continuó con el análisis del nivel de transcritpo de *PPAR $\gamma$*  entre las líneas celulares durante la proliferación. Principalmente, resalta el elevado y significativo nivel de mARN en Huh7 en todos los puntos temporales de la curva de crecimiento, especialmente a partir de las 48hs de cultivo. También se observaron diferencias significativas entre las líneas tumorales PLC/PRF/5, HepG2 y Huh7 respecto a los fibroblastos (Fig. 53).

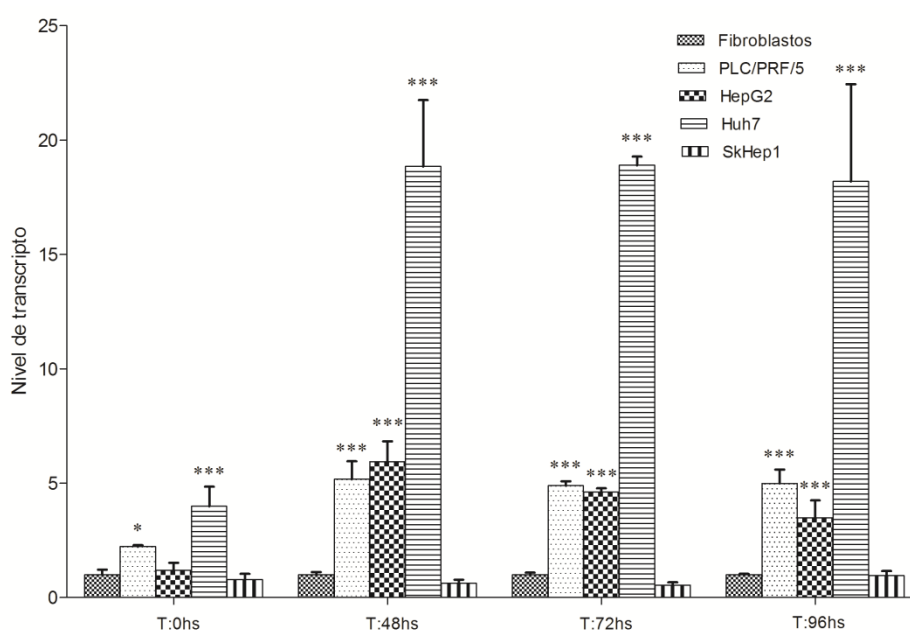


Fig. 53: Comparación del nivel de transcritpo de *PPAR $\gamma$*  entre las líneas celulares: Fibroblastos, PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1, a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido en fibroblastos para *PPAR $\gamma$*  en cada punto temporal (0, 48, 72 y 96hs), al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

Para concluir con estos análisis, se comparó el nivel de expresión proteica del efector p21 entre las líneas celulares durante la proliferación. El mismo es significativamente mayor en fibroblastos respecto a las líneas tumorales en todos los puntos temporales de la curva de crecimiento. Entre las líneas de hepatoma, SkHep1 presenta el mayor nivel de expresión. La línea tumoral Huh7 no se incluye en este estudio debido a la ausencia constitutiva de la proteína p21 (Fig. 54).

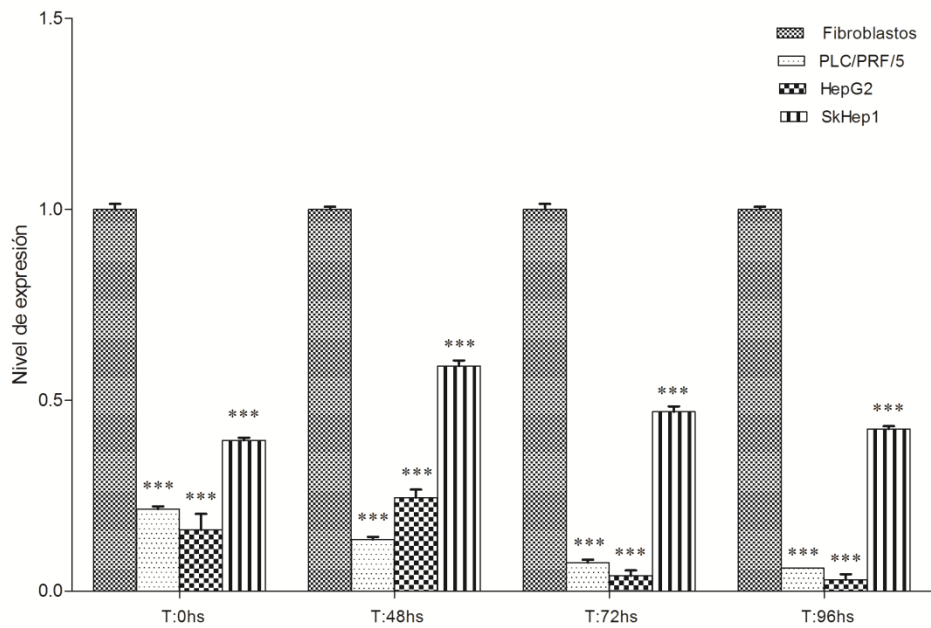


Fig. 54: Comparación del nivel de expresión proteica de p21 entre las líneas celulares: Fibroblastos, PLC/PRF/5, HepG2 y SkHep1, a partir de dos experimentos independientes. Los datos y las diferencias significativas se expresaron respecto del valor obtenido en fibroblastos para p21 en cada punto temporal (0, 48, 72 y 96hs), al cual se le asignó un valor = 1 (calibrador del experimento). \*Diferencias significativas;  $p < 0.05$ .

## 5.5 Sobreexpresión del gen *PLAGL1*

La proteína codificada por el gen *PLAGL1* interacciona con p53 y este heterodímero regula la transcripción del efector p21 por unión a los elementos de respuesta de su promotor (Huang *et al.*, 2001). Sin embargo, *PLAGL1* puede actuar independientemente de p53 formando complejos Sp1-*PLAGL1* o interactuando con AP-1, y de este modo regula la transcripción de p21 al unirse a los elementos de respuesta de su promotor (Liu *et al.*, 2011). Con el objetivo de elucidar la actividad de *PLAGL1* en hepatomas se realizaron estudios de sobreexpresión de esta proteína mediante ensayos de transfección en las líneas tumorales PLC/PRF/5 y HepG2.

### 5.5.1 Sobreexpresión del gen *PLAGL1* en células PLC/PRF/5

Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobreexpresión de *PLAGL1* se realizaron dos ensayos de transfección en la línea tumoral PLC/PRF/5, que presenta una de las mutaciones más comunes del gen *p53*, R249S (Gouas *et al.*, 2010). Una vez transcurridas las 72hs de cultivo (considerado T: 0hs en este ensayo de transfección), las células se incubaron con 10µg de plásmido y 8µl de lipofectamina de acuerdo al protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. La eficiencia de la transfección se expresó como el promedio del número de células transfectadas en 10 campos microscópicos (60X). Este análisis mostró una eficiencia del 10% en la transfección en PLC/PRF/5 (Fig. 55). A pesar de esta aparentemente baja eficiencia de transfección pudimos determinar que el nivel de la proteína, medido por Western blot, fue significativamente mayor, aproximadamente el doble, al del obtenido en las muestras no transfectadas (Fig. 56).

También se investigó, a partir de los extractos proteicos, el nivel de expresión de la proteína p21 mediante Western blot, este análisis mostró que la expresión de la misma no se modificó por el nivel de sobreexpresión que alcanzó *PLAGL1* en este punto temporal (30hs postransfección) (Fig. 56).

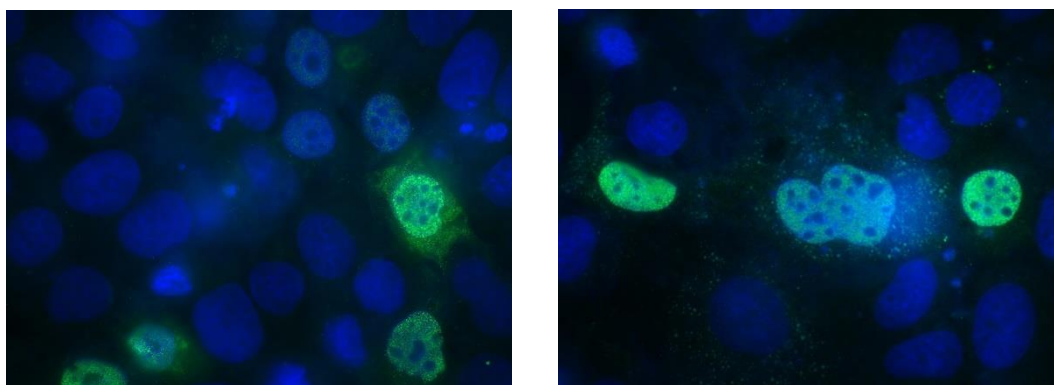


Fig. 55: Estudio de sobreexpresión de la proteína *PLAGL1* en PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. Inmunofluorescencia de células transfectadas con anticuerpo anti-*PLAGL1* y anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (verde).

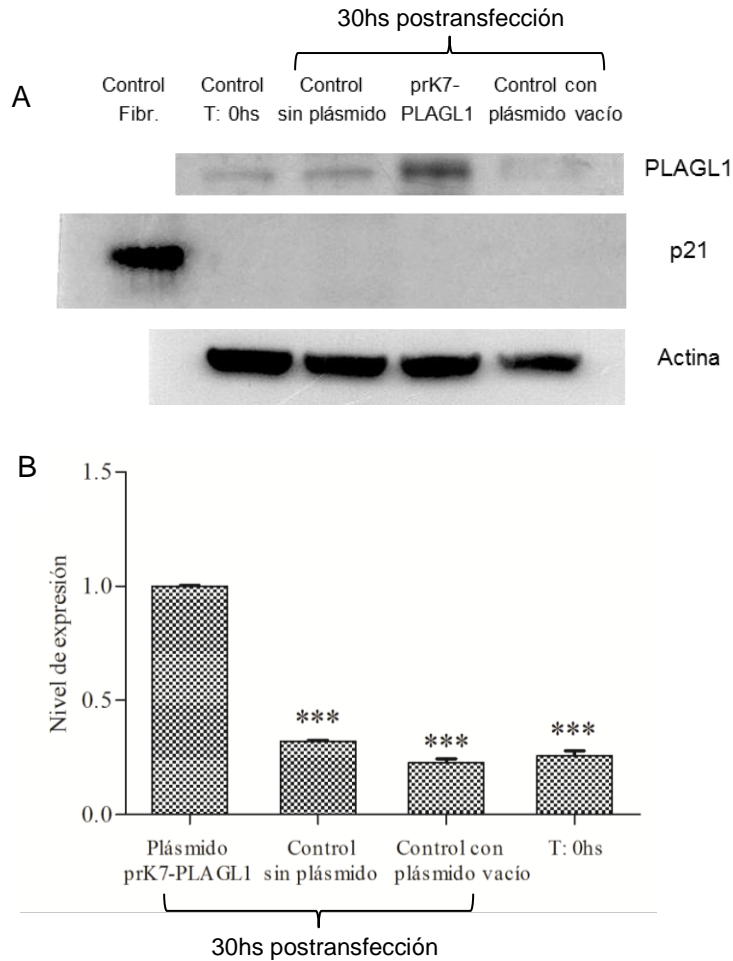


Fig. 56: Estudio de sobreexpresión de la proteína PLAGL1 en PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. A) Western blot de PLAGL1 y p21 de los siguientes extractos proteicos: control T: 0hs, control sin plásmido, células transfectadas con el plásmido prK7-PLAGL1, control con plásmido vacío. Para el anticuerpo anti-p21 se utilizó como control de señal un extracto proteico de fibroblastos. B) Comparación del nivel de expresión de PLAGL1 de las células transfectadas con el plásmido prK7-PLAGL1 respecto de los controles: T: 0hs; control sin plásmido y control con plásmido vacío. Note que la cuantificación de p21 no se realizó porque no se visualizó su banda mediante Western blot. \*Diferencias significativas respecto al nivel de expresión de PLAGL1 de las células transfectadas con el plásmido prK7-PLAGL1;  $p < 0.05$ .

Estos datos son consistentes con los del análisis por inmunofluorescencia, que efectivamente no revelan aumento de la expresión de la proteína p21 en las células transfectadas (Fig. 57).



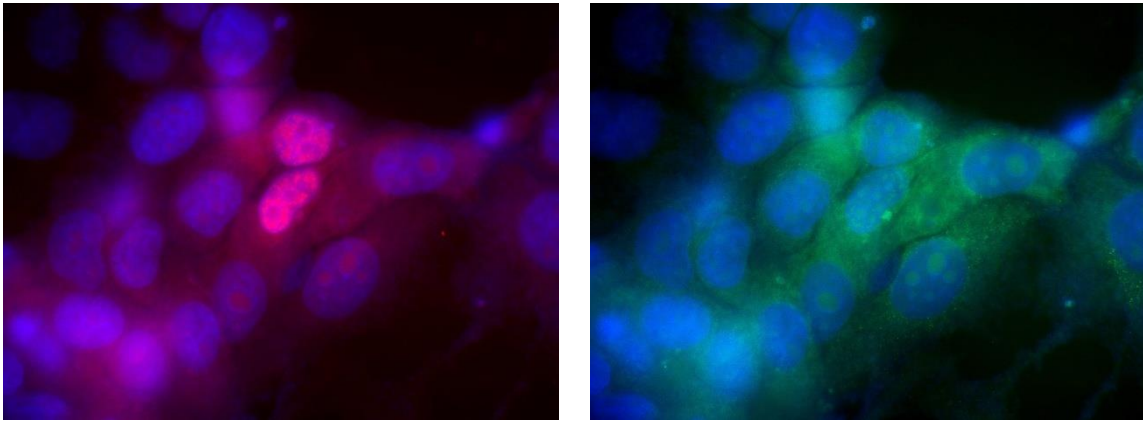


Fig. 57: Estudio de sobreexpresión de la proteína PLAGL1 en PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. Inmunofluorescencia de células transfectadas con anticuerpo anti-PLAGL1 y anti-p21, revelados con anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 546 (rojo) y Alexa Fluor 488 (verde), respectivamente.

Para investigar si la sobreexpresión de PLAGL1 influye en la capacidad proliferativa de estas células tumorales, se realizó el recuento celular y se observó que la proliferación de las células sujetas a sobreexpresión fue menor que la de aquellas no transfectadas. Sin embargo, las diferencias en capacidad proliferativa no fueron estadísticamente significativas (Fig. 58).

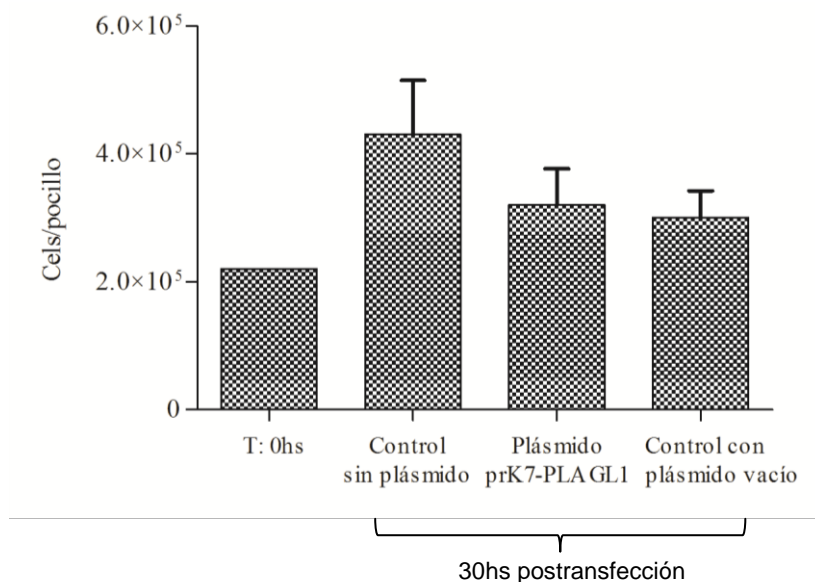


Fig. 58: Estudio de sobreexpresión de la proteína PLAGL1 en PLC/PRF/5 a partir de dos experimentos independientes. Recuento celular (cels/pocillo) mediante azul de

tripán en las distintas muestras del experimento de transfección. No existen diferencias significativas entre los mismos;  $p < 0.05$ .

### 5.5.2 Sobreexpresión del gen *PLAGL1* en células HepG2

La otra línea tumoral seleccionada para estudiar las consecuencias de la sobreexpresión de *PLAGL1* fue HepG2 porque no presenta mutaciones en el gen *p53* y la proteína es funcional a diferencia de lo que ocurre en la línea PLC/PRF/5. Dada esta característica, quisimos conocer mediante experimentos de transfección si la sobreexpresión de *PLAGL1* incrementa la expresión del efector p21 mediada por p53. Luego de realizar la transfección, al cabo de 30hs se comprobó mediante inmunofluorescencia indirecta la eficiencia del procedimiento al contar el número de células transfectadas y obtener un promedio a partir de 10 campos microscópicos (60X). La misma fue menor que la de la línea tumoral PLC/PRF/5, alrededor del 5% (Fig. 59). Sin embargo, el nivel de expresión de la proteína, medido por Western blot, incrementó significativamente respecto de los controles (Fig. 60). A partir de los extractos proteicos obtenidos de cada punto temporal del ensayo, se estudió el nivel de expresión de p21 mediante Western blot y se observó un incremento significativo de la expresión en las células transfectadas con el plásmido prk7-*PLAGL1* respecto a los controles sin transfección (T: 0hs, control sin plásmido y control con plásmido vacío) (Fig. 60).

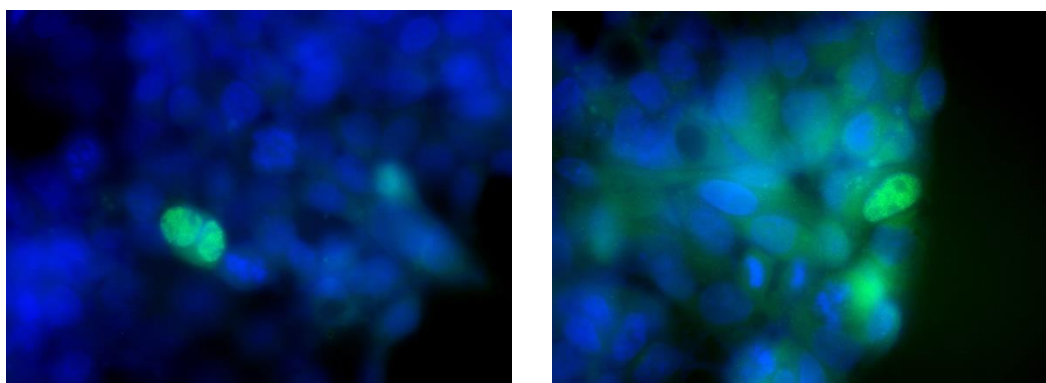


Fig. 59: Estudio de sobreexpresión de la proteína *PLAGL1* en HepG2 a partir de dos experimentos independientes. Inmunofluorescencia de células transfectadas con anticuerpo anti-*PLAGL1* y anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor 488 (verde).

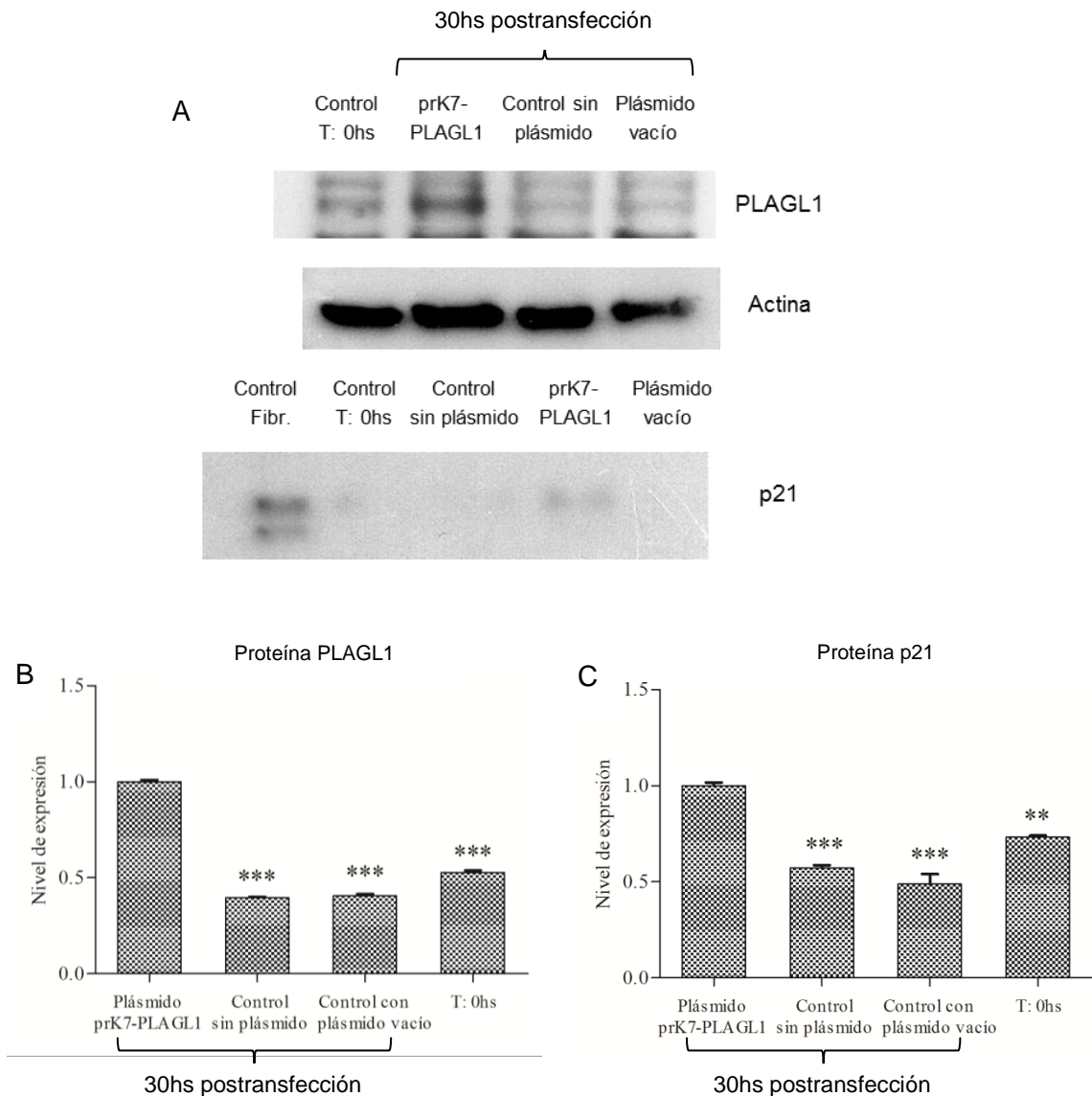


Fig. 60: Estudio de sobreexpresión de la proteína PLAGL1 en HepG2 a partir de dos experimentos independientes. A) Western blot de PLAGL1 y p21 de los siguientes extractos proteicos: control T: 0hs, control sin plásmido, células transfectadas con el plásmido prK7-PLAGL1, células transfectadas con plásmido vacío. Para el anticuerpo anti-p21 se utilizó como control de señal un extracto proteico de fibroblastos. B-C) Comparación del nivel de expresión de PLAGL1 y p21, respectivamente, de las células transfectadas con el plásmido prK7-PLAGL1 respecto de los controles: T: 0hs; control sin plásmido y control con plásmido vacío. \*Diferencias significativas respecto al nivel de expresión de PLAGL1 y p21 de las células transfectadas con el plásmido prK7-PLAGL1;  $p < 0.05$ .

En aquellos experimentos donde se sobreexpresó PLAGL1 se observó un número de células menor respecto al control sin plásmido (30hs

postransfección) mediante recuento celular, aunque los datos no fueron estadísticamente significativos (Fig. 61). Mientras que mediante citometría de flujo se detectó que entre las células tratadas con el plásmido prk7-PLAGL1 había un menor porcentaje de ellas en fase G2/M (11.7%) respecto al control sin plásmido (13.7%) a las 30hs postransfección (Fig. 62).

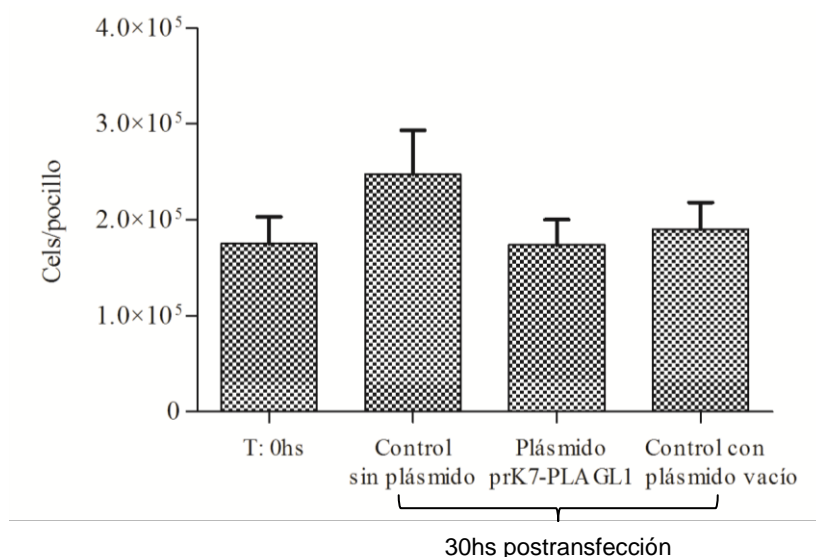


Fig. 61: Estudio de sobreexpresión de la proteína PLAGL1 en HepG2 a partir de dos experimentos independientes. Recuento celular (cél/s/pocillo) mediante azul de tripán en las distintas muestras del experimento de transfección. No existen diferencias significativas entre los mismos;  $p < 0.05$ .

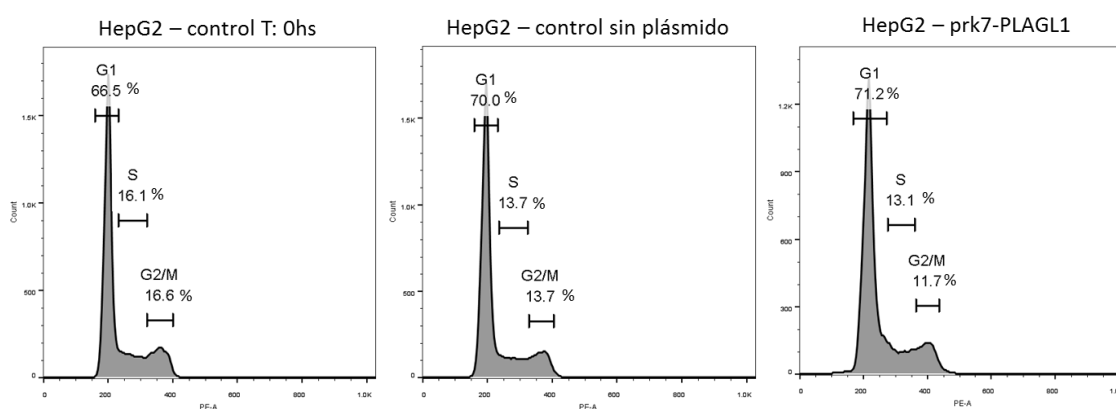


Fig. 62: Estudio de sobreexpresión de la proteína PLAGL1 en HepG2 a partir de dos experimentos independientes. Citometría de flujo para cada punto temporal del experimento de transfección: control T: 0hs, control postransfección sin plásmido y

células transfectadas con el plásmido prk7-PLAGL1. Cada gráfico muestra los porcentajes en cada fase del ciclo celular: G1, S y G2/M.

## **5.6 Papel del gen *PLAGL1* en HCC de pacientes**

Se recolectaron 14 muestras de tejido hepático de pacientes con cáncer de hígado atendidos en el Hospital Italiano de Buenos Aires durante el período 2007 a 2009. Estas muestras se utilizaron en otros proyectos de investigación desarrollados por el Dr. Luis A Parada, además de este trabajo de tesis. Las mismas fueron obtenidas con el consentimiento informado de los pacientes, tratadas de acuerdo a la reglamentación establecida por el comité de ética del hospital y conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los datos clínicos y patológicos de diez pacientes se detallan en la tabla 5.

Paciente	Diagnóstico	Sexo	Edad	Cirrosis	Patología asociada	Diámetro del tumor	Grado de Diferenciación	Marcadores Tumorales		
								CK19	CK7	HepPar1 AFP
MH001	HCC	M	65	SI	ND	ND	Bien	ND	ND	ND
MH002	HCC	M	70	NO	ND	>5cm	Bien	ND	+	+
MH003	HCC	M	70	NO	Alcoholismo	>5cm	Moderado	ND	-	+
MH004	HCC	M	51	SI	HBV/HCV	<5cm	Bien	ND	ND	ND
MH005	HCC	M	66	NO	Ninguna	>5cm	Bien	ND	ND	ND
MH006	HCC	M	46	SI	ND	ND	ND	ND	+	ND
MH007	HCC	F	67	ND	ND	ND	ND	-	-	+
MH008	HNF	M	72	NO	Ninguna	>5cm	ND	+	+	ND
MH009	CCC	F	42	NO	HBV	>5cm	ND	+	+	-
MH010	AdCarc	M	54	NO	ND	>5cm	Bien	+	+	ND

Tabla 5: Resumen de los datos clínicos de diez pacientes con cáncer hepático. MH: Muestra Hepática; HNF: Hiperplasia Nodular Focal; CCC: Carcinoma ColangioCelular; AdCarc: AdenoCarcinoma; HBV: Virus de la Hepatitis B; HCV: Virus de la Hepatitis C; ND: No Determinado.

### 5.6.1 Desbalances genómicos en muestras de tumor hepático

El análisis de las alteraciones genómicas cuantitativas se realizó mediante array-CGH. La preparación de las muestras de ADN de tejido conservado a -70°, se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para las líneas celulares en los ensayos de array-CGH. En el presente estudio se utilizó una matriz específica para detectar cambios del cromosoma 6 y se definió como aberración un desvío de más de 0.2 en el logratio de tres sondas consecutivas. Los resultados demostraron pérdidas en 6q24.2 (*PLAGL1*) en 3 de los casos de tumores hepáticos: MH008 (hiperplasia nodular focal; -0.422), MH010 (adenocarcinoma; -0.605) y MH005 (HCC; -0.472) (Fig. 63). Sin embargo, las muestras restantes no presentaron aberraciones en las regiones donde mapean los genes *PLAGL1* y *p21*.

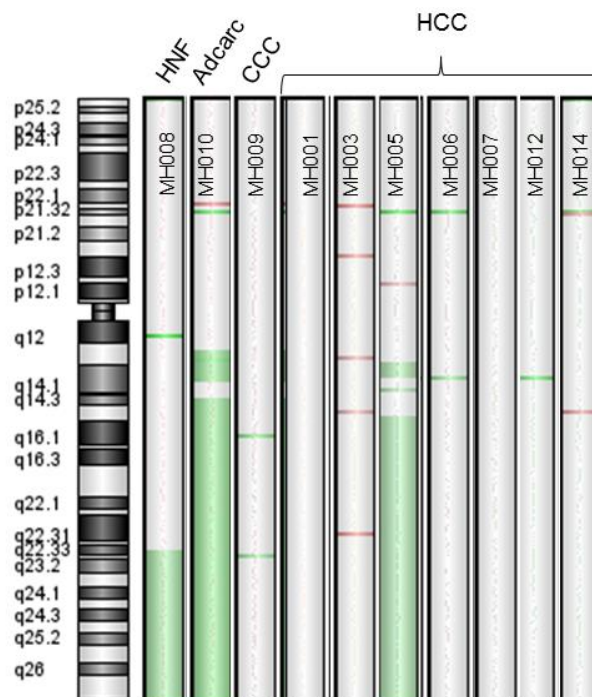


Fig. 63: Perfil genómico del cromosoma 6 en tejidos de tumor hepático a partir de dos experimentos independientes. El color verde indica pérdida de fragmento cromosómico, el color rojo indica ganancia y el gris implica que no hubo pérdida ni ganancia de material.

### 5.6.2 Estado de metilación del promotor de *PLAGL1*

Teniendo en cuenta la importancia que tiene el estado de metilación del promotor P1 de *PLAGL1* en la transcripción del gen, se realizó PCR metil específica (MS-PCR) en seis muestras de ADN disponibles de pacientes con hepatoma. El ADN se extrajo de células fijadas en etanol 70%, por lo tanto las mismas fueron previamente lavadas dos veces en PBS1X, y la extracción de ADN y la técnica de PCR se realizaron de acuerdo al protocolo utilizado para las líneas celulares, descrito en la sección Materiales y Métodos. Los productos de la MS-PCR tienen diferencias de tamaño según el promotor se encuentre metilado (147pb) o no metilado (152pb). Este experimento permitió determinar que en todos los casos analizados el ADN del promotor P1 del gen *PLAGL1* presenta una fracción metilada mucho mayor que la fracción no metilada, la que en varios casos fue prácticamente indetectable (Fig. 64).

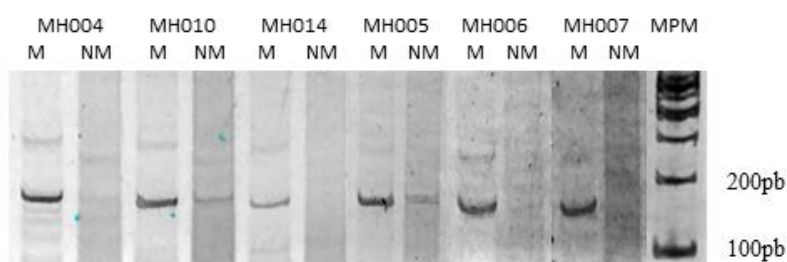


Fig. 64: Imagen del resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de los productos de MS-PCR en células de HCC. El estudio se realizó a partir de dos experimentos independientes. Note que la fracción de ADN con el promotor metilado es mucho mayor que la de ADN no metilado. Muestras de HCC: MH004, MH014, MH005, MH006 y MH007; muestra de Adcarc: MH010. M: Metilado; NM: No Metilado; MPM: Marcador de Peso Molecular.

### 5.6.3 Nivel de expresión de *PLAGL1* y p21 in situ

El estudio del nivel de expresión de *PLAGL1* y p21 se realizó mediante inmunohistoquímica en 11 muestras disponibles de pacientes con tumor hepático. Estas muestras incluyen siete casos de HCC, uno de CCC, dos de AdCarc y uno de HNF. Como control de estos ensayos se usaron preparaciones histológicas de tejido de hígado no tumoral (control sano). De acuerdo a la intensidad de las tinciones se valoró la expresión de las proteínas



de una manera semicuantitativa, considerando expresión elevada (++++) a la más intensa y que fue similar a la del tejido no tumoral, escasa (+) a la de menor intensidad respecto del tejido control y moderada (++) a aquellos casos en los que el nivel fue intermedio entre estos dos extremos. Los resultados obtenidos (Tabla 6) revelaron baja y difusa expresión de la proteína PLAGL1 en las muestras tumorales, con una localización eminentemente citoplasmática en estos tejidos. Por el contrario, en el hígado no tumoral la ubicación de la proteína fue nuclear y citoplasmática, y su expresión fue mayor que la de todas las muestras tumorales, excepto por una de ellas en la que estas fueron similares (MH004). Todas las muestras fueron positivas para la tinción, excepto el caso MH001, sin embargo un 50% de los hepatomas presentan escasa expresión de PLAGL1 (score: +). En el caso de la proteína p21 se observó un perfil similar, presentando baja o nula expresión en hepatomas junto con localización citoplasmática. En un 60% de los cortes histológicos de cáncer hepático la proteína p21 no se visualizó microscópicamente (score: -).

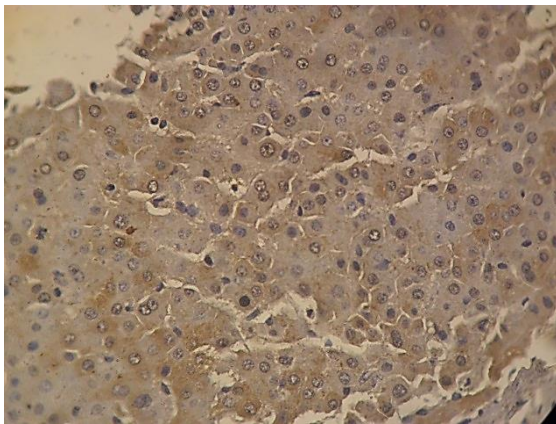
<b>Paciente</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>PLAGL1</b>	<b>p21</b>
MH001	HCC	-	-
MH002	HCC	+	-
MH003	HCC	+	-
MH004	HCC	+++	++
MH005	HCC	+	-
MH012	HCC	+	+
MH013	HCC	++	+
MH008	HNF	+	-
MH009	CCC	++	+
MH010	AdCarc	++	++
MH011	AdCarc	++	-
MH015	Hígado no tumoral	+++	+++

Tabla 6: Expresión de las proteínas PLAGL1 y p21 en preparaciones histológicas de muestras de tumores hepáticos humanos. El estudio se realizó por duplicado para cada muestra tumoral.

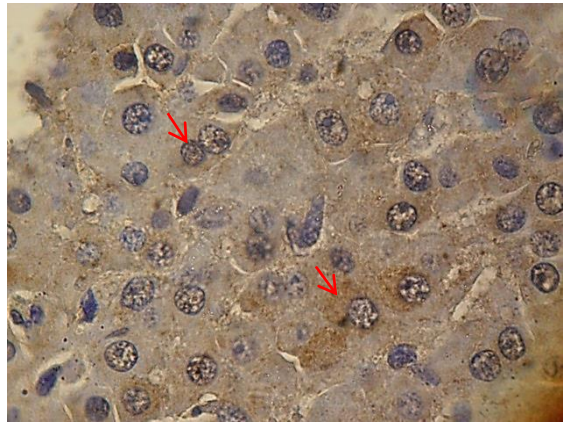
PLAGL1, como factor de transcripción, cumple su función en el núcleo y esta localización se observó en el tejido hepático no tumoral, conjuntamente con la citoplasmática. La proteína p21 interacciona con las CDKs arrojando el ciclo

celular en G1, localiza principalmente en el núcleo celular, aunque también se demostró su ubicación en citoplasma (Abbas and Dutta, 2009). En los cortes histológicos de tejido hepático no tumoral se observaron ambas localizaciones, nuclear y citoplasmática (Fig. 65).

A

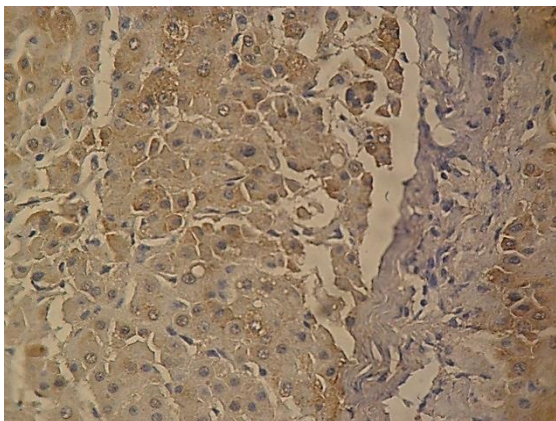


40x

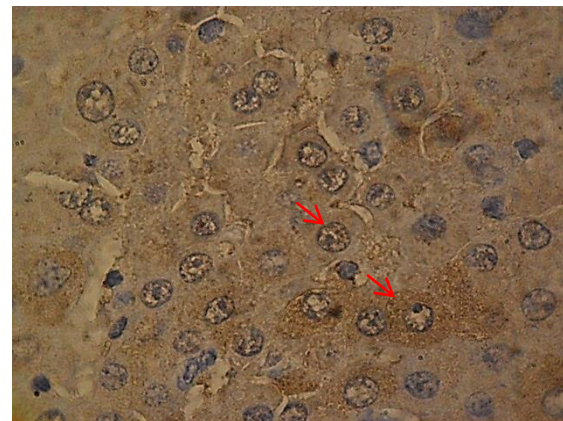


100x

B



40x



100x

Fig. 65: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en tejido hepático no tumoral. Las flechas indican la expresión proteica nuclear y citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

Los resultados de inmunohistoquímica de los cortes histológicos de los pacientes con cáncer hepático mostraron homogeneidad entre ellos respecto del patrón de tinción. La expresión de la proteína PLAGL1 fue menor o similar respecto al tejido hepático no tumoral y la misma estaba circunscripta al



citoplasma. Mientras que la proteína p21 fue muy baja y en algunos de los casos no se detectó mediante este procedimiento.

La muestra del paciente con HNF (MH008) mostró reducidos niveles de PLAGL1 y p21 y de localización sólo citoplasmáticos (Fig. 66).

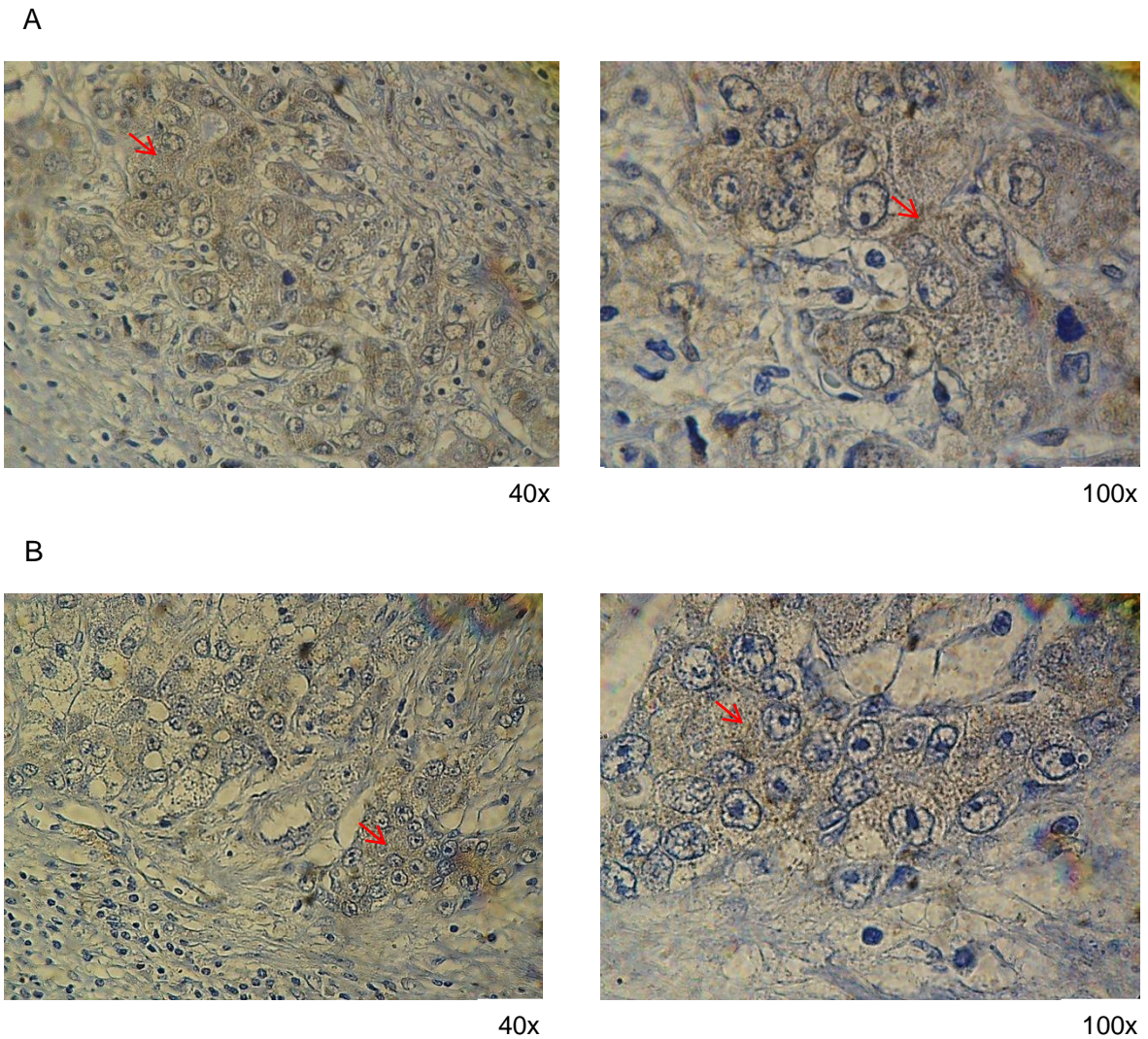
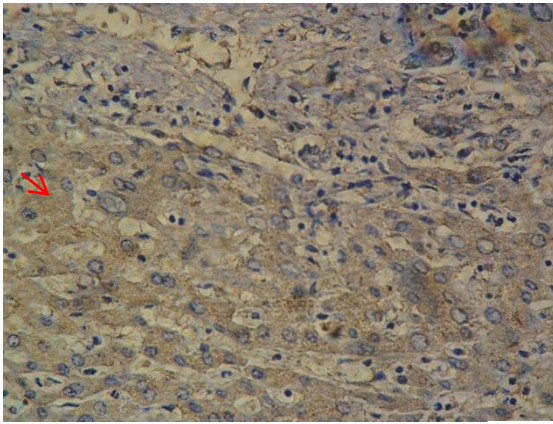


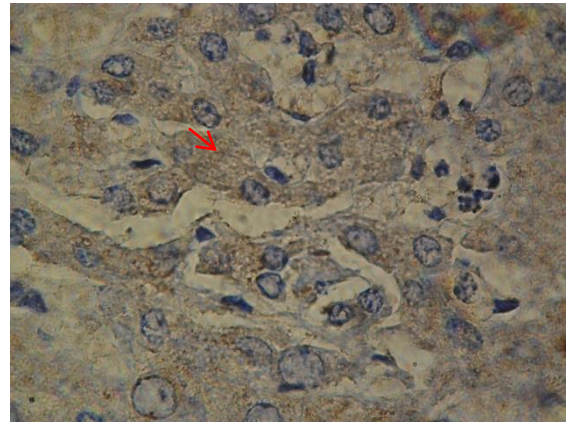
Fig. 66: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de tejido hepático de paciente con HNF. Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

La muestra del paciente con CCC (MH009) también exhibió menor expresión de las proteínas PLAGL1 y p21 que el tejido de hígado no tumoral. Estos reducidos niveles se observaron homogéneamente y se localizaron solamente en citoplasma (Fig. 67).

A

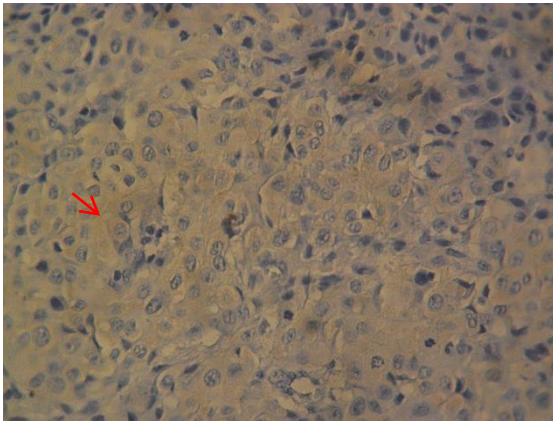


40x

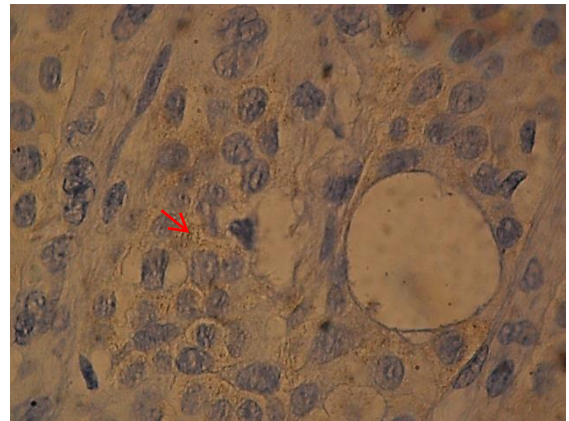


100x

B



40x



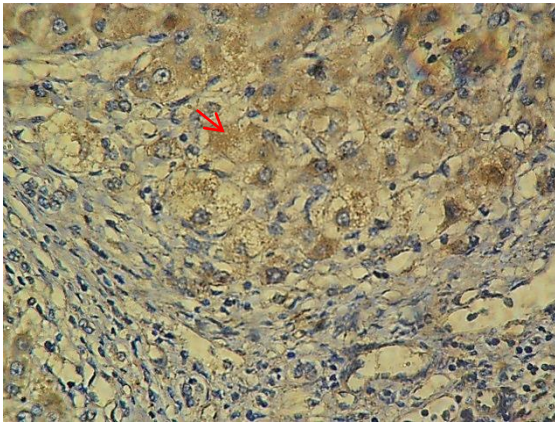
100x

Fig. 67: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de muestras de tejido hepático de un paciente con CCC. Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

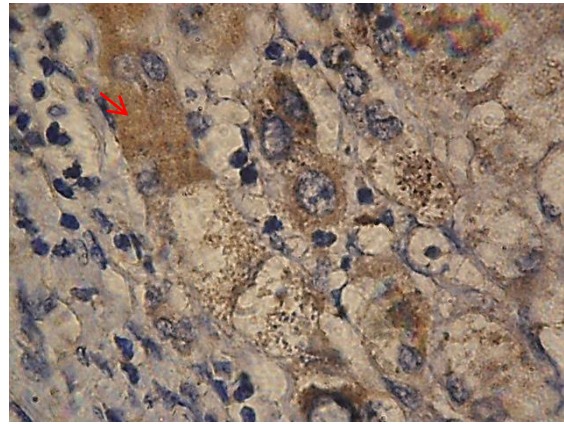
Los cortes histológicos correspondientes a la muestra de uno de los dos pacientes con adenocarcinoma (MH010) presentaron expresión heterogénea de PLAGL1 en el citoplasma de los hepatocitos, mientras que la distribución de la proteína p21 en citoplasma fue homogénea entre los hepatocitos (Fig. 68).



A

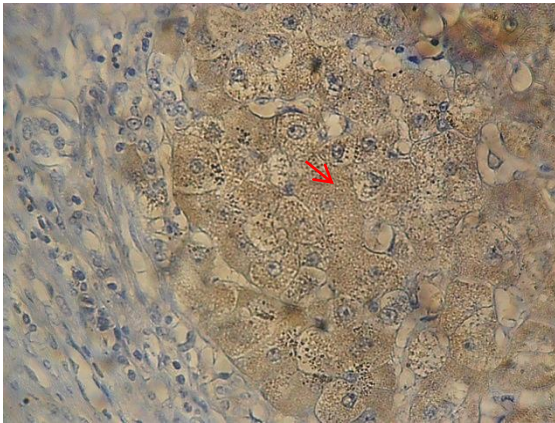


40x

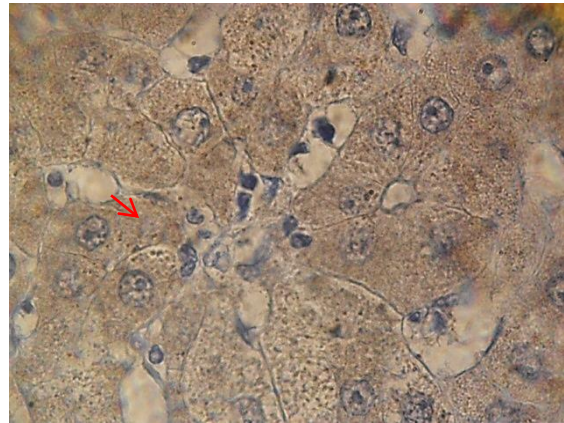


100x

B



40x

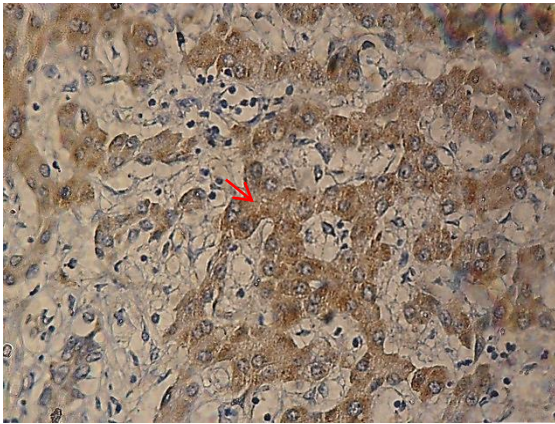


100x

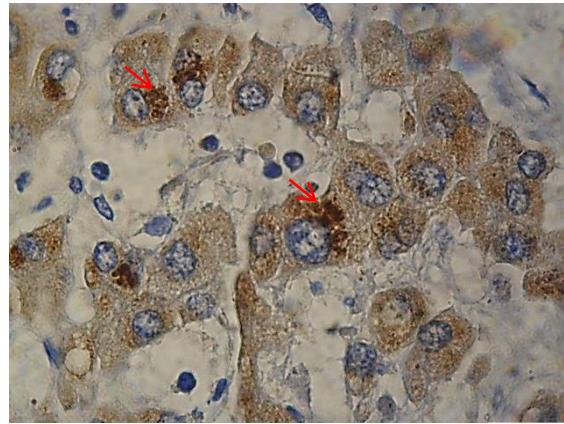
Fig. 68: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de muestras de tejido hepático de un paciente con AdCarc (MH010). Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

La muestra del segundo paciente con adenocarcinoma (MH011) reveló acumulaciones de la proteína PLAGL1 localizándose al lado del núcleo. Este patrón se repitió en varios hepatocitos. Sin embargo, la expresión del efector p21 no fue detectada (Fig. 69).

A

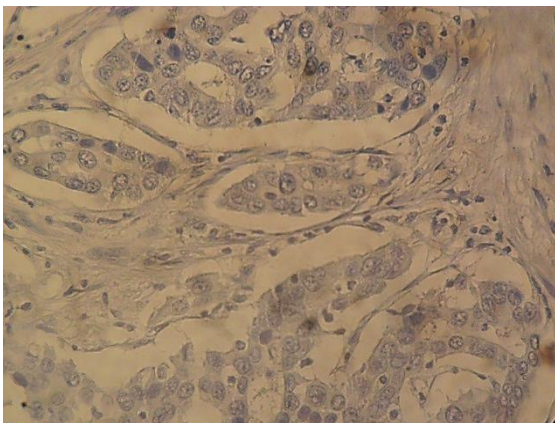


40x

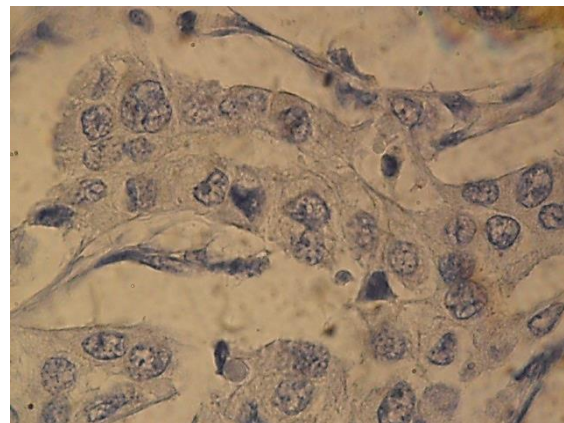


100x

B



40x



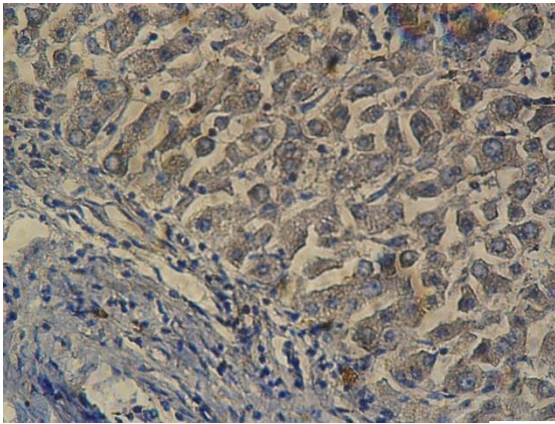
100x

Fig. 69: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de muestras de tejido hepático de un paciente con AdCarc (MH011). Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. Note la acumulación de PLAGL1 alrededor de los núcleos celulares. El ensayo se realizó por duplicado.

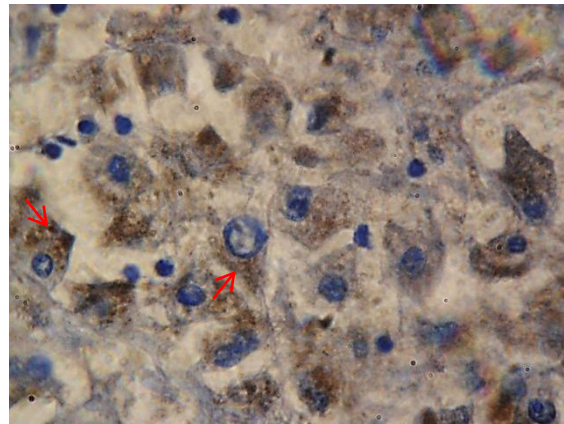
Por último, en general, las siete muestras de carcinoma hepatocelular que se estudiaron por inmunohistoquímica mostraron reducida y difusa expresión de PLAGL1 y aún menor o indetectable nivel proteico de p21 (Fig. 70 y 71). En todos los pacientes con HCC la localización de ambas proteínas fue citoplasmática.



A

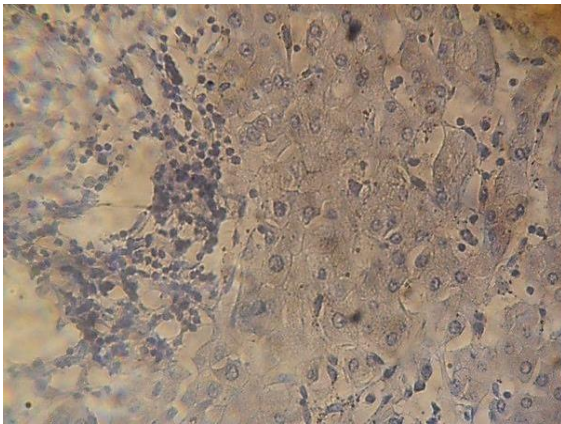


40x

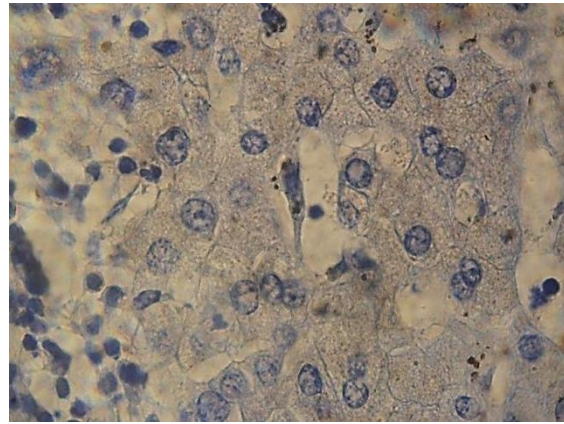


100x

B



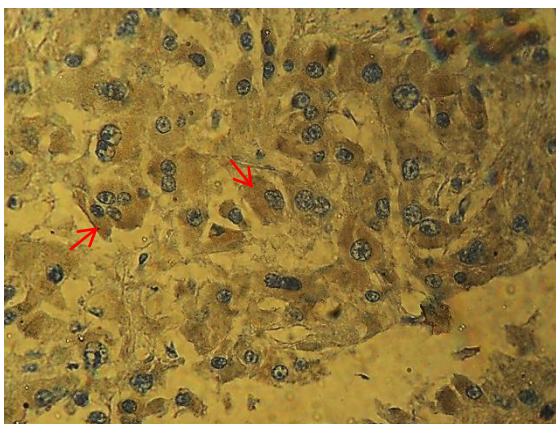
40x



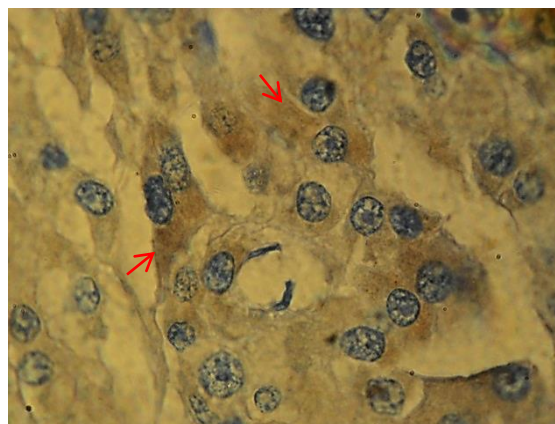
100x

Fig. 70: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de muestras de tejido hepático de un paciente de HCC (MH005). Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

A

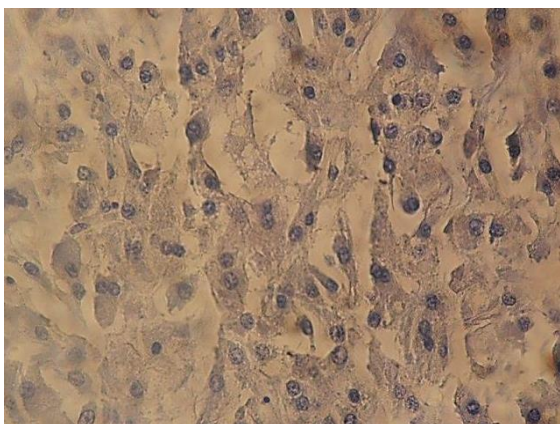


40x

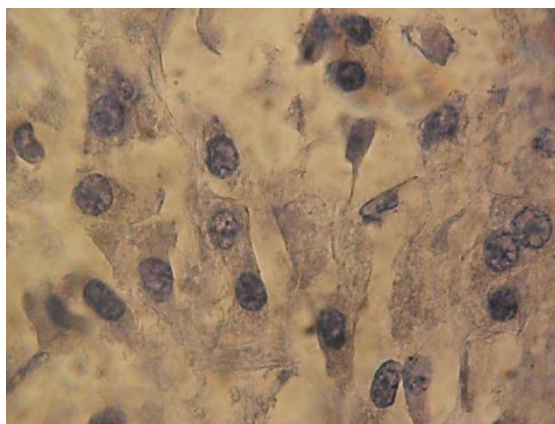


100x

B



40x



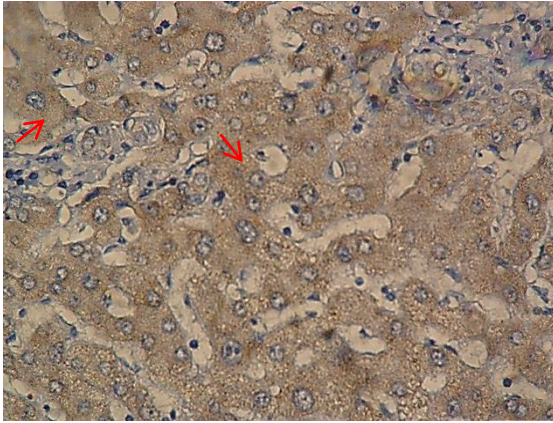
100x

Fig. 71: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de muestras de tejido hepático de un paciente con de HCC (MH003). Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

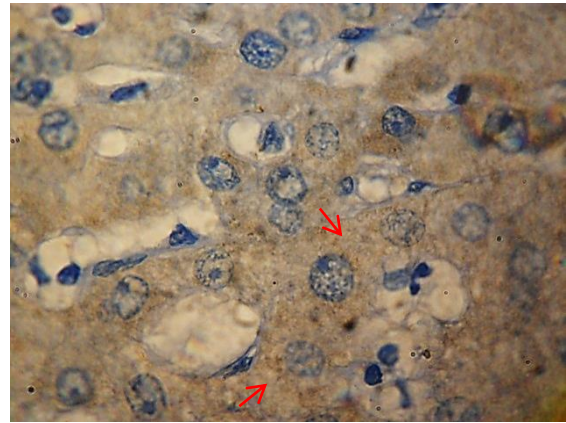
Entre las muestras de HCC, una de ellas (MH004) exhibió la mayor expresión de PLAGL1 de todos los casos con HCC, y ésta se observó distribuida homogéneamente en los hepatocitos. El nivel de expresión de la proteína p21 también fue homogéneo en comparación al resto de las muestras de HCC (Fig. 72). Sin embargo, ambas proteínas tienen localización citoplasmática.



A

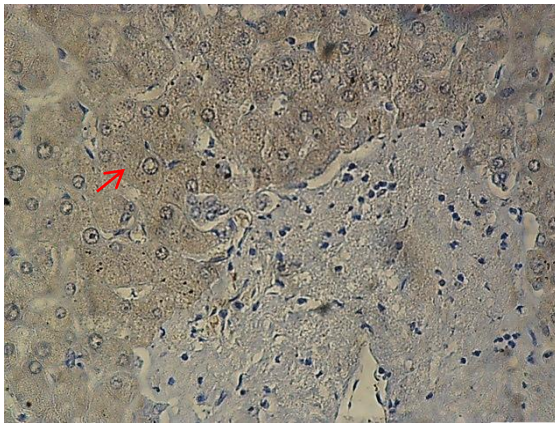


40x

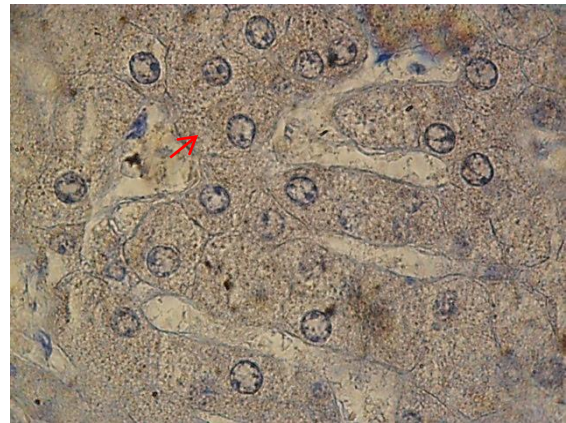


100x

B



40x



100x

Fig. 72: Inmunohistoquímica de las proteínas PLAGL1 (A) y p21 (B) en preparaciones histológicas de muestras de tejido hepático de un paciente con HCC (MH004). Las flechas indican la expresión proteica citoplasmática. El ensayo se realizó por duplicado.

# Discusión

## 6 Discusión

### 6.1 Aberraciones genéticas y epigenéticas en HCC

El gen *PLAGL1* codifica para una proteína homónima que regula el ciclo celular y la apoptosis, y estas funciones las lleva a cabo participando en las vías de señalización de p53 y PPAR $\gamma$ , los cuales inducen p21 (Huang *et al.*, 2001; Barz *et al.*, 2006). Diferentes investigaciones dieron como resultado sólidas evidencias que apoyan el carácter de TSG del gen *PLAGL1*. En efecto, en diferentes tipos de tumores, incluyendo cánceres de ovario, pituitaria y colorrectal, se han detectado ya sea una reducida expresión de *PLAGL1* o la pérdida completa de la misma (Cvetkovic *et al.*, 2004; Viera Neto *et al.*, 2013; Kowalczyk *et al.*, 2015). Más aún, estudios genéticos y epigenéticos mostraron LOH en la región cromosómica 6q24 donde mapea *PLAGL1*, bajos niveles de mRNA, e hipermetilación del promotor P1 de *PLAGL1* en muestras de tejidos tumorales, brindando el soporte adicional al papel de este gen en tumorigénesis (Abdollahi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014). Sin embargo, la relación entre el perfil genómico de la región donde mapea este gen, su nivel de transcripto y de expresión no ha sido estudiado en detalle en tumores de hígado. En el presente trabajo se investigó, mediante aCGH, el estado del genoma completo de las líneas celulares derivadas de HCC PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1 utilizadas como modelo experimental, como así también de una serie de tumores primarios de hígado de pacientes atendidos en el Hospital Italiano de Buenos Aires. El análisis demostró que las líneas celulares tumorales Huh7 y SkHep1 presentan pérdida de material genético de la región cromosómica 6q24.2 donde mapea *PLAGL1*. A diferencia de estas, la línea PLC/PRF/5 no presenta anormalidades en la región cromosómica 6q24.2 y la línea HepG2 exhibe ganancia de la región cromosómica donde mapea *PLAGL1*. En las muestras de tejido de pacientes con hepatomas, la investigación demostró que las alteraciones cuantitativas de esta región no son muy frecuentes, solo en tres de las 10 muestras se detectaron pérdidas de 6q24.

Por mucho tiempo se ha considerado que los desbalances genómicos tienen como consecuencia la amplificación de oncogenes o la inactivación de TSG

según se trate de ganancias o pérdidas genómicas, respectivamente, y que esto tiene implicancias directas en el desarrollo de los tumores (Parada, 1999). La tecnología aCGH ha permitido caracterizar las alteraciones genómicas cuantitativas en el tejido tumoral, inclusive fue posible determinar perfiles de cambios asociados al desarrollo de HCC. La mayoría de los estudios coinciden en que este tipo tumoral está caracterizado por las ganancias de regiones de cromosoma 1q, 6p, 8q, 17q y 20q, y pérdidas de 1p, 4q, 6q, 8p, 13, 16 y 17p (Crawley and Furge, 2002; Pang *et al.*, 2003; Midorikawa *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2016). A pesar que la pérdida de la región cromosómica donde mapea *PLAGL1* ocurre de una manera recurrente tanto en las líneas celulares como en las muestras de pacientes, la frecuencia con que este cambio se produce es menor a la de otras regiones tales como 1p, 8p o 17p. Además se debe destacar que aunque solo una de las muestras de tejido analizadas en este trabajo fue de HCC, los datos obtenidos a este respecto son concordantes con los de tumores de pacientes de otras regiones geográficas, sujetos a otros factores de riesgo y/o etiológicos. Interesantemente, las pérdidas de la región cromosómica 6q, en ocasiones acompañadas de ganancias de 6p, han sido detectadas con una frecuencia relativamente más alta en patologías benignas de hígado, tales como adenoma hepatocelular (HCA) debido a la ingesta de anabólicos o anticonceptivos esteroides, como así también en pacientes con enfermedad congénita de acumulación de glucógeno (Kishnani *et al.*, 2009). Tomado en conjunto, esto podría interpretarse como que la relevancia de las pérdidas de 6q para el desarrollo de HCC es menor frente a la de esas otras regiones genómicas. Sin embargo, se debe considerar que si bien los adenomas son tumores benignos, la frecuencia con que HCA sufre transformación maligna es relativamente alta sobre todo en aquellos originados en pacientes con enfermedad de acumulación de glucógeno. Además, debe tenerse en cuenta que la pérdida frecuente de 6q donde mapea *PLAGL1* es un hallazgo frecuente en otros tipos tumorales. Por ejemplo, fue detectada en el 50% de las muestras de feocromocitomas y 12.4% de adenocarcinomas gástricos analizadas con esta tecnología (Jarmalaite *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

Se ha demostrado para otros tipos de cánceres que los desbalances genómicos cuantitativos y las mutaciones puntuales de este gen no son muy

frecuentes y que los cambios epigenéticos juegan un papel igualmente importante (Li *et al.*, 2014). Por ello, los estudios genómicos se complementaron con análisis del estado de metilación del promotor P1 del gen *PLAGL1*, los que demostraron una fracción metilada y no metilada de la isla CpG de esta región reguladora del gen en las cuatro líneas celulares. De manera similar, el mismo análisis realizado en las muestras de tumores primarios, reveló una fracción de ADN metilado y de no metilado. Interesantemente, entre las muestras con metilación del promotor P1, dos de ellas (MH005 de HCC y MH010 de Adcarc) también exhibieron disminución en el número de copias de la región donde mapea *PLAGL1*. La visualización del promotor metilado del gen *PLAGL1* podría estar relacionada con la disminución del nivel de transcripto. En efecto, la disminución del nivel de mRNA debido a hipermetilación del promotor fue demostrado en un estudio con muestras de pacientes con adenocarcinoma gástrico (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, la relación entre desbalances genómico, estado de metilación del promotor P1 y el nivel de transcripto del gen aparentemente no es directa, ya que, paradójicamente, la línea tumoral HepG2 presenta ganancia de material de la región 6q24, el nivel más bajo de metilación de la isla CpG correspondiente al promotor P1 de *PLAGL1* y aun así el nivel de mRNA del gen es sumamente bajo. En este contexto, es importante destacar que *PLAGL1* es un gen con impronta genómica y que durante el desarrollo embrionario se expresa en la mayoría de los tejidos exclusivamente del alelo paterno (Theodoropoulou *et al.*, 2010), y que estudios del nivel de transcripción de *PLAGL1* demostraron que en el hígado del adulto la expresión del mismo es bialélica (Piras *et al.*, 2000; Valleley *et al.*, 2007). Por lo tanto, los resultados sugieren que otras causas, tales como defectos en la expresión regulada por un segundo promotor (P2) o promotores alternativos, independientes de metilación, y acetilación/deacetilación de histonas, también podrían afectar el nivel de mRNA en las líneas tumorales (Abdollahi *et al.*, 2003; Valleley *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2011).

## 6.2 Nivel de transcripto y expresión proteica del gen *PLAGL1*

Con el propósito de investigar sobre las consecuencias funcionales de los cambios genéticos y epigenéticos, se estudió el nivel de transcripto y el de la expresión proteica del gen *PLAGL1* en las cuatro líneas tumorales de hígado y en una línea de fibroblastos no tumorales, seleccionada porque presenta niveles de mRNA y proteína *PLAGL1* similares a los detectados en hepatocitos no tumorales (<http://genecards.org>). Estas células fueron sincronizadas mediante cultivo en medio nutritivo con baja concentración de SFB (3%) durante 24hs y posteriormente utilizadas para investigar la capacidad proliferativa mediante subcultivos de alícuotas del mismo número celular en medio completo por espacio de 96hs (ver Materiales y Métodos). La RT-qPCR reveló que el nivel de mRNA del *PLAGL1* de las células tumorales al final del período de sincronización (comienzo del experimento de proliferación), es aproximadamente 10 veces menor que el de los fibroblastos normales. Mientras que la determinación del nivel de la proteína mostró que la expresión de ésta es similar en todas las líneas, incluido los fibroblastos. Los resultados de RT-qPCR en la líneas tumorales eran de alguna manera esperados, y en efecto coinciden con los de estudios realizados en otros tipos tumorales que exhibieron bajo nivel de mRNA de este gen (Vieria Neto *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Kowalczyk *et al.*, 2015) y muy probablemente determine el bajo nivel de expresión proteica. Sin embargo, el hecho de no obtener diferencias estadísticamente significativas en términos de expresión de *PLAGL1* a pesar del elevado nivel de transcripto observado en fibroblastos es intrigante. Una posible explicación para tal comportamiento radica obviamente en la diferente naturaleza de estos dos tipos celulares (hepatocitos y fibroblastos). Alternativamente, podría tratarse de un fenómeno similar a lo que ocurre en fibroblastos de ratón respecto de la organización celular de la transcripción del gen *PLAGL1*. Royo y colab. (2009) demostraron que la transcripción ocurre en estrecha proximidad con el nucléolo y el mRNA del gen es retenido en el sitio de transcripción mediante una interacción física con este compartimento celular. Más aún, frente a situaciones de estrés que activan las vías que controlan el ciclo celular, el mRNA es liberado de estos sitios y la síntesis de la proteína *PLAGL1* aumenta concomitantemente. Por lo tanto, en el caso de los fibroblastos humanos, usados como control experimental, podría estar

ocurriendo el mismo fenómeno de retención nucleolar de transcritos del gen *PLAGL1* (Royo *et al.*, 2009).

Tal como se mencionó anteriormente, después de un período de sincronización se sembraron cuatro alícuotas de cada una de las líneas celulares (T: 0hs) y se cosecharon una cada 24hs para realizar recuento celular, RT-qPCR y Western blot. Estos experimentos mostraron que los fibroblastos no tumorales se dividen de manera sostenida, aunque con una tasa proliferativa estimada mediante el cálculo del tiempo de duplicación (TD) notablemente más baja que la de las células tumorales (Fig. 73). En efecto, entre las nuevas capacidades que adquieren las células durante carcinogénesis se encuentra la de escapar a los mecanismos moleculares de control del crecimiento y proliferar activamente (Kufe *et al.*, 2003). Múltiples actores y vías de señalización participan en el incremento de la capacidad proliferativa de los tumores, cuando se encuentran alterados. Por ejemplo, la vía de señalización HGF-Met gobierna el proceso de proliferación y migración celular y tiene un papel fundamental en la regeneración fisiológica del hígado. La desregulación de esta vía, debido principalmente a la amplificación de la región cromosómica 7q34 donde mapea el gen del receptor Met, es un hallazgo frecuente en HCC (Kaposi-Novak *et al.*, 2006). La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina participa en procesos tan diversos como diferenciación, proliferación y muerte celular programada. La unión de ligandos tipo Wnt a los receptores de la familia Frizzled provocan la liberación de  $\beta$ -Catenina de los complejos de degradación con APC, AXIN1 y GSK3 y su translocación al núcleo donde estimula la transcripción de genes diana. En los tumores, las mutaciones del gen *CTNNB1* tienen como resultado el mismo efecto de escape de la degradación y posterior desregulación de genes pro-proliferativos (Sia and Villanueva, 2011). En efecto las mutaciones de *CTNNB1* figuran segundas entre las alteraciones genéticas más comunes de HCC, después de las de *p53* de acuerdo a la base de datos COSMIC ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

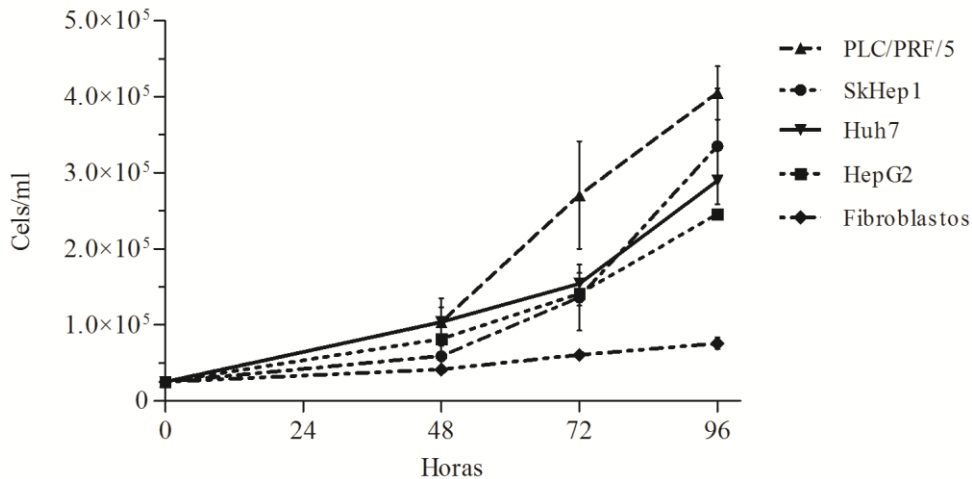


Fig. 73: Curvas de proliferación de fibroblastos no tumorales y de cuatro líneas celulares derivadas de HCC.

El gen *PLAGL1* codifica para una proteína que interacciona con p53 y participa en la regulación del crecimiento celular mediante la desregulación transcripcional del gen *p21* (Hoffmann and Spengler, 2008). Con el objeto de conocer su papel en la proliferación de las células de HCC, se determinó el nivel del transcripto y de la proteína *PLAGL1* en las cuatro líneas tumorales y se los comparó con los datos de fibroblastos. Este estudio permitió conocer que en células normales se establece una dinámica de transcripción caracterizada por un nivel máximo al comienzo del proceso de proliferación (T: 0hs) seguido de una reducción transitoria, que alcanza un mínimo a las 48hs y posterior aumento hasta el final del experimento (Fig. 18). Por el contrario, en las células tumorales se detectó que no se establece esta dinámica, sino más bien se produce una transcripción sostenida del gen, aunque el nivel de mRNA en las células tumorales fue menor que el de los fibroblastos. Interesantemente, la expresión proteica es similar en ambos tipos celulares, en los fibroblastos solo se observa a las 96hs un aumento estadísticamente significativo respecto del nivel determinado al T: 0hs. Mientras que la expresión de la proteína en las células tumorales, salvo algunas excepciones, fue más baja que en los fibroblastos, pero estas diferencias no alcanzaron niveles de significancia estadística (Fig. 51). Es decir, en ambos tipos celulares hay una expresión de la proteína similar. Estos resultados, a primera vista, inducen a pensar que la



importancia de *PLAGL1* en la regulación de la proliferación, tanto de células tumorales como normales, es menor. Sin embargo, se debe tener en cuenta el estudio de Royo y colab. (2009), quienes demostraron que la expresión proteica solo sufre un aumento marcado y rápido frente a una situación de marcado estrés celular, como lo es la inducción de roturas de doble cadena de ADN con Etoposido, que requiere un arresto del ciclo celular que permita la reparación del ADN (Royo *et al.*, 2009). Por lo tanto, se podría concluir que el nivel de proteína requerido para la regulación del ciclo celular en condiciones fisiológicas es bajo y que el nivel de expresión de esta proteína en las líneas celulares de tumores es insuficiente para controlar la proliferación, atendiendo a que la tasa proliferativa calculada para las células tumorales es sustancialmente mayor que la de los fibroblastos normales. En este escenario sería interesante contar con sistemas celulares con expresión controlada del gen *PLAGL1* a los fines de estudiar más detalladamente su rol en la proliferación.

### **6.3 Nivel de transcripto y expresión proteica de *p53* y *p21***

*PLAGL1* no es un actor molecular que participa en el control de la proliferación celular de manera aislada, sino que interviene en una de las vías de señalización más complejas, como lo es la de *p53* (Huang *et al.*, 2001). La interacción con este receptor nuclear tiene como resultado la formación de un complejo que induce la expresión del gen de la proteína *p21<sup>Cip1</sup>*, esencial para arrestar el ciclo celular en la fase G1 (Hoffmann and Spengler, 2008). Debido a esto, se investigó sobre el estado de las regiones genómicas donde mapean estos genes en muestras de ADN de las cuatro líneas tumorales mediante arrayCGH. Los análisis mostraron que a excepción de SKHep1, todas las líneas son normales respecto del número de copias de *p53*, mientras que la región 6p21.3 donde mapea *p21* se ve afectada de cambios genómicos, en dos líneas se registraron ganancias, mientras que en la línea Huh7 esta región se encuentra delecionada (Tabla 4). Por otro lado, los ensayos de RT-qPCR y Western blot mostraron que el nivel transcripto y de proteína *p53* de las células tumorales sincronizadas (T: 0hs) es más bajo que el de los fibroblastos y similar entre ellos (Fig. 51). De manera similar, e independientemente del

incremento de la dotación genómica de la región 6p21.3 en dos de las líneas, el nivel de expresión de la proteína p21 fue similar en SKHep1, HepG2 y PLC/PRF/5 y más bajo que el de los fibroblastos normales en T: 0hs. La línea de hepatoma Huh7 exhibió pérdida genómica (Tabla 4) y la proteína fue indetectable mediante Western blot, coincidentemente con lo publicado por Koga y colab respecto de la expresión de p21 en esta línea celular (Koga *et al.*, 2001). Desregulación del balance entre proliferación y muerte celular es uno de los principios que rige la hepatocarcinogénesis humana y en este proceso la disminución o pérdida completa de la expresión de moléculas pro-apoptóticas, entre estas p53, juegan un papel fundamental (Fabregat *et al.*, 2007). En contexto, nuestros resultados respecto de la expresión de estas proteínas en células normales y en células tumorales son concordantes con la función antiproliferativa de las mismas.

Con el objeto de conocer la dinámica del nivel de mRNA y de la proteína p53 y p21, se realizó un estudio del nivel de transcripto y de expresión proteica idéntico al realizado para *PLAGL1*. Se encontró, que el nivel de mRNA y de la proteína p53 fue siempre mayor al de *PLAGL1*, pero interesantemente se detectó que el perfil del transcripto y el de la proteína p53 sigue una dinámica similar al de *PLAGL1* en los fibroblastos no tumorales durante proliferación. Es decir desde un nivel alto, al momento de iniciar el experimento de proliferación (T: 0hs), disminuye a un valor mínimo a las 48hs de cultivo y posteriormente aumenta hasta la finalización del experimento. Dificultades técnicas impidieron estudiar el nivel de transcripto del gen *p21* durante este proceso de proliferación, sin embargo se realizaron los ensayos de Western blot que demostraron que la expresión de p21 incrementa sostenidamente hasta las 96hs (Fig. 18). Estos perfiles de expresión estuvieron acompañados de una disminución del porcentaje de células en fase G2/M determinado mediante análisis citométricos, que podrían sugerir que durante proliferación se establece una regulación caracterizada por una disminución paulatina de la división celular. Fundamentalmente, estos resultados están en sintonía con los encontrados por Huang y colab. (2001), quienes demostraron la interacción física entre *PLAGL1* y p53, lo que sugiere que hay una participación conjunta y orquestada en el control del crecimiento normal por parte de *PLAGL1*, p53 y p21.

Por el contrario, las líneas celulares derivadas de tumores hepáticos en general exhibieron un nivel de mRNA y de proteína p53 similar o menor al de los fibroblastos durante el experimento de proliferación, y también una reducción significativa del nivel de proteína p21. Además, se pudo observar que no se establece esa dinámica en términos de transcripto y de expresión proteica entre p53 y PLAGL1 en las células tumorales como ocurre en los fibroblastos normales, inclusive se detectaron diferencias entre las líneas tumorales respecto de estos parámetros moleculares. En este estudio la caracterización del perfil genómico estuvo enfocada en regiones específicas del genoma, como lo son cromosomas 3p25 (*PPAR $\gamma$* ), 6q24 (*PLAGL1*), 6p21 (*p21*) y 17p13 (*p53*), y aunque algunos desbalances fueron comunes a dos o más líneas celulares, debe tenerse en cuenta que no hay uniformidad respecto del perfil entre todas ellas, a pesar de que se trata de líneas celulares derivadas todas de HCC. Las variaciones respecto de las características biológicas son comunes entre los tumores de un determinado tipo histológico, inclusive esta variabilidad se traduce, en muchas oportunidades, en diferencias clínicas como por ejemplo la susceptibilidad a las drogas utilizadas en el tratamiento de los mismos. Es por ello que es cada vez más aceptado que los tumores malignos son muy diversos, y por ende deberían ser tratados de forma personalizada (Maitland and Schilsky, 2011). En este contexto, y aceptando la heterogeneidad en la patogénesis de estos tumores, se puede concluir de manera general que los datos sobre un nivel bajo de mRNA y proteína de p53, como así también la reducida expresión de p21 durante la proliferación de las células de HCC en comparación con células no tumorales es coincidente con funciones antiproliferativas de estas proteínas (Abbas and Dutta, 2009; Machado-Silva *et al.*, 2010).

La línea tumoral PLC/PRF/5 presentó elevado nivel de transcripto y de proteína p53 al inicio del experimento (T: 0hs) y estos niveles disminuyeron significativamente durante la proliferación. Inclusive los niveles de transcripto y proteína de *p53* fueron superiores a los de *PLAGL1*, y se mantuvieron sin variaciones significativas durante el ensayo. Sin embargo comparado con los datos de fibroblastos normales, fueron inferiores. Por lo tanto, la alta tasa proliferativa de estas células puede estar relacionada con defectos de la regulación del ciclo celular debido a la deficiencia de estas proteínas. Por otro

lado, diversos factores pueden estar asociados a la deficiencia de estos receptores nucleares, pero los desbalances genómicos deberían ser excluidos porque esta línea no presenta alteraciones cuantitativas del ADN (Tabla 4). Sin embargo, se detectaron mutaciones puntuales del gen *p53* (R249S) en esta línea tumoral que afectan al dominio de unión de la proteína a ADN y por lo tanto su función como factor de transcripción de sus genes dianas se encuentra comprometida (Suad *et al.*, 2009; Iwao and Shidoji, 2014). Adicionalmente, se ha demostrado que en esta línea celular, ADN del HBV se encuentra integrado en la región del cromosoma 17 donde mapea *p53* y se propuso que esta alteración afectaría su expresión (Bressac *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 2002; Buendia and Neuveut, 2015). Por lo tanto, en el caso de PLC/PRF/5 podría estar operando un mecanismo similar al que propusieron Huang y colab. (2001) respecto de la baja expresión de la proteína p53 en la línea de carcinoma cervical HeLa que contiene el virus HPV-18. Los autores demostraron que la reducción del nivel de p53 se debe a la interacción con la proteína E6.18 de este virus que induce su posterior degradación mediante ubiquitinización (Huang *et al.*, 2001). Adicionalmente, Iwao y Shidoji (2014) demostraron que p53 localiza principalmente en el citoplasma de las células PLC/PRF/5 y que esto es debido a la formación de complejos con proteínas de la familia de proteínas de choque térmico (HSP), lo que evita su degradación o translocación a núcleo (Iwao and Shidoji, 2014). En suma, la evidencia apunta a que la alta tasa proliferativa de estas células tumorales sería debida a múltiples alteraciones en p53 que resultarían en una reducción de la expresión de la proteína p21. Sin embargo, se debe tener en cuenta que si bien PLAGL1 actúa como cofactor de p53 en sus reacciones de transactivación, esta proteína también actúa como factor de transcripción directo del gen *PLAGL1* (Rozenfeld-Granot *et al.*, 2002), pero en esta línea tumoral la proteína p53 mutada no puede unirse a los sitios consensos de PLAGL1 y consecuentemente contribuye a su baja expresión.

La línea tumoral HepG2, entre todas las líneas tumorales estudiadas, se encuentra en el otro extremo respecto a proliferación, es decir es la de menor capacidad de crecimiento en los cultivos, pero aun así superior a la de los fibroblastos (Fig. 73). En el ensayo de proliferación se determinó que tanto la transcripción como la traducción de los genes *PLAGL1* y *p53* ocurren de manera

uniforme, es decir no se detectaron variaciones temporales estadísticamente significativas de los niveles de transcripto y de las proteínas PLAGL1 y p53 como las que se detectaron en los fibroblastos normales durante proliferación. De manera similar a PLC/PRF/5, se encontró que los niveles de p53 fueron superiores a los de PLAGL1 en todos los puntos temporales (Fig. 32). Interesantemente, de todas las líneas celulares esta es la única que exhibió una ganancia de material genético de la región donde mapea *PLAGL1* y el menor porcentaje de ADN metilado de la región del promotor P1, por lo que se podría esperar un incremento del nivel del transcripto acorde a la dosis génica. Inclusive, podría esperarse que el nivel más alto de *p53* respecto a *PLAGL1* podría ejercer un efecto estimulador, mediante un mecanismo de retroalimentación, de la transcripción del gen *PLAGL1* tal como lo demostraran Rozenfeld-Granot y colab. (2002) (Rozenfeld-Granot *et al.*, 2002). Sin embargo, los datos indican que otros factores adicionales participan en la regulación de la expresión de PLAGL1 o, alternativamente, el nivel necesario para ejercer sus funciones es marcadamente inferior al de p53. Es importante notar que en las células HepG2, el análisis genómico mostró que la región donde mapea p53 se encuentra balanceada y no se reportaron mutaciones del gen. La comparación del nivel de transcripto de los genes *PLAGL1* y *p53* de estas células respecto de los fibroblastos mostró que esta es menor en las células HepG2 que en los fibroblastos durante todo el ensayo de proliferación (Fig. 51 y 52). Sin embargo, idéntico análisis hecho para los niveles de las proteínas mostró que, concordante con el nivel de transcripto, la expresión de p53 es menor en la línea tumoral que en la no tumoral, mientras que la de PLAGL1 exhibió niveles similares entre ambos tipos celulares a pesar del mayor nivel de mRNA en fibroblastos (Fig. 51). La pérdida de la función de *p53* es uno de los cambios más frecuentes en una gran variedad de tipos tumorales (Machado-Silva *et al.*, 2010), por lo tanto esta diferencia en términos de expresión entre células HepG2 y fibroblastos concuerda con su papel en tumorigénesis. Sin embargo, el nivel de expresión alto de PLAGL1 (comparable con el de fibroblastos normales) es sorprendente y sugiere que en este caso particular la proteína podría estar jugando un papel oncogénico tal como lo propusieron recientemente Godlewski y colab. (2016) después de estudiar el nivel de transcripto y de expresión proteica de PLAGL1 en células de carcinomas

renales y en células normales del tejido adyacente al tumor (Godlewski *et al.*, 2016). Si este fuera el caso, p53 actuaría como factor de transcripción directo sobre las regiones consenso de *PLAGL1*, conduciendo a un elevado nivel de proteína de este gen, pero que sería insuficiente para inducir arresto del ciclo celular y apoptosis (Rozenfeld-Granot *et al.*, 2002). En apoyo de esta noción también debe considerarse que la proteína p21, responsable de estas funciones y en cuya regulación de la transcripción está involucrada directamente p53, a pesar de experimentar un incremento estadísticamente significativo a las 48hs de proliferación, se expresa de manera muy baja, incluso sufre una disminución a niveles inferiores al determinado para T: 0hs (Fig. 32) (Abbas and Dutta, 2009).

La línea tumoral Huh7 presenta una capacidad proliferativa intermedia entre las dos descritas anteriormente (Fig. 73), y los análisis sobre los niveles de mRNA y proteína de los genes *PLAGL1* y *p53* mostraron también que estas células no experimentan la misma dinámica respecto del nivel de transcripto y de expresión proteica como lo exhibieron los fibroblastos no tumorales durante este ensayo de proliferación. Se encontró que a las 48hs posteriores al inicio del experimento ocurre un incremento significativo de la transcripción de *p53* que se mantiene en el tiempo, pero que no se traduce en un incremento tan marcado del nivel de proteína (Fig. 39). Además, los niveles de expresión proteica de p53 también son significativamente más elevados que los de *PLAGL1*, concordando con los resultados observados para su transcripto (Fig. 41). La comparación del nivel de transcripto de los genes *PLAGL1* y *p53* de estas células respecto de los fibroblastos mostró que esta es menor en las células Huh7 que en los fibroblastos durante todo el ensayo de proliferación (Fig. 51 y 52). Sin embargo, y de manera similar a lo detectado para las células HepG2, los niveles de la proteína p53 son menores en la línea tumoral que en la no tumoral, mientras que la expresión de *PLAGL1* exhibió niveles similares entre ambos tipos celulares en todos los puntos de la curva de proliferación (Fig. 51 y 52). Como se puede apreciar algunas similitudes respecto de la transcripción y expresión de los genes *PLAGL1* y *p53* son evidentes entre HepG2 y Huh7, y por lo tanto similares consideraciones a las expuestas anteriormente podrían ser aplicadas respecto de la participación del gen *PLAGL1* en la patogénesis de estos HCCs. Sin embargo, algunas diferencias

importantes entre estos dos modelos merecen ser mencionadas. Por ejemplo, la línea celular Huh7 porta la mutación Y220C de p53 y a pesar de ser una mutación comúnmente encontrada en tumores, no compromete dominios de unión a secuencias específicas del ADN de promotores, ni tampoco dominios de interacción con cofactores, esenciales para la función de p53 ([www.p53.free.fr](http://www.p53.free.fr)). Gori y colab. (2014), en una investigación en la que sometieron a estos dos tipos celulares a una sobrecarga de ácidos grasos, demostraron que esta mutación confiere a las células Huh7 una capacidad de metabolizarlos más eficientemente que HepG2 activando la vía de  $\beta$  oxidación de ácidos grasos, y de esta manera podría tener un efecto protector contra la esteatosis, una condición que actualmente se considera predisponente para el desarrollo de HCC (Gori *et al.*, 2014). En este contexto es importante destacar que Huh7 es la que presenta mayor expresión de *PPAR $\gamma$* , y considerando que el nivel de *PLAGL1* es similar en todas las líneas celulares, esta proteína podría estar involucrada en la transactivación del gen *PPAR $\gamma$*  no de manera exclusiva. El nivel de *PPAR $\gamma$*  generaría un ambiente metabólico de bajo estrés oxidativo (reducción de radicales libres por activación de la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos), en el que prevalecen las señales pro-proliferativas frente a las pro-apoptóticas. Además hay que tener en cuenta otra característica de las células Huh7, cual es la ausencia de la proteína p21 detectada por Koga y colab. (2001) y confirmada mediante array-CGH la delección de la región 6p21, donde mapea el gen *p21*, durante el desarrollo de esta tesis. Por lo tanto, aún con niveles apropiados de p53 y *PLAGL1* y proteínas funcionalmente normales, el defecto de uno de los genes efectores más importantes, compromete la vía de señalización conducente a arresto del ciclo celular y apoptosis.

La línea tumoral SkHep1 presentó también índices de proliferación intermedios entre PLC/PRF/5 (más proliferativa) y HepG2 (menos proliferativa), aunque como todas con mayor crecimiento que los fibroblastos normales (Fig. 73). La determinación de los niveles de mRNA y proteína de los genes *PLAGL1* y *p53* mostraron que la transcripción del gen *PLAGL1* discurre con una reducción estadísticamente significativa durante proliferación y aumento a niveles similares a los del inicio del experimento a las 96hs, pero la expresión proteica acompaña esta dinámica solo parcialmente en algunos puntos temporales de la curva. Por otro lado, los resultados de los análisis de transcripto del gen *p53*

indican que no varía significativamente durante proliferación. Respecto de la expresión de la proteína p21, las células SkHep1 fueron las que exhibieron el nivel más elevado de las cuatro líneas tumorales analizadas. El nivel de expresión de p21 sostenido durante todo el ensayo de proliferación indica que el nivel de las otras dos podría ser suficiente para mantener activo el eje PLAGL1-p53-p21, y esto coincide con un incremento solo temporario del porcentaje de células en estadio G2/M y posterior reducción a valores inclusive inferiores a los de T: 0hs (Fig. 45). Por otro lado, los resultados de RT-qPCR y Western blot parecerían estar en concordancia con los datos genómicos obtenidos para esta línea celular (Tabla 4), la pérdida de material genético de la región 6q24 se corresponde con menor expresión y las ganancias de 6p21 se corresponden con un mayor nivel de expresión proteica de p21. Sin embargo, la comparación de los niveles de expresión de las tres proteínas en las células SkHep1 con la de los fibroblastos mostró que en la línea tumoral esta es significativamente menor que en la células no tumorales (Figs. 51, 52 y 54). Tomados en conjunto los datos sugieren que a pesar de tener la vía de señalización p53 funcional, esta línea tumoral posee otras alteraciones moleculares que expliquen la alta tasa proliferativa de las mismas. En efecto, y si bien es cierto que las alteraciones del gen *p53* figuran entre las más frecuentes en los tumores de hígado, sólo el 30%, aproximadamente, de los HCC las presentan (Schulze *et al.*, 2016).

#### **6.4 Nivel de transcritto de *PPARy* en HCC**

La proteína PLAGL1 también lleva a cabo sus funciones de regulación del ciclo celular a través de la inducción de la transcripción del gen *PPARy* (Barz *et al.*, 2006). Estudios in vivo e in vitro demostraron que *PPARy* es capaz de inhibir la proliferación celular mediante la regulación de p21, como lo hace el complejo PLAGL1-p53 (Theodoropoulou *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Los resultados de los análisis mediante RT-qPCR mostraron que en todas las líneas celulares, excepto Huh7, se produce una disminución significativa de la cantidad de mARN de *PPARy* en las células que se encuentran en estado proliferativo respecto del nivel de mARN de las células en T: 0hs. Sin embargo, y aun considerando esa disminución temporal, el nivel de transcritto del gen de las



células de hepatomas fue siempre superior al de los fibroblastos no tumorales, excepto para la línea SkHep1 que además exhibió pérdida de la región 3p25.2 donde mapea *PPARy* (Fig. 53). Además se pudo conocer que durante proliferación el nivel de mRNA de *PPARy* fue superior al de *PLAGL1*. Schaefer y colab. (2005) demostraron, mediante inmunohistoquímica de preparaciones histológicas de HCC, que la expresión de *PPARy* en las células tumorales es mayor que en hepatocitos normales localizados distantes de la masa tumoral. Inclusive estos autores observaron que la tinción era más pronunciada en aquellas células ubicadas en el frente proliferativo del tumor (Schaefer *et al.*, 2005). Si bien en este trabajo de tesis doctoral solo se midió el nivel de transcrito del gen, se podría especular que el nivel elevado de mRNA se podría traducir en niveles altos de la proteína y si esto fuera así nuestros resultados serían concordantes con los de esos autores. Sin embargo, la interpretación de los mismos resulta compleja habida cuenta de que se ha demostrado, por un lado, que para una variedad de tipos tumorales la activación de *PPARy* está asociada con supresión de la replicación y sobrevivencia celular (Panigrahy *et al.*, 2003). Inclusive se demostró que el tratamiento con drogas agonistas (activadoras) de *PPARy* conduce a arresto del crecimiento celular y apoptosis en líneas celulares tumorales (Tsubouchi *et al.*, 2000). Mientras que por otro lado, también se ha demostrado precisamente en líneas celulares derivadas de HCC, que el tratamiento con drogas inhibitoras específicas de *PPARy* o con ARN de interferencia que inducen disminución de la expresión del gen, tiene como consecuencia la pérdida de adhesión celular y posterior apoptosis (anoikis) (Schaefer *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010). Esta aparente contradicción entre funciones oncogénicas y de TSG de *PPARy* indica que los mecanismos por los cuales el gen participa en proliferación tumoral son complejos. Se podría especular que el nivel bajo de mRNA del gen *PLAGL1* respecto del de *PPARy* sugiere que la transactivación de este ocurre por vías adicionales de la de *PLAGL1* en las células de hepatoma. Alternativamente, y asumiendo que la relación funcional *PLAGL1-PPARy* es la apropiada, la alta tasa proliferativa de las células de hepatoma se debería a alteraciones en los efectores moleculares de este eje *PLAGL1-PPARy*, tales como aquellos de la vía intrínseca o extrínseca de apoptosis. Obviamente más experimentación es necesaria para substanciar esta

hipótesis, por ejemplo determinar el estado estructural del gen y la proteína PPAR $\gamma$  en estas células tumorales.

## 6.5 Migración de células de HCC

La capacidad migratoria se estudió mediante el ensayo de cierre de brecha en cultivos confluentes (70%) de las líneas celulares, incluida la de fibroblastos no tumorales. Los experimentos demostraron que todos los tipos celulares cubren el espacio de la herida (migran), aunque con notables diferencias entre ellas respecto a la velocidad. Los fibroblastos normales y la línea tumoral SkHep1 exhibieron la mayor capacidad migratoria, a las 48hs del ensayo la brecha estaba cerrada (Figs. 22 y 50). Mientras que las tres líneas de hepatoma restantes emplearon más tiempo, cubriendo completamente el espacio acelular a partir de las 72hs del experimento (Figs. 29, 36 y 43). Estos resultados, en primer término, indican que la capacidad migratoria de una línea celular no está directamente relacionada con la tasa proliferativa. En efecto, los fibroblastos tienen un crecimiento lento respecto de las líneas tumorales, pero muestran una velocidad migratoria similar a la de la línea celular SKHep1 que tiene una mayor tasa proliferativa. Inclusive, los fibroblastos migran más rápidamente que las células tumorales PLC/PRF/5, Huh7 y HepG2. Por el contrario, HepG2 demostró una escasa capacidad migratoria, la brecha permanecía sin cubrir aún después de 96hs de cultivo y su tasa proliferativa fue superior a la de los fibroblastos (Figs. 30 y 36). La participación de *PLAGL1* en la migración celular durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central ha sido estudiada detalladamente en modelos murinos. Adnani y colab. (2015), mediante ensayos de sobreexpresión, como así también de expresión aberrante de *PLAGL1* en tejido de corteza cerebral en desarrollo, demostraron que *PLAGL1* ejerce un control finamente regulado de la migración neuronal y que este efecto está mediado en parte por el producto de uno de sus genes blancos, el receptor Pac1 o PACAP1 (Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa Pituitario tipo I) (Adnani *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que los niveles de expresión de la proteína *PLAGL1* en células que se encontrarían en crecimiento activo son similares entre las líneas celulares y que estos niveles se asocian con diferencias en términos de

capacidad migratoria entre ellas. Tomados en conjunto los datos indican que la relación entre PLAGL1 y migración de estas células tumorales no es directa y que otros factores estarían involucrados en la migración celular. Shen y colab. (2012) resaltaron justamente la importancia de la expresión de *PPAR $\gamma$*  para la migración e invasión celular en el proceso de metástasis de HCC. *PPAR $\gamma$*  inhibe la transcripción de *MMP9* y *MMP13* metaloproteinasas involucradas en la reorganización de matriz extracelular y degradación de moléculas de superficie celular que facilita la migración de las células tumorales, y estimula la transactivación del gen *TIMP3* que codifica para el inhibidor de metaloproteinasa 3 (Shen *et al.*, 2012). Precisamente, las células SkHep1 y fibroblastos que tienen la mayor capacidad migratoria in vitro, fueron las que exhibieron el menor nivel de transcripto de *PPAR $\gamma$* .

## **6.6 Expresión in situ de PLAGL1 y p21**

Simultáneamente a los análisis de Western blot, se estudió el nivel de expresión y la distribución celular de las proteínas PLAGL1 y p21 en las líneas celulares PLC/PRF/5, HepG2, Huh7 y SkHep1 y en 11 muestras de tumores hepáticos primarios mediante inmunocitoquímica con los mismos anticuerpos primarios utilizados en los análisis por Western blot. Dificultades técnicas impidieron estudiar la localización subcelular de la proteína p53. Las preparaciones citológicas se observaron bajo microscopio y se tomaron imágenes representativas de los resultados de las tinciones. El análisis de las mismas permitió determinar que la expresión de la proteína PLAGL1 es efectivamente más baja en las células de las líneas tumorales que en los fibroblastos usados como control. Además se comprobó que a diferencia de las células normales, en las que tanto el núcleo como el citoplasma celular fueron positivos para la tinción, en las células tumorales la proteína sólo se detectó en el citoplasma celular. Respecto de la proteína p21, la inmunodetección demostró que aunque con una baja expresión, la misma localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, excepto por la línea Huh7 que fue negativa para la tinción. En concordancia con estos resultados, las reacciones inmunohistoquímicas desarrolladas sobre las preparaciones histológicas de tumores primarios revelaron que en la mayoría de los casos de tumores

primarios, el nivel de expresión de la proteína PLAGL1 fue menor que en tejido de hígado normal usado como control y que la localización de PLAGL1 en el tejido tumoral es eminentemente citoplasmática. Se observó además, que existen diferencias en términos de expresión proteica in situ entre las muestras de cáncer hepático. En efecto, una de las muestras (MH004) presentó un nivel similar de PLAGL1 al del tejido de hígado normal (+++), cuatro muestras (36%) presentaron un nivel moderado de expresión (++), cinco muestras (45%) presentaron nivel escaso de expresión (+) y una muestra (MH001) (9%) no mostró reactividad (Tabla 6). Similar heterogeneidad respecto de la expresión de PLAGL1 fue detectada también entre muestras tumorales de cáncer colorrectal (Kowalczyk *et al.*, 2015). Estos autores demostraron además el establecimiento de una correlación negativa entre el nivel de expresión y la capacidad metastásica de los tumores. En este estudio se incluyeron 11 casos de tumores hepáticos y este limitado número impide realizar análisis estadísticos de correlación entre parámetros clínicos y nivel de expresión de PLAGL1. Sin embargo, se puede mencionar que aunque aparentemente no hay correlación entre el grado de diferenciación de los tumores con el nivel de la proteína, el único caso en el que el nivel de expresión fue similar al del tejido normal (+++) ocurrió en un tumor con un diámetro < 5cm. Con respecto de la expresión in situ de la proteína p21, el estudio mostró que un 60% de los casos esta fue indetectable, mientras que los casos restantes exhibieron una expresión de p21 escasa o moderada. Independientemente del nivel de expresión, las tinciones inmunohistoquímicas también mostraron que la proteína localiza en citoplasma en las muestras de cáncer hepático, mientras que en los cortes histológicos de hígado no tumoral la misma se ubica en núcleo y citoplasma. Estos resultados concuerdan con lo reportado para un gran variedad de tipos tumorales, y remarcan la importancia de las alteraciones funcionales de p21 en tumorigénesis en general, incluida hepatocarcinogénesis, debido al papel de esta proteína en la señalización molecular del arresto del ciclo celular (Abbas and Dutta, 2009).

Tal como se lo mencionó anteriormente, PLAGL1 es una proteína con sitios de unión a ADN que actúa como factor de transcripción per se y también tiene funciones de cofactor de otros receptores nucleares, tales como p53. Estas funciones, obviamente, son llevadas a cabo en el núcleo celular y en

concordancia con esto se ha demostrado que los siete dedos de Zinc son esenciales para la localización nuclear de PLAGL1 mediante interacción con Importina $\alpha_1$  (Huang *et al.*, 2007). La alteración en el tráfico intracelular de la proteína PLAGL1 no estuvo entre los objetivos científicos de este trabajo, pero a modo de explicación de este comportamiento podría proponerse que se debe a mutaciones en las secuencias dedos de Zn. Sin embargo, esta hipótesis es poco probable porque de acuerdo al Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) las mutaciones puntuales del gen *PLAGL1* se detectaron sólo en 71 de 21029 (0.3%) muestras de casi todos los tipos de tumores humanos. Alternativamente la acumulación en el citoplasma podría deberse a defecto anomalías de la proteína Importina $\alpha_1$  (Huang *et al.*, 2007). Recientemente se ha propuesto también que una disminución de la interacción de p53 con la proteína CRM1 (CRM1: del inglés *Chromosome Region Maintenance 1*) o XPO1 (del inglés *Exportin1*) incrementaría la disponibilidad nuclear de p53 y esto induciría apoptosis (Ortega *et al.*, 2016). Mediante un razonamiento inverso, se podría sugerir que la localización citoplasmática de PLAGL1 podría estar asociada a una sobreexpresión de XPO1 que podría conducir a un transporte exacerbado de p53 y consecuentemente de PLAGL1 desde el núcleo al citoplasma. La localización citoplasmática de p21 también es un hallazgo frecuente en tumores, y se ha demostrado que localización citoplasmática resulta de la pérdida de la señal de localización nuclear o bien por la fosforilación de p21 en los residuos Thr145 y Ser146 por Akt/PKB (Yousefi *et al.*, 2014). Estos cambios moleculares y de localización están asociados con una función oncogénica de p21 promoviendo supervivencia celular y progresión del ciclo celular a través de diferentes vías de señalización, en vez de inducir arresto y apoptosis. Independientemente de cuál sea el mecanismo molecular responsable de la localización eminentemente citoplasmática de las proteínas en las células tumorales, lo importante a tener en cuenta es que las vías de señalización en las que intervienen en el núcleo podrían encontrarse comprometidas y debido a ello estas células presentarían una mayor capacidad proliferativa.

## 6.7 Sobreexpresión del gen *PLAGL1*

El gen *PLAGL1* codifica para una proteína que mediante la formación de un heterodímero con la proteína p53 activa la transcripción del gen p21, y de esta manera regula el crecimiento celular (Hoffmann and Spengler, 2008). Los resultados obtenidos respecto de la alta tasa de proliferación y del bajo nivel de expresión del gen *PLAGL1* de las células derivadas de HCC comparada con los de las células no tumorales usadas como control, despertó nuestro interés en conocer si la sobreexpresión del gen corregiría este comportamiento de las células tumorales en cultivo. Con este fin, se realizaron ensayos de sobreexpresión de esta proteína mediante transfección de las líneas tumorales PLC/PRF/5 y HepG2 con el plásmido prk7-*PLAGL1* que codifica para la secuencia completa de gen. Estos dos modelos celulares se seleccionaron por el estado en el que se encuentran los genes *p53* y *p21*, la línea PLC/PRF/5 tiene la mutación R249S en el gen *p53* y como consecuencia de ello la proteína carece de la función transactivadora y de interacción con otras proteínas, incluida *PLAGL1*. Mientras que la línea celular HepG2 es estructuralmente y funcionalmente normal respecto de estos genes. Debido a que se deseaba investigar el efecto sobre la proliferación celular, los datos de los ensayos de sobreexpresión se recolectaron a las 30hs posteriores a la transfección, y estos mostraron que si bien se observa un incremento sustancial en la expresión de la proteína *PLAGL1* en las células transfectadas con el plásmido prk7-*PLAGL1* respecto de los controles, esta no modifica el nivel de expresión de p21 ni reduce significativamente la tasa de proliferación de la línea celular PLC/PRF/5. Estos resultados confirman que para ejercer su función en el arresto del ciclo celular, *PLAGL1* requiere de una proteína p53 funcional (Huang *et al.*, 2001) y que la transactivación del gen *p21* por medio de otras vías de señalización (Fig. 9) es insuficiente para controlar la proliferación de estas células tumorales (Liu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Por el contrario, el estudio en la línea celular HepG2 reveló que la sobreexpresión de *PLAGL1* efectivamente conduce a un incremento significativo en la expresión de la proteína p21. El experimento también mostró que el número de células y el porcentaje de las mismas en la fase G2/M no fue estadísticamente menor que en los controles. Los resultados obtenidos con los dos modelos celulares sugieren que la vía más importante para la regulación

positiva del gen *p21* es mediada por p53. A este respecto se debe mencionar que en la regulación del ciclo celular y la proliferación celular no solamente interviene p21, sino que otros inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, tales como p27 y p57, también juegan un papel importante en esta regulación. Pero más importante aún es señalar que *PLAGL1* está involucrado en la transactivación de los genes que conducen a la sobreexpresión de ellos (Schmidt-Edelkraut *et al.*, 2014; Adnani *et al.*, 2015; Rraklli *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que los desbalances genómicos y la metilación de dinucleótidos de la isla CpG del promotor P1 del gen *PLAGL1* son eventos frecuentes en HCC. Los estudios realizados muestran que en las cuatro líneas celulares de HCC estudiadas y en las muestras de tumores hepáticos analizadas se detectó metilación del promotor P1, que podría influir en la expresión proteica, principalmente en aquellos casos donde no se detectaron aberraciones genómicas cuantitativas. Sin embargo, la relación entre estas alteraciones genómicas y epigenómicas con la expresión del gen *PLAGL1* en HCC no es siempre directa ya que pueden existir otros factores que afectan la expresión de este gen, tales como la retención del mRNA en proximidad del nucléolo.

# Conclusiones



## 7 Conclusiones

De los resultados obtenidos durante la ejecución de este trabajo de tesis se puede concluir lo siguiente:

- La pérdida de la región cromosómica 6q24, donde mapea el gen *PLAGL1*, y la hipermetilación del promotor P1, son eventos recurrentes tanto en líneas celulares de HCC como en muestras de tejido de tumor hepático.
- El nivel de mRNA de *PLAGL1* es significativamente mayor en fibroblastos no tumorales respecto a las líneas celulares de HCC, mientras que la expresión de la proteína es similar en todas las líneas celulares. Sin embargo, diferencias en términos de localización subcelular de la proteína se detectaron entre estos dos tipos celulares. *PLAGL1* es eminentemente citoplasmática en las líneas tumorales hepáticas, mientras que en las células normales se detectó en citoplasma y núcleo.
- En fibroblastos normales se observa una asociación en la dinámica del transcripto y de las proteínas de los genes *PLAGL1* y *p53* durante proliferación celular. Por el contrario, en las líneas tumorales de hígado no se establece este aparente acoplamiento entre la transcripción y la traducción de estos genes. Este comportamiento sugiere que existe una alteración en la vía *PLAGL1-p53* durante la proliferación de células de HCC.
- En fibroblastos normales el nivel de la proteína p21, principal efector de la vía *PLAGL1-p53*, incrementa sostenidamente durante la proliferación celular y es significativamente más elevado que en las líneas celulares de HCC. Este perfil va acompañado de una disminución del porcentaje de células en fase G2/M durante la proliferación de estas células normales.
- El nivel de mRNA de *PPAR $\gamma$*  disminuye significativamente en las células que se encuentran en estado proliferativo, excepto en la línea tumoral Huh7. Sin embargo, el nivel de transcripto de este gen en las células de

hepatoma, excepto SkHep1, fue siempre superior al de los fibroblastos no tumorales.

- El nivel de expresión de la proteína PLAGL1 en muestras de tumor hepático es generalmente menor que en tejido de hígado no tumoral. Además, la localización subcelular de esta proteína es eminentemente citoplasmática en HCC, en contraste con la localización citoplasmática y nuclear detectada en el tejido de hígado normal.
- La sobreexpresión de PLAGL1 induce un incremento significativo de la proteína p21 en un sistema celular donde el eje PLAGL1-p53 no se encuentra alterado.

# Bibliografía

## 8 Bibliografía

- Abbas, T. and A. Dutta, 2009. P21 in cancer: Intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*, 9(6): 400-414. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440234>. DOI 10.1038/nrc2657 nrc2657 [pii].
- Abdollahi, A., A.K. Godwin, P.D. Miller, L.A. Getts, D.C. Schultz, T. Taguchi, J.R. Testa and T.C. Hamilton, 1997. Identification of a gene containing zinc-finger motifs based on lost expression in malignantly transformed rat ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res*, 57(10): 2029-2034. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9158001>.
- Abdollahi, A., D. Pisarcik, D. Roberts, J. Weinstein, P. Cairns and T.C. Hamilton, 2003. Lot1 (plagl1/zac1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. *J Biol Chem*, 278(8): 6041-6049. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473647>. DOI 10.1074/jbc.M210361200 M210361200 [pii].
- Abdollahi, A., D. Roberts, A.K. Godwin, D.C. Schultz, G. Sonoda, J.R. Testa and T.C. Hamilton, 1997. Identification of a zinc-finger gene at 6q25: A chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene*, 14(16): 1973-1979. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150364>. DOI 10.1038/sj.onc.1201034.
- Achatz, M.I., P. Hainaut and P. Ashton-Prolla, 2009. Highly prevalent tp53 mutation predisposing to many cancers in the brazilian population: A case for newborn screening? *Lancet Oncol*, 10(9): 920-925. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19717094>. DOI 10.1016/S1470-2045(09)70089-0 S1470-2045(09)70089-0 [pii].
- Adnani, L., L.M. Langevin, E. Gautier, R. Dixit, K. Parsons, S. Li, G. Kaushik, G. Wilkinson, R. Wilson, S. Childs, M.D. Nguyen, L. Journot, C. Dehay and C. Schuurmans, 2015. Zac1 regulates the differentiation and migration of neocortical neurons via pac1. *J Neurosci*, 35(39): 13430-13447.

- Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26424889>. DOI 10.1523/JNEUROSCI.0777-15.2015 35/39/13430 [pii].
- Alexander, J.J., E.M. Bey, E.W. Geddes and G. Lecatsas, 1976. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S Afr Med J*, 50(54): 2124-2128. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/63998>.
- Arroyo, G.F., A. Gentile and L.A. Parada, 2016. Gallbladder cancer: South american experience. *Chin Clin Oncol*, 5(5): 67. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829280>. DOI 10.21037/cco.2016.10.01.
- Baker, S.J., A.C. Preisinger, J.M. Jessup, C. Paraskeva, S. Markowitz, J.K. Willson, S. Hamilton and B. Vogelstein, 1990. P53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 50(23): 7717-7722. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253215>.
- Barz, T., A. Hoffmann, M. Panhuysen and D. Spengler, 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a zac target gene mediating zac antiproliferation. *Cancer Res*, 66(24): 11975-11982. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178896>. DOI 66/24/11975 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-06-1529.
- Blechacz, B.R. and G.J. Gores, 2008. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis*, 12(1): 131-150, ix. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242501>. DOI 10.1016/j.cld.2007.11.003S1089-3261(07)00112-2 [pii].
- Boccaccio, C. and P.M. Comoglio, 2006. Invasive growth: A met-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer*, 6(8): 637-645. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862193>. DOI nrc1912 [pii] 10.1038/nrc1912.
- Boffetta, P., M. Hashibe, C. La Vecchia, W. Zatonski and J. Rehm, 2006. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer*, 119(4): 884-887. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557583>. DOI 10.1002/ijc.21903.
- Bonofiglio, D., H. Qi, S. Gabriele, S. Catalano, S. Aquila, M. Belmonte and S. Ando, 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits

- follicular and anaplastic thyroid carcinoma cells growth by upregulating p21cip1/waf1 gene in a sp1-dependent manner. *Endocr Relat Cancer*, 15(2): 545-557. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509005>. DOI 15/2/545 [pii] 10.1677/ERC-07-0272.
- Bosetti, C., F. Turati and C. La Vecchia, 2014. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 28(5): 753-770. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260306>. DOI 10.1016/j.bpg.2014.08.007S1521-6918(14)00103-6 [pii].
- Boulter, L., O. Govaere, T.G. Bird, S. Radulescu, P. Ramachandran, A. Pellicoro, R.A. Ridgway, S.S. Seo, B. Spee, N. Van Rooijen, O.J. Sansom, J.P. Iredale, S. Lowell, T. Roskams and S.J. Forbes, 2012. Macrophage-derived wnt opposes notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med*, 18(4): 572-579. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22388089>. DOI 10.1038/nm.2667nm.2667 [pii].
- Boveri, T., 1914. Zur frage der entstehung maligner tumoren. Jena: Verlag von Gustav Fischer.
- Boyer, J.L., 2013. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*, 3(3): 1035-1078. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23897680>. DOI 10.1002/cphy.c120027.
- Bressac, B., K.M. Galvin, T.J. Liang, K.J. Isselbacher, J.R. Wands and M. Ozturk, 1990. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(5): 1973-1977. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2155427>.
- Buendia, M.A., 2000. Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol*, 10(3): 185-200. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10936068>. DOI 10.1006/scbi.2000.0319S1044579X00903195 [pii].
- Buendia, M.A., 2002. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: Common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol*, 39(5): 530-535. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228912>. DOI 10.1002/mpo.10180.

- Buendia, M.A. and C. Neuveut, 2015. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(2): a021444. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25646384>. DOI 10.1101/cshperspect.a021444a021444 [pii] 5/2/a021444 [pii].
- Catalano, O.A., A.H. Singh, R.N. Uppot, P.F. Hahn, C.R. Ferrone and D.V. Sahani, 2008. Vascular and biliary variants in the liver: Implications for liver surgery. *Radiographics*, 28(2): 359-378. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349445>. DOI 10.1148/rg.282075099 28/2/359 [pii].
- Chaudhary, P., U. Bhadana, R.A. Singh and A. Ahuja, 2015. Primary hepatic angiosarcoma. *Eur J Surg Oncol*, 41(9): 1137-1143. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26008857>. DOI 10.1016/j.ejso.2015.04.022S0748-7983(15)00430-8 [pii].
- Cho, Y., S. Gorina, P.D. Jeffrey and N.P. Pavletich, 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265(5170): 346-355. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8023157>.
- Cleary, S.P., W.R. Jeck, X. Zhao, K. Chen, S.R. Selitsky, G.L. Savich, T.X. Tan, M.C. Wu, G. Getz, M.S. Lawrence, J.S. Parker, J. Li, S. Powers, H. Kim, S. Fischer, M. Guindi, A. Ghanekar and D.Y. Chiang, 2013. Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology*, 58(5): 1693-1702. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728943>. DOI 10.1002/hep.26540.
- Clemens, M.G., M. Bauer, C. Gingalewski, E. Miescher and J. Zhang, 1994. Hepatic intercellular communication in shock and inflammation. *Shock*, 2(1): 1-9. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7735978>.
- Couinaud, C., 1957. *Le foie: Etudes anatomiques et chirurgicales*. New York: Masson publishing.
- Crawley, J.J. and K.A. Furge, 2002. Identification of frequent cytogenetic aberrations in hepatocellular carcinoma using gene-expression microarray data. *Genome Biol*, 3(12): RESEARCH0075. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12537564>.
- Cvetkovic, D., D. Pisarcik, C. Lee, T.C. Hamilton and A. Abdollahi, 2004. Altered expression and loss of heterozygosity of the lot1 gene in ovarian

- cancer. *Gynecol Oncol*, 95(3): 449-455. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581945>. DOI S0090-8258(04)00647-X [pii] 10.1016/j.ygyno.2004.08.051.
- Dang, C.V., K.A. O'Donnell, K.I. Zeller, T. Nguyen, R.C. Osthus and F. Li, 2006. The c-myc target gene network. *Semin Cancer Biol*, 16(4): 253-264. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904903>. DOI S1044-579X(06)00065-4 [pii] 10.1016/j.semcancer.2006.07.014.
- Dianzani, M.U., 1987. The role of free radicals in liver damage. *Proc Nutr Soc*, 46(1): 43-52. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3575322>. DOI S0029665187000119 [pii].
- El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, 2007. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 132(7): 2557-2576. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570226>. DOI S0016-5085(07)00799-8 [pii] 10.1053/j.gastro.2007.04.061.
- Fabregat, I., C. Roncero and M. Fernandez, 2007. Survival and apoptosis: A dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int*, 27(2): 155-162. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311609>. DOI LIV1409 [pii] 10.1111/j.1478-3231.2006.01409.x.
- Fiorentino, F.P., E. Tokgun, S. Sole-Sanchez, S. Giampaolo, O. Tokgun, T. Jauset, T. Kohno, M. Perucho, L. Soucek and J. Yokota, 2016. Growth suppression by myc inhibition in small cell lung cancer cells with tp53 and rb1 inactivation. *Oncotarget*, 7(21): 31014-31028. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27105536>. DOI 10.18632/oncotarget.88268826 [pii].
- Fox, B.C., A.S. Devonshire, M.E. Schutte, C.A. Foy, J. Minguez, S. Przyborski, D. Maltman, M. Bokhari and D. Marshall, 2010. Validation of reference gene stability for apap hepatotoxicity studies in different in vitro systems and identification of novel potential toxicity biomarkers. *Toxicol In Vitro*, 24(7): 1962-1970. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732408>. DOI 10.1016/j.tiv.2010.08.007S0887-2333(10)00210-9 [pii].



- Gentile, A., L. Trusolino and P.M. Comoglio, 2008. The met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 27(1): 85-94. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18175071>. DOI 10.1007/s10555-007-9107-6.
- Godlewski, J., B.E. Krazinski, A.E. Kowalczyk, J. Kiewisz, J. Kiezun, P. Kwiatkowski, A. Sliwinska-Jewsiewicka, Z. Maslowski and Z. Kmiec, 2016. Plagl1 (zac1/lot1) expression in clear cell renal cell carcinoma: Correlations with disease progression and unfavorable prognosis. *Anticancer Res*, 36(2): 617-624. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851016>. DOI 36/2/617 [pii].
- Gori, M., B. Barbaro, M. Arciello, R. Maggio, C. Viscomi, A. Longo and C. Balsano, 2014. Protective effect of the y220c mutant p53 against steatosis: Good news? *J Cell Physiol*, 229(9): 1182-1192. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24395441>. DOI 10.1002/jcp.24550.
- Gouas, D.A., H. Shi, A.H. Hautefeuille, S.L. Ortiz-Cuaran, P.C. Legros, K.J. Szymanska, O. Galy, L.A. Egevad, B. Abedi-Ardekani, K.G. Wiman, O. Hantz, C. Caron de Fromentel, I.A. Chemin and P.L. Hainaut, 2010. Effects of the tp53 p.R249s mutant on proliferation and clonogenic properties in human hepatocellular carcinoma cell lines: Interaction with hepatitis b virus x protein. *Carcinogenesis*, 31(8): 1475-1482. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538734>. DOI 10.1093/carcin/bgq118bgq118 [pii].
- Green, M.R. and J. Sambrook, 2012. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Fourth Edition Edn., New York: John Inglis.
- Guichard, C., G. Amaddeo, S. Imbeaud, Y. Ladeiro, L. Pelletier, I.B. Maad, J. Calderaro, P. Bioulac-Sage, M. Letexier, F. Degos, B. Clement, C. Balabaud, E. Chevet, A. Laurent, G. Couchy, E. Letouze, F. Calvo and J. Zucman-Rossi, 2012. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*, 44(6): 694-698. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561517>. DOI 10.1038/ng.2256 ng.2256 [pii].
- Hanahan, D. and R.A. Weinberg, 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5): 646-674. Available from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>. DOI  
10.1016/j.cell.2011.02.013S0092-8674(11)00127-9 [pii].
- Hoffmann, A., T. Barz and D. Spengler, 2006. Multitasking c2h2 zinc fingers link zac DNA binding to coordinated regulation of p300-histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, 26(14): 5544-5557. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809786>. DOI 26/14/5544 [pii] 10.1128/MCB.02270-05.
- Hoffmann, A., E. Ciani, J. Boeckardt, F. Holsboer, L. Journot and D. Spengler, 2003. Transcriptional activities of the zinc finger protein zac are differentially controlled by DNA binding. *Mol Cell Biol*, 23(3): 988-1003. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529403>.
- Hoffmann, A. and D. Spengler, 2008. A new coactivator function for zac1's c2h2 zinc finger DNA-binding domain in selectively controlling pcaf activity. *Mol Cell Biol*, 28(19): 6078-6093. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18663001>. DOI MCB.00842-08 [pii] 10.1128/MCB.00842-08.
- Huang, S.M., S.P. Huang, S.L. Wang and P.Y. Liu, 2007. Importin alpha1 is involved in the nuclear localization of zac1 and the induction of p21waf1/cip1 by zac1. *Biochem J*, 402(2): 359-366. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109628>. DOI BJ20061295 [pii] 10.1042/BJ20061295.
- Huang, S.M., A.H. Schonthal and M.R. Stallcup, 2001. Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator zac1. *Oncogene*, 20(17): 2134-2143. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11360197>. DOI 10.1038/sj.onc.1204298.
- Iacobuzio-Donahue, C. and E. Montgomery (Ed.)^(Eds.), 2011. *Gastrointestinal and liver pathology*. 2nd edition.
- Iglesias-Platas, I., A. Martin-Trujillo, D. Cirillo, F. Court, A. Guillaumet-Adkins, C. Camprubi, D. Bourc'his, K. Hata, R. Feil, G. Tartaglia, P. Arnaud and D. Monk, 2012. Characterization of novel paternal ncRNAs at the *plagl1* locus, including *hymai*, predicted to interact with regulators of active chromatin. *PLoS One*, 7(6): e38907. Available from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22723905>. DOI 10.1371/journal.pone.0038907PONE-D-12-08260 [pii].
- Iwao, C. and Y. Shidoji, 2014. Induction of nuclear translocation of mutant cytoplasmic p53 by geranylgeranoic acid in a human hepatoma cell line. *Sci Rep*, 4: 4419. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658405>. DOI 10.1038/srep04419 srep04419 [pii].
- Jacobs, D.I., Y. Mao, A. Fu, W.K. Kelly and Y. Zhu, 2013. Dysregulated methylation at imprinted genes in prostate tumor tissue detected by methylation microarray. *BMC Urol*, 13: 37. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890537>. DOI 10.1186/1471-2490-13-371471-2490-13-37 [pii].
- Jarmalaite, S., A. Laurinaviciene, J. Tverkuvienė, N. Kalinauskaite, D. Petroska, T. Bohling and K. Husgafvel-Pursiainen, 2011. Tumor suppressor gene *zac/plagl1*: Altered expression and loss of the nonimprinted allele in pheochromocytomas. *Cancer Genet*, 204(7): 398-404. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21872827>. DOI 10.1016/j.cancergen.2011.07.002S2210-7762(11)00187-6 [pii].
- Jeninga, E.H., M. Gurnell and E. Kalkhoven, 2009. Functional implications of genetic variation in human *pparg* gene. *Trends Endocrinol Metab*, 20(8): 380-387. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748282>. DOI S1043-2760(09)00099-X [pii] 10.1016/j.tem.2009.04.005.
- Jones, P.A. and S.B. Baylin, 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3(6): 415-428. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042769>. DOI 10.1038/nrg816nrg816 [pii].
- Kakar, S., X. Chen, C. Ho, L.J. Burgart, O. Adeyi, D. Jain, V. Sahai and L.D. Ferrell, 2009. Chromosomal abnormalities determined by comparative genomic hybridization are helpful in the diagnosis of atypical hepatocellular neoplasms. *Histopathology*, 55(2): 197-205. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19694827>. DOI 10.1111/j.1365-2559.2009.03343.xHIS3343 [pii].
- Kamiya, M., H. Judson, Y. Okazaki, M. Kusakabe, M. Muramatsu, S. Takada, N. Takagi, T. Arima, N. Wake, K. Kamimura, K. Satomura, R. Hermann,

- D.T. Bonthron and Y. Hayashizaki, 2000. The cell cycle control gene *zac/plagl1* is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*, 9(3): 453-460. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655556>. DOI ddd045 [pii].
- Kan, Z., H. Zheng, X. Liu, S. Li, T.D. Barber, Z. Gong, H. Gao, K. Hao, M.D. Willard, J. Xu, R. Hauptschein, P.A. Rejto, J. Fernandez, G. Wang, Q. Zhang, B. Wang, R. Chen, J. Wang, N.P. Lee, W. Zhou, Z. Lin, Z. Peng, K. Yi, S. Chen, L. Li, X. Fan, J. Yang, R. Ye, J. Ju, K. Wang, H. Estrella, S. Deng, P. Wei, M. Qiu, I.H. Wulur, J. Liu, M.E. Ehsani, C. Zhang, A. Loboda, W.K. Sung, A. Aggarwal, R.T. Poon, S.T. Fan, J. Hardwick, C. Reinhard, H. Dai, Y. Li, J.M. Luk and M. Mao, 2013. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Res*, 23(9): 1422-1433. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23788652>. DOI 10.1101/gr.154492.113gr.154492.113 [pii].
- Kaposi-Novak, P., J.S. Lee, L. Gomez-Quiroz, C. Coulouarn, V.M. Factor and S.S. Thorgeirsson, 2006. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*, 116(6): 1582-1595. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710476>. DOI 10.1172/JCI27236.
- Kas, K., M.L. Voz, K. Hensen, E. Meyen and W.J. Van de Ven, 1998. Transcriptional activation capacity of the novel *plag* family of zinc finger proteins. *J Biol Chem*, 273(36): 23026-23032. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722527>.
- Katoh, H., T. Shibata, A. Kokubu, H. Ojima, M. Fukayama, Y. Kanai and S. Hirohashi, 2006. Epigenetic instability and chromosomal instability in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, 168(4): 1375-1384. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565510>. DOI S0002-9440(10)62713-7 [pii] 10.2353/ajpath.2006.050989.
- Kim, M.S., E.J. Lee, H.R. Kim and A. Moon, 2003. P38 kinase is a key signaling molecule for h-ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res*, 63(17): 5454-5461. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500381>.

- Kishnani, P.S., T.P. Chuang, D. Bali, D. Koeberl, S. Austin, D.A. Weinstein, E. Murphy, Y.T. Chen, K. Boyette, C.H. Liu and L.H. Li, 2009. Chromosomal and genetic alterations in human hepatocellular adenomas associated with type ia glycogen storage disease. *Hum Mol Genet*, 18(24): 4781-4790. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762333>. DOI 10.1093/hmg/ddp441ddp441 [pii].
- Knolle, P.A. and G. Gerken, 2000. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*, 174: 21-34. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807504>.
- Knudsen, E.S., P. Gopal and A.G. Singal, 2014. The changing landscape of hepatocellular carcinoma: Etiology, genetics, and therapy. *Am J Pathol*, 184(3): 574-583. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24388934>. DOI 10.1016/j.ajpath.2013.10.028S0002-9440(13)00799-2 [pii].
- Knudson, A.G., Jr., 1971. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4): 820-823. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5279523>.
- Knudson, A.G., Jr., 1985. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, 45(4): 1437-1443. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983882>.
- Knudson, A.G., Jr., 1987. Prince takamatsu memorial lecture. Rare cancers: Clues to genetic mechanisms. *Princess Takamatsu Symp*, 18: 221-231. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2852189>.
- Koga, H., S. Sakisaka, M. Harada, T. Takagi, S. Hanada, E. Taniguchi, T. Kawaguchi, K. Sasatomi, R. Kimura, O. Hashimoto, T. Ueno, H. Yano, M. Kojiro and M. Sata, 2001. Involvement of p21(waf1/cip1), p27(kip1), and p18(ink4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology*, 33(5): 1087-1097. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343236>. DOI S0270-9139(01)79844-8 [pii] 10.1053/jhep.2001.24024.
- Kowalczyk, A.E., B.E. Krazinski, J. Godlewski, J. Kiewisz, P. Kwiatkowski, A. Sliwinska-Jewsiewicka, J. Kiezun, P.M. Wierzbicki, G. Bodek, M. Sulik and Z. Kmiec, 2015. Altered expression of the plagl1 (zac1/lot1) gene in colorectal cancer: Correlations to the clinicopathological parameters. *Int*

- J Oncol, 47(3): 951-962. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134521>. DOI 10.3892/ijo.2015.3067.
- Kufe, D., R. Pollock, R. Weichselbaum, R. Bast, T. Gansler, J. Holland and M. Frei, 2003. Cancer medicine. 6th edition. 6th Edition Edn., Hamilton (ON).
- Lautt, W.W., 2009. Hepatic circulation. Physiology and pathophysiology. 2012/10/27 Edn., San Rafael (CA).
- Leal, M., E. Lima, P. Silva, P. Assumpcao, D. Calcagno, S. Payao, R.R. Burbano and M. Smith, 2007. Promoter hypermethylation of cdh1, fhit, mta1 and plgl1 in gastric adenocarcinoma in individuals from northern brazil. World J Gastroenterol, 13(18): 2568-2574. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17552003>.
- Levy, L., C.A. Renard, Y. Wei and M.A. Buendia, 2002. Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. Ann N Y Acad Sci, 963: 21-36. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095925>.
- Li, L.C. and R. Dahiya, 2002. Methprimer: Designing primers for methylation pcrs. Bioinformatics, 18(11): 1427-1431. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424112>.
- Li, Z., Y. Ding, Y. Zhu, M. Yin, X. Le, L. Wang, Y. Yang and Q. Zhang, 2014. Both gene deletion and promoter hyper-methylation contribute to the down-regulation of zac/plgl1 gene in gastric adenocarcinomas: A case control study. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 38(6): 744-750. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091631>. DOI 10.1016/j.clinre.2013.06.007S2210-7401(13)00137-X [pii].
- Liu, P.Y., J.Y. Chan, H.C. Lin, S.L. Wang, S.T. Liu, C.L. Ho, L.C. Chang and S.M. Huang, 2008. Modulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(waf1/cip1) gene by zac1 through the antagonistic regulators p53 and histone deacetylase 1 in hela cells. Mol Cancer Res, 6(7): 1204-1214. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644983>. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-08-0123. DOI 6/7/1204 [pii]
- Liu, P.Y., T.Y. Hsieh, S.T. Liu, Y.L. Chang, W.S. Lin, W.M. Wang and S.M. Huang, 2011. Zac1, an sp1-like protein, regulates human p21(waf1/cip1)

- gene expression in hela cells. *Exp Cell Res*, 317(20): 2925-2937. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001409>. DOI S0014-4827(11)00394-6 [pii] 10.1016/j.yexcr.2011.09.018.
- Lozano, G., 2010. Mouse models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(4): a001115. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452944>. DOI 10.1101/cshperspect.a001115cshperspect.a001115 [pii].
- Machado-Silva, A., S. Perrier and J.C. Bourdon, 2010. P53 family members in cancer diagnosis and treatment. *Semin Cancer Biol*, 20(1): 57-62. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206267>. DOI 10.1016/j.semcancer.2010.02.005S1044-579X(10)00006-4 [pii].
- Maitland, M.L. and R.L. Schilsky, 2011. Clinical trials in the era of personalized oncology. *CA Cancer J Clin*, 61(6): 365-381. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22034206>. DOI 10.3322/caac.20135.
- Maroun, C.R. and T. Rowlands, 2014. The met receptor tyrosine kinase: A key player in oncogenesis and drug resistance. *Pharmacol Ther*, 142(3): 316-338. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24384534>. DOI 10.1016/j.pharmthera.2013.12.014S0163-7258(13)00256-8 [pii].
- May, P. and E. May, 1999. Twenty years of p53 research: Structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, 18(53): 7621-7636. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618702>. DOI 10.1038/sj.onc.1203285.
- Midorikawa, Y., S. Yamamoto, S. Ishikawa, N. Kamimura, H. Igarashi, H. Sugimura, M. Makuuchi and H. Aburatani, 2006. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*, 25(40): 5581-5590. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16785998>. DOI 1209537 [pii] 10.1038/sj.onc.1209537.
- Minguez, B., V. Tovar, D. Chiang, A. Villanueva and J.M. Llovet, 2009. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies. *Curr Opin Gastroenterol*, 25(3): 186-194. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19387255>. DOI 10.1097/MOG.0b013e32832962a100001574-200905000-00005 [pii].

- Mittal, S. and H.B. El-Serag, 2013. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: Consider the population. *J Clin Gastroenterol*, 47 Suppl: S2-6. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632345>. DOI 10.1097/MCG.0b013e3182872f29.
- Murakami, Y., K. Saigo, H. Takashima, M. Minami, T. Okanoue, C. Brechot and P. Paterlini-Brechot, 2005. Large scaled analysis of hepatitis b virus (hbv) DNA integration in hbv related hepatocellular carcinomas. *Gut*, 54(8): 1162-1168. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009689>. DOI 54/8/1162 [pii] 10.1136/gut.2004.054452.
- Oren, M. and V. Rotter, 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(2): a001107. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182618>. DOI 10.1101/cshperspect.a001107.
- Ortega, J.F., A. de Conti, V. Tryndyak, K.S. Furtado, R. Heidor, M.A. Horst, L.H. Fernandes, P.E. Tavares, M. Pogribna, S. Shpyleva, F.A. Beland, I.P. Pogribny and F.S. Moreno, 2016. Suppressing activity of tributyrin on hepatocarcinogenesis is associated with inhibiting the p53-crm1 interaction and changing the cellular compartmentalization of p53 protein. *Oncotarget*, 7(17): 24339-24347. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27013579>. DOI 10.18632/oncotarget.82488248 [pii].
- Pagotto, U., T. Arzberger, M. Theodoropoulou, Y. Grubler, C. Pantaloni, W. Saeger, M. Losa, L. Journot, G.K. Stalla and D. Spengler, 2000. The expression of the antiproliferative gene zac is lost or highly reduced in nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Res*, 60(24): 6794-6799. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11156367>.
- Pancione, M., L. Sabatino, A. Fucci, V. Carafa, A. Nebbioso, N. Forte, A. Febbraro, D. Parente, C. Ambrosino, N. Normanno, L. Altucci and V. Colantuoni, 2010. Epigenetic silencing of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a biomarker for colorectal cancer progression and adverse patients' outcome. *PLoS One*, 5(12): e14229. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21151932>. DOI 10.1371/journal.pone.0014229.



- Pang, A., I.O. Ng, S.T. Fan and Y.L. Kwong, 2003. Clinicopathologic significance of genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 146(1): 8-15. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499690>. DOI S0165460803001031 [pii].
- Panigrahy, D., L.Q. Shen, M.W. Kieran and A. Kaipainen, 2003. Therapeutic potential of thiazolidinediones as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs*, 12(12): 1925-1937. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640937>. DOI 10.1517/13543784.12.12.1925.
- Parada, L.A., 1999. Cytogenetics of primary and metastatic hepatobiliary neoplasms. In: Department of Clinical Genetics. Lund University, Lund.
- Parada, L.A., M. Hallen, K.G. Tranberg, I. Hagerstrand, L. Bondeson, F. Mitelman and B. Johansson, 1998. Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7, and 8 in primary liver cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 23(1): 26-35. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713994>. DOI 10.1002/(SICI)1098-2264(199809)23:1<26::AID-GCC5>3.0.CO;2-8 [pii].
- Parada, L.A., J. Limon, M. Iliszko, P. Czauderna, D. Gisselsson, M. Hoglund, C.M. Kullendorff, T. Wiebe, F. Mertens and B. Johansson, 2000. Cytogenetics of hepatoblastoma: Further characterization of 1q rearrangements by fluorescence in situ hybridization: An international collaborative study. *Med Pediatr Oncol*, 34(3): 165-170. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696121>. DOI 10.1002/(SICI)1096-911X(200003)34:3<165::AID-MPO1>3.0.CO;2-T [pii].
- Paradis, V., 2013. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *Recent Results Cancer Res*, 190: 21-32. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941011>. DOI 10.1007/978-3-642-16037-0\_2.
- Perilongo, G. and E.A. Shafford, 1999. Liver tumours. *Eur J Cancer*, 35(6): 953-958; discussion 958-959. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10533478>. DOI S0959-8049(99)00049-0 [pii].

- Petitjean, A., M.I. Achatz, A.L. Borresen-Dale, P. Hainaut and M. Olivier, 2007. Tp53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 26(15): 2157-2165. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401424>. DOI 1210302 [pii] 10.1038/sj.onc.1210302.
- Piras, G., A. El Kharroubi, S. Kozlov, D. Escalante-Alcalde, L. Hernandez, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins and C.L. Stewart, 2000. Zac1 (lot1), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes: Identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol Cell Biol*, 20(9): 3308-3315. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757814>.
- Prochownik, E.V., 2008. C-myc: Linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med*, 8(6): 446-458. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781952>.
- Rappaport, A.M., 1973. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res*, 6(2): 212-228. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4748021>.
- Razumilava, N. and G.J. Gores, 2013. Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11(1): 13-21 e11; quiz e13-14. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22982100>. DOI 10.1016/j.cgh.2012.09.009S1542-3565(12)01050-6 [pii].
- Ribarska, T., W. Goering, J. Droop, K.M. Bastian, M. Ingenwerth and W.A. Schulz, 2014. Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer. *Epigenetics*, 9(5): 704-717. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513574>. DOI 10.4161/epi.2800628006 [pii].
- Robinson, W.S., 1994. Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. *Annu Rev Med*, 45: 297-323. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198385>. DOI 10.1146/annurev.med.45.1.297.
- Rockey, D., 1997. The cellular pathogenesis of portal hypertension: Stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology*, 25(1): 2-5. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985256>. DOI 10.1053/jhep.1997.v25.ajhep0250002S0270-9139(97)00001-3 [pii].

- Roessler, S., E.L. Long, A. Budhu, Y. Chen, X. Zhao, J. Ji, R. Walker, H.L. Jia, Q.H. Ye, L.X. Qin, Z.Y. Tang, P. He, K.W. Hunter, S.S. Thorgeirsson, P.S. Meltzer and X.W. Wang, 2012. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival. *Gastroenterology*, 142(4): 957-966 e912. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202459>. DOI 10.1053/j.gastro.2011.12.039S0016-5085(11)01771-9 [pii].
- Ross, M. and W. Pawlina, 2007. *Histología. Texto y atlas en color con biología celular y molecular*. 5ª edición. Buenos Aires.
- Royo, F., N. Paz, L. Espinosa, P.G. McQueen, L. Vellon and L.A. Parada, 2009. Spatial link between nucleoli and expression of the *zac1* gene. *Chromosoma*, 118(6): 711-722. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649645>. DOI 10.1007/s00412-009-0229-1.
- Rozenfeld-Granot, G., J. Krishnamurthy, K. Kannan, A. Toren, N. Amariglio, D. Givol and G. Rechavi, 2002. A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of *apaf-1* by p53 and the coactivator *zac-1*. *Oncogene*, 21(10): 1469-1476. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896574>. DOI 10.1038/sj.onc.1205218.
- Rraklli, V., E. Sodersten, U. Nyman, D.W. Hagey and J. Holmberg, 2016. Elevated levels of *zac1* disrupt neurogenesis and promote rapid in vivo reprogramming. *Stem Cell Res*, 16(1): 1-9. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610203>. DOI 10.1016/j.scr.2015.11.002S1873-5061(15)00155-5 [pii].
- Ryan, B.M. and J.M. Faupel-Badger, 2016. The hallmarks of premalignant conditions: A molecular basis for cancer prevention. *Semin Oncol*, 43(1): 22-35. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26970122>. DOI 10.1053/j.seminoncol.2015.09.007S0093-7754(15)00172-4 [pii].
- Schaefer, K.L., K. Wada, H. Takahashi, N. Matsuhashi, S. Ohnishi, M.M. Wolfe, J.R. Turner, A. Nakajima, S.C. Borkan and L.J. Saubermann, 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition prevents adhesion to the extracellular matrix and induces anoikis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 65(6): 2251-2259. Available from

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781638>. DOI 65/6/2251 [pii]  
10.1158/0008-5472.CAN-04-3037.
- Schaffer, B.S., M.F. Lin, J.C. Byrd, J.H. Park and R.G. MacDonald, 2003. Opposing roles for the insulin-like growth factor (igf)-ii and mannose 6-phosphate (man-6-p) binding activities of the igf-ii/man-6-p receptor in the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology*, 144(3): 955-966. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586773>.
- Schlageter, M., L.M. Terracciano, S. D'Angelo and P. Sorrentino, 2014. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 20(43): 15955-15964. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473149>. DOI 10.3748/wjg.v20.i43.15955.
- Schmidt-Edelkraut, U., G. Daniel, A. Hoffmann and D. Spengler, 2014. Zac1 regulates cell cycle arrest in neuronal progenitors via tcf4. *Mol Cell Biol*, 34(6): 1020-1030. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24396065>. DOI 10.1128/MCB.01195-13MCB.01195-13 [pii].
- Schulze, K., S. Imbeaud, E. Letouze, L.B. Alexandrov, J. Calderaro, S. Rebouissou, G. Couchy, C. Meiller, J. Shinde, F. Soysouvanh, A.L. Calatayud, R. Pinyol, L. Pelletier, C. Balabaud, A. Laurent, J.F. Blanc, V. Mazzaferro, F. Calvo, A. Villanueva, J.C. Nault, P. Bioulac-Sage, M.R. Stratton, J.M. Llovet and J. Zucman-Rossi, 2015. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Genet*, 47(5): 505-511. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822088>. DOI 10.1038/ng.3252ng.3252 [pii].
- Schulze, K., J.C. Nault and A. Villanueva, 2016. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *J Hepatol*, 65(5): 1031-1042. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27262756>. DOI S0168-8278(16)30249-5 [pii] 10.1016/j.jhep.2016.05.035.
- Shen, B., E.S. Chu, G. Zhao, K. Man, C.W. Wu, J.T. Cheng, G. Li, Y. Nie, C.M. Lo, N. Teoh, G.C. Farrell, J.J. Sung and J. Yu, 2012. Ppargamma inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice. *Br J Cancer*.

- Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22472882>. DOI 10.1038/bjc.2012.130bjc2012130 [pii].
- Shin, I., S. Kim, H. Song, H.R. Kim and A. Moon, 2005. H-ras-specific activation of rac-mkk3/6-p38 pathway: Its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells. *J Biol Chem*, 280(15): 14675-14683. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15677464>. DOI M411625200 [pii] 10.1074/jbc.M411625200.
- Shiraki, K. and H. Wagayama, 2006. Cytoplasmic p21(waf1/cip1) expression in human hepatocellular carcinomas. *Liver Int*, 26(8): 1018-1019. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16953844>. DOI LIV1320 [pii] 10.1111/j.1478-3231.2006.01320.x.
- Shu, G., Y. Tang, Y. Zhou, C. Wang and J.G. Song, 2011. Zac1 is a histone acetylation-regulated nf-kappab suppressor that mediates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 18(12): 1825-1835. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546906>. DOI 10.1038/cdd.2011.51cdd201151 [pii].
- Sia, D. and A. Villanueva, 2011. Signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 81 Suppl 1: 18-23. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22212931>. DOI 10.1159/000333254 000333254 [pii].
- Simon, D., B.B. Knowles and A. Weith, 1991. Abnormalities of chromosome 1 and loss of heterozygosity on 1p in primary hepatomas. *Oncogene*, 6(5): 765-770. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646986>.
- Sipos, F., G. Firneisz and G. Muzes, 2016. Therapeutic aspects of c-myc signaling in inflammatory and cancerous colonic diseases. *World J Gastroenterol*, 22(35): 7938-7950. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27672289>. DOI 10.3748/wjg.v22.i35.7938.
- Spengler, D., M. Villalba, A. Hoffmann, C. Pantaloni, S. Houssami, J. Bockaert and L. Journot, 1997. Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J*, 16(10): 2814-2825. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9184226>. DOI 10.1093/emboj/16.10.2814.

- Suad, O., H. Rozenberg, R. Brosh, Y. Diskin-Posner, N. Kessler, L.J. Shimon, F. Frolov, A. Liran, V. Rotter and Z. Shakked, 2009. Structural basis of restoring sequence-specific DNA binding and transactivation to mutant p53 by suppressor mutations. *J Mol Biol*, 385(1): 249-265. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996393>. DOI 10.1016/j.jmb.2008.10.063S0022-2836(08)01366-1 [pii].
- Tan, L., T. Meier, M. Kuhlmann, F. Xie, C. Baier, Z. Zhu, W.M. Cong and L. Wilkens, 2016. Distinct set of chromosomal aberrations in childhood hepatocellular carcinoma is correlated to hepatitis b virus infection. *Cancer Genet*, 209(3): 87-96. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26837720>. DOI 10.1016/j.cancergen.2015.12.010S2210-7762(15)00258-6 [pii].
- Tarrado-Castellarnau, M., P. de Atauri and M. Cascante, 2016. Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. *Oncotarget*, 7(38): 62726-62753. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040803>. DOI 10.18632/oncotarget.1091110911 [pii].
- Theodoropoulou, M., G.K. Stalla and D. Spengler, 2010. Zac1 target genes and pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 326(1-2): 60-65. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20117169>. DOI S0303-7207(10)00051-1 [pii] 10.1016/j.mce.2010.01.033.
- Theodoropoulou, M., M.A. Tichomirowa, C. Sievers, A. Yassouridis, T. Arzberger, O. Hougrand, M. Deprez, A.F. Daly, P. Petrossians, U. Pagotto, A. Beckers and G.K. Stalla, 2009. Tumor zac1 expression is associated with the response to somatostatin analog therapy in patients with acromegaly. *Int J Cancer*, 125(9): 2122-2126. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637311>. DOI 10.1002/ijc.24602.
- Theodoropoulou, M., J. Zhang, S. Laupheimer, M. Paez-Pereda, C. Erneux, T. Florio, U. Pagotto and G.K. Stalla, 2006. Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing zac1 expression. *Cancer Res*, 66(3): 1576-1582. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452215>. DOI 66/3/1576 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-05-1189.

- Tortora, G. and S. Grabowski, 2003. Principles of anatomy and physiology. 10th edition. 10th Edition Edn.: John Wiley & Sons.
- Totoki, Y., K. Tatsuno, K.R. Covington, H. Ueda, C.J. Creighton, M. Kato, S. Tsuji, L.A. Donehower, B.L. Slagle, H. Nakamura, S. Yamamoto, E. Shinbrot, N. Hama, M. Lehmkuhl, F. Hosoda, Y. Arai, K. Walker, M. Dahdouli, K. Gotoh, G. Nagae, M.C. Gingras, D.M. Muzny, H. Ojima, K. Shimada, Y. Midorikawa, J.A. Goss, R. Cotton, A. Hayashi, J. Shibahara, S. Ishikawa, J. Guiteau, M. Tanaka, T. Urushidate, S. Ohashi, N. Okada, H. Doddapaneni, M. Wang, Y. Zhu, H. Dinh, T. Okusaka, N. Kokudo, T. Kosuge, T. Takayama, M. Fukayama, R.A. Gibbs, D.A. Wheeler, H. Aburatani and T. Shibata, 2014. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*, 46(12): 1267-1273. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25362482>. DOI 10.1038/ng.3126ng.3126 [pii].
- Tsubouchi, Y., H. Sano, Y. Kawahito, S. Mukai, R. Yamada, M. Kohno, K. Inoue, T. Hla and M. Kondo, 2000. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 270(2): 400-405. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753637>. DOI 10.1006/bbrc.2000.2436 S0006291X00924367 [pii].
- Tsuda, H., W.D. Zhang, Y. Shimosato, J. Yokota, M. Terada, T. Sugimura, T. Miyamura and S. Hirohashi, 1990. Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(17): 6791-6794. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168560>.
- Valleley, E.M., S.F. Cordery and D.T. Bonthron, 2007. Tissue-specific imprinting of the *zac/plagl1* tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet*, 16(8): 972-981. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341487>. DOI ddm041 [pii] 10.1093/hmg/ddm041.
- Valleley, E.M., S.F. Cordery, I.M. Carr, K.A. MacLennan and D.T. Bonthron, 2010. Loss of expression of *zac/plagl1* in diffuse large b-cell lymphoma is independent of promoter hypermethylation. *Genes Chromosomes*

- Cancer, 49(5): 480-486. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20175198>. DOI 10.1002/gcc.20758.
- Varrault, A., B. Bilanges, D.J. Mackay, E. Basyuk, B. Ahr, C. Fernandez, D.O. Robinson, J. Bockaert and L. Journot, 2001. Characterization of the methylation-sensitive promoter of the imprinted zac gene supports its role in transient neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 276(22): 18653-18656. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297535>. DOI 10.1074/jbc.C100095200C100095200 [pii].
- Varrault, A., E. Ciani, F. Apiou, B. Bilanges, A. Hoffmann, C. Pantaloni, J. Bockaert, D. Spengler and L. Journot, 1998. Hzac encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15): 8835-8840. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671765>.
- Vega-Benedetti, A.F., C. Saucedo, P. Zavattari, R. Vanni, J.L. Zugaza and L.A. Parada, 2017. Plagl1: An important player in diverse pathological processes. *J Appl Genet*, 58(1): 71-78. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311313>. DOI 10.1007/s13353-016-0355-4 10.1007/s13353-016-0355-4 [pii].
- Veltman, J.A., J. Fridlyand, S. Pejavar, A.B. Olshen, J.E. Korkola, S. DeVries, P. Carroll, W.L. Kuo, D. Pinkel, D. Albertson, C. Cordon-Cardo, A.N. Jain and F.M. Waldman, 2003. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res*, 63(11): 2872-2880. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782593>.
- Vieria Neto, L., L.E. Wildemberg, L.M. Colli, L. Kasuki, N.V. Marques, A.B. Moraes, E.L. Gasparetto, C.M. Takiya, M. Castro and M.R. Gadelha, 2013. Zac1 and sstr2 are downregulated in non-functioning pituitary adenomas but not in somatotropinomas. *PLoS One*, 8(10): e77406. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098585>. DOI 10.1371/journal.pone.0077406 PONE-D-13-19327 [pii].
- Villanueva, A., P. Newell, D.Y. Chiang, S.L. Friedman and J.M. Llovet, 2007. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis*, 27(1): 55-76. Available from



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295177>. DOI 10.1055/s-2006-960171.
- Wang, J., X. Chenivresse, B. Henglein and C. Brechot, 1990. Hepatitis b virus integration in a cyclin a gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature*, 343(6258): 555-557. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1967822>. DOI 10.1038/343555a0.
- Wang, W.M., S.T. Liu, S.M. Huang, W.S. Lin, S.G. Chen and Y.L. Chang, 2011. Zac1 functional interactions mediate ap-1 transcriptional activity. *Biochim Biophys Acta*, 1813(12): 2050-2060. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864583>. DOI S0167-4889(11)00224-2 [pii] 10.1016/j.bbamcr.2011.08.005.
- Warfel, N.A. and W.S. El-Deiry, 2013. P21waf1 and tumorigenesis: 20 years after. *Curr Opin Oncol*, 25(1): 52-58. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23159848>. DOI 10.1097/CCO.0b013e32835b639e.
- Weinberg, R.A., 2007. *The biology of cancer*. New York: Garland Science. Taylor and Francis Group.
- Wong, N., P. Lai, E. Pang, T.W. Leung, J.W. Lau and P.J. Johnson, 2000. A comprehensive karyotypic study on human hepatocellular carcinoma by spectral karyotyping. *Hepatology*, 32(5): 1060-1068. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050057>. DOI S0270913900691644 [pii] 10.1053/jhep.2000.19349.
- Wong, N., W. Yeo, W.L. Wong, N.L. Wong, K.Y. Chan, F.K. Mo, J. Koh, S.L. Chan, A.T. Chan, P.B. Lai, A.K. Ching, J.H. Tong, H.K. Ng, P.J. Johnson and K.F. To, 2009. Top2a overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int J Cancer*, 124(3): 644-652. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003983>. DOI 10.1002/ijc.23968.
- Wu, C.W., G.C. Farrell and J. Yu, 2012. Functional role of ppargamma in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742931>. DOI 10.1111/j.1440-1746.2012.07213.x.
- Yousefi, B., M. Rahmati and Y. Ahmadi, 2014. The roles of p53r2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic

- p21. Life Sci, 99(1-2): 14-17. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486301>. DOI 10.1016/j.lfs.2014.01.063S0024-3205(14)00165-9 [pii].
- Yu, J., B. Shen, E.S. Chu, N. Teoh, K.F. Cheung, C.W. Wu, S. Wang, C.N. Lam, H. Feng, J. Zhao, A.S. Cheng, K.F. To, H.L. Chan and J.J. Sung, 2010. Inhibitory role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in hepatocarcinogenesis in mice and in vitro. *Hepatology*, 51(6): 2008-2019. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512989>. DOI 10.1002/hep.23550.
- Yu, M.C. and J.M. Yuan, 2004. Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5 Suppl 1): S72-78. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15508106>. DOI S0016508504015975 [pii].
- Zhang, J. and A. Babic, 2016. Regulation of the met oncogene: Molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 37(4): 345-355. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26905592>. DOI 10.1093/carcin/bgw015bgw015 [pii].