

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN:

QUÍMICA MEDICINAL

**“Expresión de las semaforinas y plexinas en el desarrollo del
cáncer hepático experimental en rata”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ MICHAEL MARTÍNEZ GARCÉS

2181800799

COMITÉ TUTORAL

Cotutor: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Cotutor: Dr. Julio Isael Pérez Carreón

Asesor: Dra. Beatriz Godínez Chaparro

Junio/2021

**“Expresión de las semaforinas y plexinas en el desarrollo del cáncer
hepático experimental en rata”**

Visto bueno (Vo.Bo) del Comité Tutorial



Vo.Bo

Cotutor: María Angélica Gutiérrez Nava

Vo.Bo

Cotutor: Dr. Julio Isael Pérez Carreón



Vo.Bo

Asesor: Dra. Beatriz Godínez Chaparro



Alumno: Q.F.B. José Michael Martínez Garcés

Matricula: 2181800799

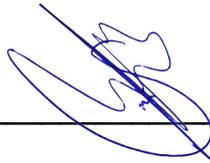
**“Expresión de las semaforinas y plexinas en el desarrollo del cáncer
hepático experimental en rata”**

Visto bueno (Vo.Bo) del Jurado de Examen



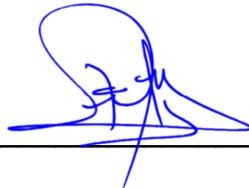
Vo.Bo

Presidente: Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo



Vo.Bo

Vocal: Dr. Jaime Arellanes Robledo



Vo.Bo

Secretario: Dra. María Angelica Gutiérrez Nava

Resumen

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el principal tipo de cáncer del hígado y el segundo con mayor mortalidad a nivel mundial. La principal causa del CHC corresponde al daño hepático crónico ocasionado por la infección con el virus de la hepatitis C o virus de la hepatitis B, así como el consumo de sustancias hepatotóxicas. Un estudio previo en nuestro laboratorio mostró variaciones semicuantitativas en la expresión de genes miembros de las familias de las semaforinas, plexinas y neuropilinas en un modelo de hepatocarcinogénesis experimental. Así, el objetivo del trabajo fue determinar cambios en la cantidad de los productos génicos (ARNm y proteína) de tres genes semaforinas, dos genes plexinas y dos neuropilinas en un modelo de hepatocarcinogénesis química.

Se utilizó un modelo de hepatocarcinogénesis inducida por el carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) en ratas Fischer 344 y Wistar donde se analizaron cuatro momentos del desarrollo del cáncer, 6, 12, 18 y 22 semanas. La expresión relativa de los genes en el hígado se determinó por RT-qPCR a partir de muestras hepáticas congeladas. La expresión de las proteínas se analizó mediante western blot y la localización histológica se observó por inmunofluorescencia y microscopía.

Se observó un aumento gradual en la expresión (ARNm) de *Sema3E*, *Sema6A*, *Sema3B*, *PlxnD1*, *Plxn3A*, *Nrp-1* y *Nrp-2* en ratas Fischer 344, que es más susceptible a la inducción de tumores que en ratas Wistar. El aumento en el nivel de ARNm no mantuvo relación con los respectivos niveles de proteína analizados (SEMA6A, SEMA3B y NRP-1). La localización histológica de las proteínas SEMA3B y NRP-1 se observó en el citoplasma de los hepatocitos normales y en las muestras experimentales. La expresión de SEMA6A se observó en el núcleo de hepatocitos normales del hígado normal y las muestras experimentales de 6 y hasta la semana 18, mientras que en la semana 22 se observó en el citoplasma de los hepatocitos. En conclusión, se encontró un incremento en la expresión de los genes semaforinas, plexinas y neuropilinas a nivel de ARNm, sin embargo, no se encontró una relación entre el nivel de ARNm y los niveles de proteína, mostrando una complejidad en las funciones que desempeñan durante el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

Agradecimientos institucionales

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Enfermedades Hepáticas del Instituto Nacional de Medicina Genómica bajo la dirección del Dr. Julio Isael Pérez Carreón y en el laboratorio de Ecología Microbiana de la Unidad Interdisciplinaria de Docencia e Investigación y Servicio (UIDIS) perteneciente al Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco bajo la dirección de la Dra. María Angelica Gutiérrez Nava.

Gracias a CONACYT por la beca otorgada con el número de CVU 894797. Y al financiamiento CONACYT 85552.

Índice

Introducción	8
Marco teórico	9
Cáncer	9
Carcinoma hepatocelular	9
Factores de riesgo para el CHC e historia natural del carcinoma.....	10
Marcadores del CHC.....	10
Estudios de expresión de genes en el CHC.....	11
Modelos animales de hepatocarcinogénesis	12
Dos modelos de hepatocarcinogénesis: Modelo de Schiffer y modelo de Solt & Farber	13
Antecedente directo	15
Semaforinas.....	17
Expresión de las semaforinas en el cáncer	18
Plexinas: Receptores de semaforinas.....	19
Neuropilinas: Receptores y co-receptores	20
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
General.....	25
Particulares.....	25
Material y métodos.....	26
Animales de experimentación.....	26
Obtención de muestras.....	26
Determinación de la expresión genética por RT-qPCR	27
Purificación del ARN	27
RT-qPCR: Obtención de cDNA y PCR en tiempo real	28
Análisis de expresión de proteínas por Western blot.....	30
Localización histológica por inmunofluorescencia.....	31
Análisis estadístico.....	31
Resultados	32
Purificación de ARN total	32
Integridad de ARN total.....	33

Cambio en la expresión genética de la semaforinas	34
Cambios en la expresión genética de las semaforinas en ratas Fischer 344	35
Cambios en la expresión genética de las semaforinas en ratas Wistar	35
Cambios en la expresión genética de las plexinas	36
Cambios de expresión genética de las neuropilinas	38
Localización histológica de las semaforinas en la hepatocarcinogénesis experimental	40
Localización de SEMA6A en la hepatocarcinogénesis experimental	40
Localización de SEMA3B en la hepatocarcinogénesis experimental	41
Localización de la SEMA3E en la hepatocarcinogénesis experimental	41
Localización de la NRP-1 en la hepatocarcinogénesis experimental	42
Expresión de las proteínas semaforinas en la hepatocarcinogénesis	42
Cambios de la SEMA6A en la hepatocarcinogénesis experimental	42
Cambios de la SEMA3B en la hepatocarcinogénesis experimental	45
Cambios de la NRP-1 en la hepatocarcinogénesis experimental	47
Discusión	48
Sema3E	48
PlexinaD1	49
PLEXINA3A	50
NRP-2	51
NRP-1	52
SEMA6A	53
SEMA3B	56
Conclusiones	60
Perspectivas	61
Referencias	62

Introducción

El término cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades, caracterizadas por células que han perdido la capacidad de controlar su crecimiento, diferenciación y migración celular; y como resultado, puede afectar a cualquier parte del cuerpo [1]. Los daños al ADN son la principal causa de la enfermedad, este daño puede ser causado por diferentes agentes entre los cuales están los físicos, biológicos y químicos.

El cáncer de hígado representa la segunda causa de muerte relacionada con cáncer y hasta el 90 % de los cánceres de hígado corresponden al tipo carcinoma hepatocelular (CHC). Uno de los principales factores de riesgo es la infección con virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis B [2]; tiene una tasa de supervivencia menor del 15% a 5 años [3]. La elevada mortalidad está asociada al diagnóstico tardío y las opciones limitadas de tratamiento. Tal problemática conlleva a la necesidad de comprender los mecanismos moleculares implicados en la hepatocarcinogénesis.

Las semaforinas, plexinas y neuropilinas han sido de interés en la investigación del cáncer [4, 5]; sin embargo, hasta el momento no existen reportes publicados que aclaren su participación en el cáncer hepático; por lo tanto, este trabajo representa el primero que aborda el análisis de la expresión de semaforinas en el CHC experimental. El planteamiento surgió de un análisis preliminar que utilizó microarreglos de ADN en nuestro equipo de trabajo que mostró la alteración en la expresión de varios genes en el desarrollo del CHC experimental. Considerando este antecedente, en el presente trabajo se analizó la expresión de las semaforinas, plexinas y neuropilinas en el desarrollo de la hepatocarcinogénesis experimental inducido por el daño crónico hepático que produce el carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) de acuerdo con el protocolo de Schiffer [6].

Marco teórico

Cáncer

El cáncer hace referencia a un conjunto de enfermedades cuya principal característica es la pérdida de control en el crecimiento y la diferenciación celular; como consecuencia de un daño acumulado en el ADN que da lugar a células con características genéticas y epigenéticas diferentes a las células somáticas [1, 7].

Se ha establecido que el desarrollo del cáncer es un proceso multifactorial y secuencial. Las causas asociadas con el desarrollo del cáncer son de diferente naturaleza: 1) biológicas; por ejemplo, las infecciones por virus que predisponen al desarrollo de cáncer; 2) físicas; entre ellas las radiaciones ionizantes; 3) químicas; como la exposición a compuestos del humo del cigarro y a carcinógenos químicos como las aflatoxinas producidas por el hongo *Aspergillus*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce como factores de riesgo adicionales un índice de masa corporal elevado, consumo insuficiente de frutas y verduras, sedentarismo y un alto consumo de alcohol [1, 8]. Entre los principales tipos de cáncer que causan el mayor número de muertes anuales, se encuentran el pulmonar, el de hígado, el colorrectal y el de mama. En particular el cáncer hepático es la segunda causa de muerte por cáncer, con 788,000 defunciones reportadas para el año 2015 [1].

Carcinoma hepatocelular

A nivel mundial, el cáncer de hígado es considerado el segundo cáncer más letal después del cáncer pancreático, y además, las cifras de mortalidad muestran tendencias en aumento en la próxima década [1]. El 90% de los tumores primarios de hígado corresponden al tipo CHC, el cual se origina de los hepatocitos o de sus células precursoras [8]. En las últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia del CHC, colocándose como la quinta neoplasia más frecuente; el género masculino es el más afectado [9, 10]. En México, el incremento de casos es similar, datos de Globocan del año 2018 indican que el CHC ocupa la séptima posición de incidencia y la cuarta causa de muerte por cáncer; los primeros tres lugares son ocupados por cáncer de pulmón, mama y colorrectal en orden decreciente respectivamente [10, 11].

Factores de riesgo para el CHC e historia natural del carcinoma

Estudios previos indican que del 70 al 90% de los casos del CHC tienen como principal factor de riesgo la cirrosis hepática, la cual es causada por infecciones del virus de la hepatitis C (VHC) y del virus de la hepatitis B (VHB); así como el consumo crónico y excesivo de alcohol [2] (>40-60 g/día). Además, la ingesta crónica de alcohol promueve la cirrosis hepática y/o un efecto sinérgico con las infecciones por VHB y VHC. Asimismo, la enfermedad del hígado graso no alcohólico se ha identificado como un factor de riesgo del CHC. La ingesta de alimentos contaminados con aflatoxina es un factor de riesgo documentado [9], esta sustancia es producida por diferentes cepas del hongo *Aspergillus* que crece en semillas y granos almacenados en condiciones húmedas y cálidas. La obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 son factores de riesgo para este tipo de cáncer. La enfermedad de Wilson y la hemocromatosis hereditaria son padecimientos reconocidos como factores de riesgo en menor medida [8, 9, 12].

El desarrollo del CHC es un proceso de múltiples eventos y se inicia cuando cualquiera de los factores de riesgo contribuye al daño del hígado, la exposición constante a uno o varios factores de riesgo de manera continua causa daño hepático, donde a nivel celular ocurren ciclos de muerte y proliferación hepatocelular. Estos procesos de recambio celular favorecen el daño crónico del hígado donde intervienen procesos como la inflamación y la fibrosis hepática. Así, en el proceso de hepatocarcinogénesis se produce una arquitectura hepática desordenada, con lesiones focales y nodulares (focos displásicos) que son considerados lesiones preneoplásicas. Los nódulos displásicos se clasifican en alto y bajo grado, en función de la presencia de atipia celular y otras características morfológicas. Aunque ambos grados de nódulos tienen el potencial para progresar a un tumor hepático, son los nódulos displásicos de alto grado los que tienen un riesgo mayor de transformarse en CHC [13].

Marcadores del CHC

La mayoría de los pacientes con CHC son diagnosticados en etapas avanzadas, donde la media de supervivencia es de 8 meses; los tratamientos curativos para el

CHC actualmente utilizados son: el trasplante de hígado, resección quirúrgica del tumor y ablación por radiofrecuencia [14]. Es fundamental el desarrollo de marcadores que permitan diagnosticar el CHC de manera precisa; actualmente, existen diferentes tipos de marcadores tales como la alfafetoproteína reactiva a aglutina (AFP-L3), protrombina inducida por la ausencia de vitamina K II (DCP), osteopontina, glypican 3, entre otros [15]. Sin embargo, la mayoría está limitado por la baja precisión para su uso rutinario. La Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (AASLD) y la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) recomiendan como práctica clínica del diagnóstico y la vigilancia del CHC la determinación de la alfafetoproteína (AFP) en suero y un estudio de imagen abdominal. La sensibilidad de la determinación de la AFP y los estudios de imagen va del 40% al 65% en conjunto, para detectar el CHC en la etapa temprana. Sin embargo, los estudios por imagen, tomografía computarizada y resonancia magnética, se han descartado en estudios de vigilancia debido a la baja sensibilidad y el riesgo que representa para el paciente la exposición continua a medios de contraste y/o la radiación [16].

La determinación de la AFP en suero tiene algunas desventajas entre las que destacan su baja sensibilidad y especificidad, además, la determinación posee una tasa alta de falsos negativos debido a variaciones específicas del tumor y del paciente. La baja especificidad de la determinación de AFP en suero es afectada por la coexistencia de patologías que alteran su expresión, entre los que destacan la hepatitis aguda, la cirrosis, el colangiocarcinoma intrahepático, el cáncer gástrico, el tumor de células germinales, los trastornos fetales, incluso la gestación normal [9, 15].

Estudios de expresión de genes en el CHC

Para identificar e implementar biomarcadores tempranos y opciones terapéuticas, es necesaria la comprensión del proceso de progresión del CHC. El estudio de la expresión génica es una herramienta para identificar y estudiar las vías moleculares desreguladas, que permiten determinar qué procesos moleculares y celulares están alterados. Generalmente, los genes que incrementan su expresión durante el

desarrollo del cáncer están relacionados con el ciclo celular, reparación del ADN y matriz extracelular; mientras que los genes alterados negativamente se relacionan con enzimas metabólicas y de la respuesta inmune [16, 17].

Varios genes han sido evaluados y propuestos como biomarcadores del CHC; algunos de ellos son el glipican 3 (GPC3), proteína Golgi 73 (GP73), des-gamma-carboxiprotombina, (DCP), osteopontina (OPN), antígeno del carcinoma de célula escamosa (SCCA), anexina A2, midquina (MDK), AXL, tiorredoxinas, miR 200a y 200b [17]. No obstante, la propuesta de algunos biomarcadores del CHC, el diagnóstico del CHC sigue siendo en etapas avanzadas. A pesar de contar con algunos marcadores serológicos, análisis histopatológicos del hígado y los análisis de imagenología, en la práctica médica estas herramientas son limitadas para detectar tumores hepáticos en etapas tempranas. Actualmente el reto es determinar un conjunto de biomarcadores con especificidad y sensibilidad óptima para detectar el CHC oportunamente [16, 17].

Modelos animales de hepatocarcinogénesis

La investigación actual tiene como desafío el entender las alteraciones moleculares que permitan la identificación de marcadores que podrían ser útiles para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del CHC. Los modelos animales han sido utilizados para entender los mecanismos celulares de la hepatocarcinogénesis en seres humanos [18]. Para ello, los modelos deben asemejar la historia natural de la enfermedad, la patología y la bioquímica del CHC en el ser humano.

Los modelos de hepatocarcinogénesis en animales pueden ser clasificados en: a) modelos inducidos químicamente, b) modelos de implantación (modelos singénicos y de xenoinjerto), c) modelos virales y d) ratones genéticamente modificados (GEM).

Para los modelos inducidos químicamente se utilizan algunos compuestos que inducen hepatocarcinogénesis después de una exposición aguda, corta o larga. El tiempo de exposición depende de la estructura química, de la dosis utilizada, de la especie y la susceptibilidad del animal [19, 20].

La hepatocarcinogénesis en roedores de experimentación, frecuentemente es inducida por la administración del carcinógeno dietilnitrosamina (DEN). La DEN causa tumores principalmente en el hígado, el tracto respiratorio, el riñón, el tracto digestivo superior y el sistema hematopoyético. Con base en los datos experimentales, la DEN puede ser clasificada como un carcinógeno humano a pesar de la falta de datos epidemiológicos [18].

Varios modelos han sido desarrollados en la rata para estudiar las múltiples etapas de la carcinogénesis hepática incluyendo el modelo del hepatocito resistente de Solt y Farber el cual utiliza DEN como agente iniciador [21]. La DEN es un agente alquilante que induce tumores hepáticos por la formación de aductos de ADN y por el estrés oxidativo que se produce durante su metabolismo. Adicional a la DEN, el carcinógeno 2 acetilaminofluoreno (2AAF) en conjunto con una hepatectomía parcial pueden promover la hepatocarcinogénesis. Los nódulos hiperplásicos inducidos con 2AAF son positivos a la α -fetoproteína [22].

Al igual que los seres humanos, en los modelos animales existen variaciones en la susceptibilidad para desarrollar CHC, y en parte depende de la variación interindividual para activar el carcinógeno [23, 24]. Las cepas de ratas NAR y Wistar, incluyendo su mutante ODS, son resistentes a la hepatocarcinogénesis al mostrar alta variabilidad en las isoformas del citocromo P-450 [25]; y que es necesario para la activación de carcinógenos. Mientras que la cepa de ratas Fischer 344 es susceptible a la hepatocarcinogénesis [25]. La cepa DRH también presenta incidencia reducida de la hepatocarcinogénesis. Aunque no hay diferencia significativa en la iniciación de la carcinogénesis por la DEN en ratas Fischer 344 y DRH, los focos de hepatocitos alterados observados en las ratas DRH son menos propensos a progresar a carcinoma hepatocelular [26, 27].

Dos modelos de hepatocarcinogénesis: Modelo de Schiffer y modelo de Solt & Farber

Nuestro laboratorio estudia la hepatocarcinogénesis, siguiendo dos protocolos experimentales establecidos; el modelo de cirrosis/cáncer de Schiffer y el modelo de iniciación/promoción/progresión de Solt y Farber. El modelo de Schiffer

consiste en una administración crónica de DEN por 16 semanas a una dosis de 50 mg/kg más dos semanas libres de carcinógeno. El daño hepático observado a las 18 semanas reproduce la inducción de la cirrosis y la aparición de múltiples nódulos del CHC. En este protocolo, en la semana catorce se observa la fibrosis y en la semana dieciocho se desarrolla el CHC multinodular [6]. El protocolo de Solt y Farber no induce cirrosis, una patología frecuente en los pacientes, y consiste en tres intervenciones en un periodo de 10 días que permiten estudiar las etapas de iniciación y de promoción. Se inicia con una administración del carcinógeno DEN a una dosis de 200 mg/kg, al séptimo, octavo y noveno día del inicio, se administra 2AAF por vía intragástrica y el día 10 se realiza una hepatectomía parcial. Estas dos últimas intervenciones estimulan la proliferación selectiva de algunos hepatocitos alterados por DEN; lo anterior, permite la formación de lesiones nodulares al mes de iniciado el tratamiento; solo algunas de las lesiones progresan a tumores nueve meses después. Las lesiones nodulares y los tumores tienen como características fenotípicas la expresión de la enzima gamma glutamil transferasa (GGT) en los dos modelos de hepatocarcinogénesis.

Antecedente directo

En la etapa de progresión de la hepatocarcinogénesis experimental, se forman cientos de nódulos pero solo algunos progresan para formar un tumor. Se distinguen dos tipos de nódulos de acuerdo con el patrón de expresión de la GGT los cuales se denominan nódulos en remodelación y nódulos persistentes. El nódulo en remodelación contiene dos poblaciones de hepatocitos alterados; los que expresan la actividad GGT y las células GGT negativas. Se ha propuesto que esta característica heterogénea en la expresión de la GGT se debe a un proceso de rediferenciación del nódulo. Contrario al nódulo en remodelación, el nódulo persistente está formado en su totalidad por hepatocitos alterados que expresan la GGT [28, 29].

Con dicho protocolo de hepatocarcinogénesis, nuestro laboratorio determinó perfiles de expresión genética de diferentes regiones celulares capturadas por microdissección laser, a partir de los nódulos y tumores [30]. Uno de los resultados de este análisis mostró cambios de expresión genética, de las semaforinas, plexinas y neuropilinas. La figura 1 muestra la desregulación en dichas familias de genes en las lesiones nodulares persistentes, en los tumores tempranos de 9 meses y en los tumores avanzados de 17 meses. Los genes que fueron considerados de interés mostraron un aumento en el nivel de expresión (denotado por el color rojo) en los nódulos persistentes, en los tumores tempranos y avanzados; y no mostraron cambios en los niveles de expresión en el hígado normal y en los nódulos en remodelación. La expresión de estas familias de proteínas aún no ha sido descrita en el desarrollo del CHC en la literatura actual, de modo que su estudio puede generar conocimiento nuevo en este tipo de cáncer.

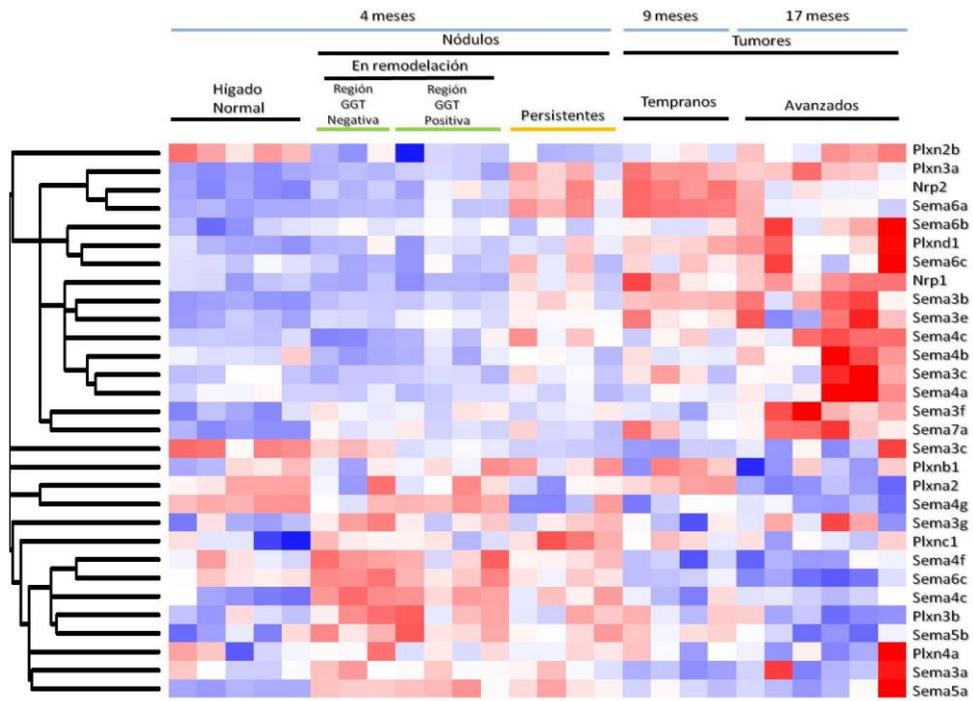


Figura 1. Cambios de expresión genética de las semaforinas, plexinas y neuropilinas durante la hepatocarcinogénesis experimental. El mapa de calor muestra la intensidad de fluorescencia para las sondas que codifican para las plexinas (Plxn), semaforinas (Sema) y neuropilinas (NRP). El color rojo muestra un aumento en el nivel de expresión, el color blanco indica que no hay cambio en el nivel de la expresión y el color azul señala una disminución.

Semaforinas

Son proteínas de la señalización extracelular que son esenciales en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos y los órganos. Inicialmente se habían descrito en funciones que se encuentran dentro del desarrollo embrionario, en la actualidad se estudian en el desarrollo de diversos tipos de cáncer [31]. Las semaforinas constituyen una familia de proteínas que pueden ser secretadas o ancladas a la membrana plasmática. De acuerdo con su similitud estructural se agrupan en ocho subclases; las semaforinas de la clase 1 y 2 pertenecen a los invertebrados mientras que las semaforinas de la clase 3 a la 7 pertenecen a vertebrados y las de clase 8 o también llamadas "V" se encuentran en virus. Las semaforinas de la clase 3 son las únicas que se secretan en vertebrados, mientras que las otras semaforinas de vertebrados están ancladas a la membrana o son transmembranales [5, 31].

Las semaforinas tiene como característica distintiva un dominio sema (Fig. 2), un dominio extracelular de aproximadamente 500 aminoácidos rico en cisteínas. Dentro de este dominio se encuentran las regiones de reconocimiento a su receptor, seguido por una región similar al N-terminal de las β -integrinas llamado dominio plexina-semaforina-integrina (PSI) y dominios similares a inmunoglobulinas. El dominio C-terminal de las semaforinas de la clase 3 es altamente básico y conservado. Las semaforinas de la clase 7 se anclan a la membrana plasmática a través de glucofosfatidilinositol (GPI). Las semaforinas de la clase 5 se caracterizan por poseer un dominio de repeticiones de trombospondina pero carece del dominio similar a inmunoglobulina [5].

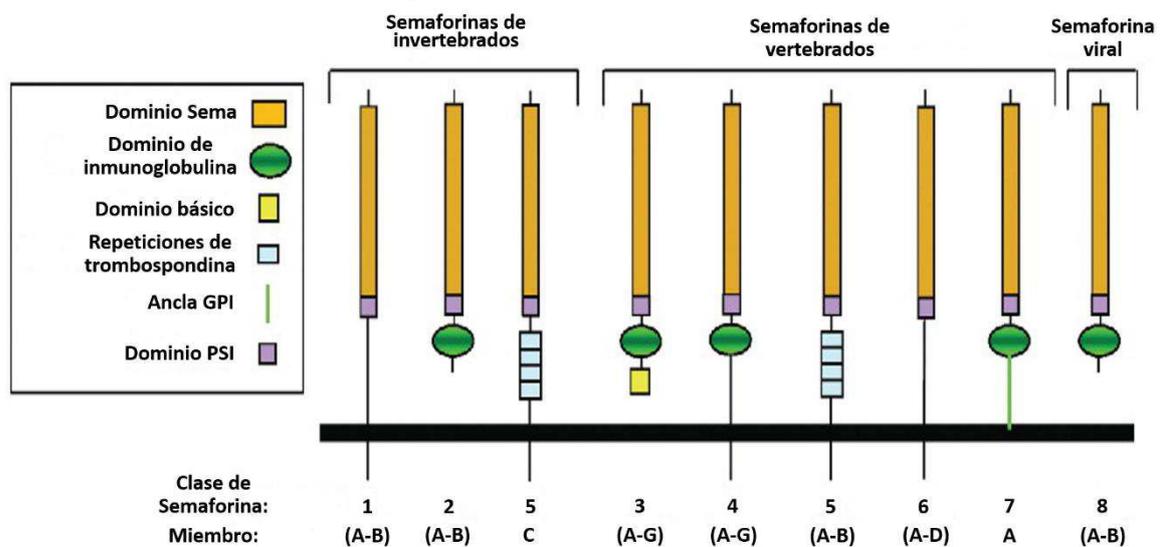


Figura 2. Estructura de las semaforinas. Se muestra la estructura de las diferentes subclases de las semaforinas. Todas contienen un dominio sema seguido del dominio PSI en el extremo C del dominio sema. Las semaforinas de clase 3 contienen un dominio básico y se encuentran libres. Las semaforinas de clase 4-7 están ancladas a la membrana. Imagen tomada y modificada de Neufeld G [5].

Las semaforinas actúan como ligandos para regular la forma y la motilidad celular durante el desarrollo y la operación de diferentes sistemas tales como: nervioso, circulatorio, inmunológico, digestivo, excretor, óseo y respiratorio. La señalización a través de sus receptores denominados plexinas pueden producir cambios morfológicos en los diferentes tipos celulares a través de modificaciones en el citoesqueleto de actina y en la adhesión celular.

Expresión de las semaforinas en el cáncer

La expresión de las semaforinas regularmente se encuentra alterada en las células tumorales y en las células del microambiente tumoral. Los cambios en la expresión de las semaforinas afectan la progresión tumoral de diferentes maneras: 1) La expresión de las SEMA's y sus receptores actúan directamente en las células tumorales al inducir el crecimiento celular, la motilidad y la metástasis. Por ejemplo; la expresión de SEMA3A inhibe la motilidad de las células de cáncer de mama y de próstata mientras que la expresión de la SEMA3B y SEMA3F inhibe el crecimiento

celular de las células de cáncer de pulmón, por otra parte, Sema3C se propone como un regulador de la adhesión célula-célula [31]. 2) Las SEMA's y sus receptores pueden promover o inhibir la angiogénesis tumoral al tener efecto sobre las células endoteliales. Durante la progresión tumoral la SEMA4D está sobre regulada y promueve la angiogénesis tumoral, mientras varias SEMA's de la clase 3 tienen efectos anti angiogénicos y su expresión es subregulada en la progresión tumoral. La Sema6A puede funcionar como un inhibidor de la angiogénesis y en consecuencia, actuar como inhibidor tumoral; el gen de la Sema3B se caracterizó como un gen supresor de tumor que pierde su expresión en el carcinoma de pulmón, además la pérdida de un solo nucleótido en este gen se asocia con una mayor susceptibilidad para el mismo tipo de cáncer [5]. 3) Las SEMA's modulan el funcionamiento de fibroblastos y las células inflamatorias en el microambiente tumoral promoviendo un ambiente pro angiogénico y proinflamatorio durante la progresión tumoral.

En conclusión, los diferentes efectos celulares que promueven las SEMA's en la progresión tumoral dependen del contexto celular. Por lo tanto, estudiar las diferentes funciones de las SEMA's en el cáncer contribuye a la comprensión de la alteración de las vías de señalización en un contexto tumoral determinado [32, 33].

Plexinas: Receptores de semaforinas

Las plexinas son proteínas transmembranales cuyo dominio extracelular es rico en cisteína y comparte regiones con el receptor del factor de crecimiento del hepatocito (HGF) que participa en procesos biológicos tales como desarrollo embrionario (morfogénesis), oncogénesis, angiogénesis y en la regulación de la apoptosis. El dominio extracelular de las plexinas también contiene un dominio SEMA, de dos a tres dominios plexina-semaforina-integrina (PSI) y tres dominios IPT (pliegue similar a inmunoglobulina compartido por plexinas y factores de transcripción), el dominio SEMA es seguido por el dominio citoplasmático y contiene un dominio Ras-GAP que inactiva pequeñas proteínas G de la familia Rap 1/2. Es un dominio conservado porque no tiene homología con dominios de alguna tirosina cinasa y otras proteínas conocidas, además, contiene sitios de fosforilación de tirosina [34, 35] (Fig. 3).

Las plexinas están involucradas en diferentes funciones celulares relacionadas con la proliferación celular, la adhesión con la membrana basal, la movilidad celular y la capacidad invasiva. En los vertebrados se han identificado nueve miembros que se han agrupado en cuatro subfamilias denominadas plexina A1-4, plexina B1-4, plexina C1 y plexina D1.

Las respuestas celulares causadas por la interacción entre la semaforina y la plexina varían según la localización de la semaforina; las semaforinas pueden encontrarse unidas a la membrana, en tejidos o en fluidos en su forma secretada. Las plexinas se han reportado como proteínas que forman complejos con receptores de tirosina quinasa y los activan en “trans” (señalización a la inversa donde el receptor tiene la capacidad de operar como ligando) después de la unión de Sema4D y Sema6D. Las plexinas, aunque no tienen actividad quinasa, pueden desencadenar la actividad de las tirosinas quinasa de tipo receptor y no receptor asociado a plexinas [5, 31].

Entre las interacciones más afines es la observada entre la SEMA4D y la plexina B1. La interacción entre estas dos proteínas se ha observado en condiciones fisiológicas normales y en la progresión, metástasis y angiogénesis tumoral. La plexina B1 es expresada en células endoteliales, por lo tanto cuando SEMA4D se une al receptor, plexina B1, induce su activación para estimular un efecto angiogénico [36].

Neuropilinas: Receptores y co-receptores

Las neuropilinas son proteínas transmembranales altamente conservadas, y específicas de los vertebrados. Originalmente fueron identificados como moléculas de adhesión en el sistema nervioso central. Este receptor tiene alta afinidad por las semaforinas secretadas, las de la clase 3, y por ello la neuropilina es reconocida como la mejor subunidad de unión a este ligando, mientras que algunos miembros de las plexinas actúan únicamente como componentes de la transducción de señal. Además de la activación de las semaforinas de la clase 3, la neuropilina es un receptor que está involucrada en la activación de otras semaforinas (Figura 3).

La familia de las neuropilinas está compuesta de la neuropilina 1 (NRP-1) y la neuropilina 2 (NRP-2). La neuropilina 1 y 2 comparten el 44 % de similitud en su estructura y contienen varios motivos conservados en su dominio extracelular incluyendo dos motivos de unión al complemento (CUB), dos dominios (b1 y b2) homólogos a factores de coagulación V y VIII, además tiene un dominio C denominado MAM similar a meprina- β . El dominio intracelular es corto y contiene un motivo de unión al dominio estructural PDZ, que dirige la localización del receptor a los componentes de señalización en la membrana de la célula, pero el dominio intracelular no es necesario para traducir la señal de la semaforina [37] (Fig. 3). Aunque las neuropilinas son suficientes para unir a las semaforinas de la clase 3, el hecho de que el dominio intracelular no es requerido para la señalización sugiere la presencia de un co-receptor para que la señal de la semaforina se transmita hacia la célula.

Fuera del sistema nervioso central, las neuropilinas se encuentran en el mesénquima alrededor de las venas y actúan como co-receptores del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Al unirse al VEGF, las neuropilinas potencian la actividad de la quinasa de los receptores; receptor 1 del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGFR1) y receptor 2 del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGFR2) regulando la activación de las células endoteliales y la direccionalidad de su migración.

Las neuropilinas son co-receptores versátiles, se unen a los receptores VEGFR1, VEGFR2 y otros receptores a través de interacciones cis o transcelulares [38, 39]. La habilidad de unirse a diferentes ligandos e interactuar con varios co-receptores, permite a las neuropilinas diversificar sus funciones para regular el funcionamiento celular relacionado con la adhesión celular, la supervivencia, la repulsión y la atracción [40].

La expresión de la NRP-1 y NRP-2 se encuentra alterada en varios tumores y en varios tipos de células tumorales; esta expresión correlaciona con la progresión tumoral y con el mal pronóstico. En el ser humano la expresión de NRP-1 correlaciona con el crecimiento y la invasión de los tumores de próstata, colorrectal,

pulmón, mama y los astrocitomas [38]. En modelos de carcinogénesis en animales, la expresión de NRP-1 en las células tumorales colorrectales promueve la angiogénesis tumoral sin incrementar la expresión de NRP-1 en las células endoteliales. En tanto, la sobre expresión de NRP-1 en células tumorales del páncreas disminuye el crecimiento tumoral [38].

La expresión de la NRP-2 es variable y correlaciona con la progresión tumoral en el cáncer de vejiga [38]. En células no pequeñas de cáncer de pulmón se ha observado el incremento relativo en la expresión de NRP-1 y NRP-2 en tejido no neoplásico. Cuando las células tumorales co-expresan a ambas neuropilinas es de peor pronóstico. La pérdida de la expresión de NRP-2 se observa en tumores gastrointestinales y se asocia con la progresión tumoral [38].

En resumen, las neuropilinas son receptores multifuncionales que sirven como receptores para las semaforinas de la clase 3 y de los miembros de la familia del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés). Las neuropilinas se expresan en la vasculatura y en las células tumorales y su expresión correlaciona con la progresión y la angiogénesis tumoral. En general, las neuropilinas modulan los efectos pro angiogénicos inducidos por VEGF, incluyendo la promoción de la motilidad y adhesión de las células endoteliales [39].

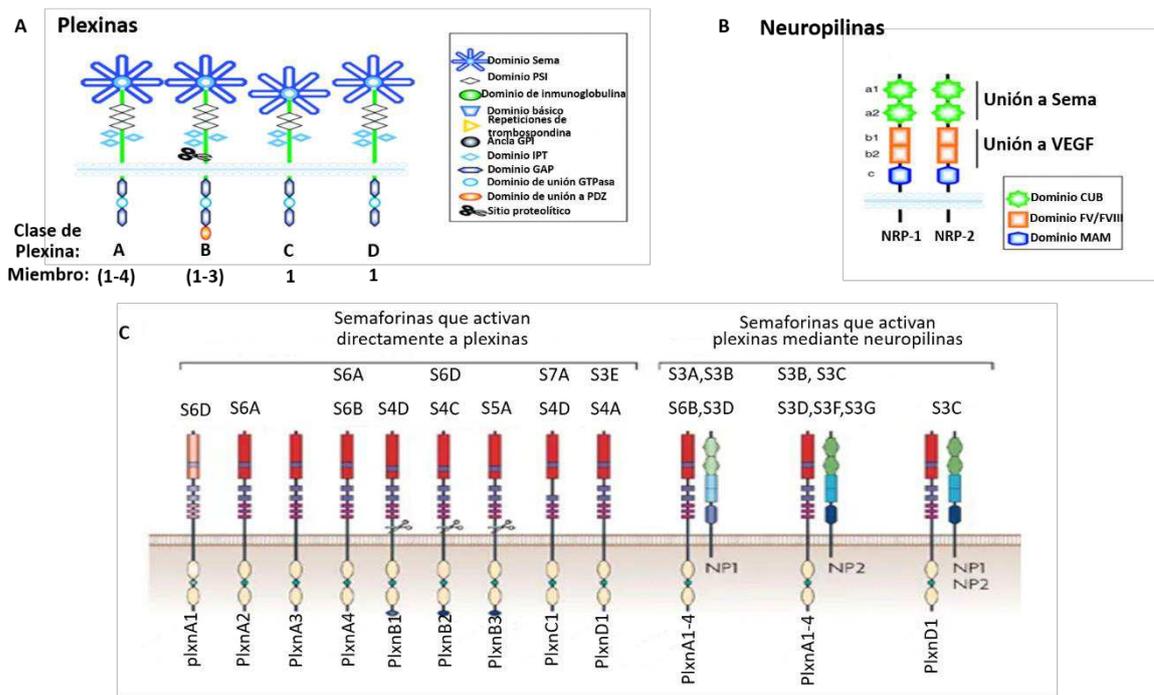


Figura 3. Estructura de las neuropilinas, plexinas y sus interacciones con las semaforinas. A) Las plexinas contienen un dominio sema que ayuda al reconocimiento de las semaforinas, dos o tres dominios PSI, seguidos de tres dominios IPT (pliegues de tipo Ig), su dominio citoplasmático es débilmente similar a proteínas GTPasa. B) Las neuropilinas son receptores conocidos de las semaforinas, contienen dos dominios CUB (Motivos de Unión al Complemento); dos dominios similares a factores de coagulación V y VIII, seguido de un dominio MAM. C) Muestra las interacciones específicas de manera individual entre las semaforinas y las plexinas, así como las interacciones de las neuropilinas con plexinas para formar un complejo receptor de semaforinas. Imágenes tomadas de Capparuccia L. y Neufeld G [31, 37].

Justificación

El carcinoma hepatocelular ocupa el sexto lugar en incidencia de cáncer y es el segundo cáncer con mayor número de muertes a nivel mundial; tiene una tasa de supervivencia media de 5 años menor al 15% [3]. Esta elevada mortalidad motiva a investigar los aspectos moleculares y celulares del desarrollo de esta enfermedad.

Las semaforinas y sus receptores (plexinas y neuropilinas) se expresan de forma inducible en varios tipos celulares y contribuyen en la regulación de procesos tales como la supervivencia celular, adhesión, migración celular, dinámica del citoesqueleto y relacionadas a las funciones de las integrinas. La alteración de tales procesos son frecuentes en el desarrollo del cáncer; esto provoca la supervivencia celular y la capacidad de invadir tejidos. Estas alteraciones celulares y la expresión de semaforinas y sus receptores varían en función del tipo de tejido del cual se origina el cáncer. Sin embargo, para el cáncer del hígado esto no ha sido esclarecido.

Nuestros datos preliminares obtenidos por microarreglos de expresión de genes ilustran cambios en la expresión de las semaforinas, las plexinas y las neuropilinas en un modelo de hepatocarcinogénesis descrito por Solt y Farber. Sin embargo, no existen reportes que ilustren su participación en la hepatocarcinogénesis, por lo que se propuso analizar la expresión de algunos genes representativos de las semaforinas, plexinas y neuropilinas en un modelo del CHC multinodular asociado a cirrosis.

Hipótesis

Considerando los cambios de la expresión de los genes de semaforinas y plexinas observada por análisis de microarreglos en el modelo de Solt & Farber, planteamos que los genes *Sema3B*, *Sema3E*, *Sema6A*, *PlxnD1*, *PlxnA3*, *Nrp-1* y *Nrp-2* tendrán alto nivel de ARNm y alteraciones en la expresión y localización de las proteínas durante el desarrollo del cáncer hepático.

Objetivos

General

Determinar cambios en la cantidad de los productos génicos (ARNm y proteína) de las semaforinas, plexinas y neuropilinas en un modelo de hepatocarcinogénesis química.

Particulares

1. Validar cuantitativamente la expresión de ARNm de los genes de *Sema3B*, *Sema3E*, *Sema6A*, *PlxnD1*, *PlxnA3*, *Nrp-1* y *Nrp-2* en un modelo de inducción de cáncer hepático.
2. Determinar si el aumento de la expresión de los genes a estudiar tiene diferencias entre las cepas de ratas de experimentación; Fischer 344 susceptible a carcinogénesis y Wistar, heterogénea y resistente a carcinogénesis.
3. Determinar la localización histológica de las proteínas SEMA3B, SEMA3E, SEMA6A, PLXND1 y NRP-1 asociados al desarrollo del cáncer hepático experimental.
4. Determinar el nivel de las proteínas de SEMA3B, SEMA3E, SEMA6A, PLXND1 y NRP-1 en el modelo de cáncer hepático.

Material y métodos

Animales de experimentación

Los animales utilizados fueron ratas macho con un peso inicial de 200-300 gramos. La inducción de la hepatocarcinogénesis se realizó en ratas Wistar provenientes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana (UPEAL-UAM Xochimilco) y de ratas Fischer 344 procedentes de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (UPEAL-CINVESTAV). El protocolo experimental estuvo aprobado por el comité de ética de cada institución (Número de protocolo aprobado: 099 y 0001-02 respectivamente para cada institución). Las ratas tuvieron libre acceso a alimento y agua durante el protocolo experimental además de ser expuestas a periodos de luz y oscuridad de 12 horas.

El protocolo experimental de hepatocarcinogénesis se realizó de acuerdo con el descrito por Schiffer [6], administrando 50 mg/kg de carcinógeno DEN por 16 semanas; las muestras de hígado obtenidas representan el curso temporal de 6, 12, 18 y 22 semanas del protocolo, en la cepa de ratas Fischer 344 y 18 semanas de la cepa de ratas Wistar.

Obtención de muestras

Los animales fueron anestesiados en cámara de éter o pentobarbital vía intraperitoneal a una dosis de 25 mg/kg de peso; se obtuvo 5 mL de sangre por punción cardiaca. La sangre total fue mezclada con heparina y separada de su paquete celular por centrifugación, el plasma se resguardo a -70°C .

La eutanasia se realizó exanguinación con corte en la vena cava inferior bajo anestesia. Se extrajo el hígado completo, se lavó el órgano con buffer PBS, se registró el peso, se capturó fotografía y se fraccionó para preservarlo en formaldehído al 4% en PBS para su posterior inclusión en parafina; el resto de muestra se congeló en 2-metil butano con ayuda de nitrógeno líquido. Las muestras se preservaron a -70°C hasta su análisis.

Determinación de la expresión genética por RT-qPCR

Purificación del ARN

Se utilizó un promedio de 25 mg de cada hígado para extraer el ARN total de acuerdo con RNeasy Mini kit de Qiagen®. Para ello el tejido congelado fue procesado en cortes histológicos de 2 µm con un criostato (Leica, CM3050S®). La lisis del tejido se indujo al agregar el buffer RLT, 700 µL, suplementado con β-Mercaptoetanol (0.01% v/v), y de manera mecánica con la micropipeta. Al observarse una homogenización total se adicionaron 700 µL de alcohol al 70% (v/v) y se mezcló perfectamente. El alcohol se adiciona para proporcionar condiciones apropiadas de unión con la membrana de sílica contenida en la columna utilizada durante la purificación. La solución homogénea se transfirió a la columna y se permitió la absorción durante 5 min. a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se centrifugó por 15 seg. a 10,000 rpm a temperatura ambiente. El procedimiento se repitió las veces necesarias hasta terminar la mezcla. Una vez unido el ARN se procedió a lavar la columna. Primero se adicionaron 700 µL de buffer RW1 y se permitió su absorción por 5 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó por 15 segundos a 10,000 rpm a temperatura ambiente, se desechó el filtrado; inmediatamente, se adicionaron 500 µL del buffer RPE a la columna y se centrifugó 15 segundos a 10,000 rpm a temperatura ambiente (se desechó el filtrado). Nuevamente, se adicionaron 500 µL de RPE pero el tiempo de centrifugación fue de 2 minutos. Para eliminar completamente el buffer RPE la columna se colocó en un tubo colector de desechos nuevo y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto. Finalmente, el ARN fue eluido con 35 µL de agua libre de RNAsa (se permitió la absorción por un minuto y medio). Se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, este último paso se repitió al recolectar el centrifugado y colocándolo nuevamente en la columna.

La pureza y la concentración se verificó espectrofotométricamente utilizando un Nanodrop ND-1000® (NanoDrop Technologies). Para determinar la pureza, se determinó el cociente entre la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) sobre la absorbancia de 280 nm (proteínas); las muestras con un cociente igual o mayor a 2.0 fueron consideradas como muestras optimas. A la par, se determinó la presencia

de hidratos de carbono, péptidos y compuestos aromáticos, para esto, se realizó una lectura a 230 nm y se determinó el cociente A260/A230; un cociente igual o mayor a 1.5 se tomaron como óptimos.

La integridad del ARN total fue verificada mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa al 1.5%. Un total de 1,000 ng de ARN total fue separado por electroforesis: 1) Un campo eléctrico de 50 V por 10 minutos garantiza la entrada adecuada de cada una de las muestras en el gel y 2) Un campo eléctrico de 100 V. durante 35 minutos fue suficiente para separar los diferentes ARN's contenidos en la muestra de ARN total. Para visualizar la integridad, el ARN fue teñido con bromuro de etidio por 5 minutos y visualizado con luz UV en el fotodocumentador Logic 1500 de Kodac®.

La intensidad de la banda del ARNr 28S debe ser igual o mayor que la banda del ARNr 18S para considerarlo parcialmente integro.

RT-qPCR: Obtención de cDNA y PCR en tiempo real

Un total de 750 ng de ARN total fue utilizado para sintetizar ADNc, se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de applied biosystems®. La reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de la reacción para convertir RNA a ADNc.

Componente	Volumen por reacción (μL)
2X RT Buffer Mix	10
20X RT Enzima Mix	1.0
RNA sample	9

H ₂ O libre de nucleasas	Cuanto basta para 20 µL
-------------------------------------	-------------------------

El ADNc sintetizado fue amplificado por PCR en tiempo real, se utilizaron 7 sondas Taqman[®], de genes específicos, marcadas con el fluorocromo FAM. El volumen de reacción fue de 15 µL y contenía: 7.5 µL de Taqman Universal PCR Master Mix 2X (Applind Biosystems)[®], 0.75 µL de sonda TaqMan y 6.75 µL de ADNc a una dilución 1:10. El experimento se realizó en el equipo QuantStudio 7 de Applind Biosystems[®] con las condiciones establecidas para el sistema TaqMan[®] (Fig. 4).

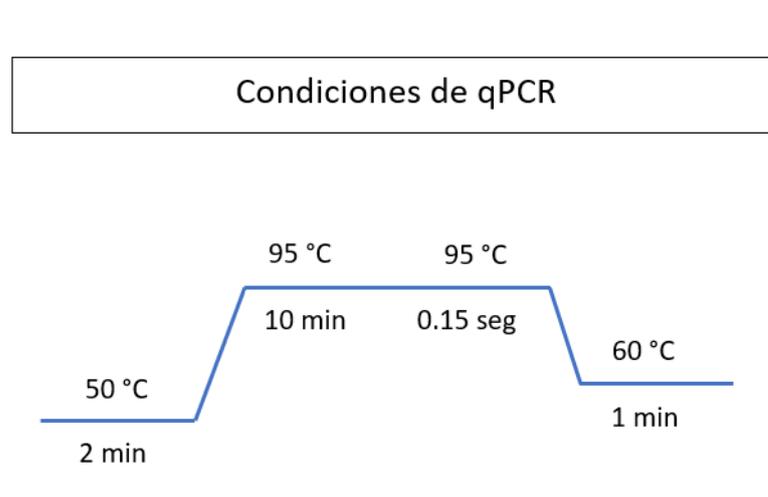


Fig. 4 Condiciones de tiempo y temperatura para la PCR en tiempo real. Las condiciones utilizadas fueron las establecidas para el sistema TaqMan[®] en equipo QuantStudio 7 de Applind Biosystems[®]

El cálculo de la expresión relativa se realizó mediante la normalización con doble delta Ct utilizando la expresión del hígado normal como la muestra de referencia y a un gen que no modifica su expresión durante la hepatocarcinogénesis experimental, se utilizó el gen ARNr 18s como el gen de referencia.

Análisis de expresión de proteínas por Western blot

Un promedio de 20 mg de tejido congelado, obtenido por la acumulación de cortes histológicos de 2 μ m, se homogeneizó en 300 μ L de buffer de lisis que contenía Tris-HCl [20 mM], NaCl [150 mM], 1% de Tritón X-100 de AppliChem® y 1X de cóctel inhibidor de proteasas Complete®. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min recuperándose el sobrenadante el cual se almacenó a -20 °C hasta su uso. La concentración de proteína fue determinada mediante el método de BCA [41]. El extracto proteico fue separado mediante SDS-PAGE al 10% y se transfirió en una membrana de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF) Millipore, MA, USA®. Las membranas se expusieron a anticuerpos específicos (Tabla 2) para Sema3B, Sema6A y NRP-1 durante 14 horas a 4 °C y posterior a esto se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP y se determinó la presencia de inmunocomplejos mediante Immobilon Western Chemiluminescent HRP Millipore, MA, USA®. Los cambios en la expresión se ajustaron al nivel de la expresión de GAPDH, denominado control interno.

Tabla 2. Información técnica de los anticuerpos utilizados.

ANTIBODY	Hospedero	Banda predicha (kDa)	Referencia	Compañía	Dilución
Anti-Sema 6A	Conejo	114 kDa	ab154938	Abcam®	1:1000
Anti-neuropilina 1	Conejo	103 kDa; se observa en 120 kDa	ab81321	Abcam®	1:1000
Anti-Sema 3B	Conejo	50 kDa: secretada 83 kDa: pro-forma	NB100-2218	NOVUS Biologicals®	1:1000

Localización histológica por inmunofluorescencia

Para determinar la ubicación histológica de las proteínas, se utilizaron cortes de 3 μm de tejidos incluidos en parafina. La parafina fue retirada de los tejidos y finalmente fueron hidratados, se utilizó el kit comercial Rodent de Clacker (BioCare Medical. CA, USA[®]) para exponer los sitios antigénicos enmascarados durante el proceso de inclusión en parafina; posteriormente los cortes histológicos se expusieron a cada anticuerpo Sema3B, Sema3E, Sema6A y NRP-1 durante 14 horas a 4 °C, utilizando una dilución 1:150, transcurrido el tiempo se lavaron con TBS- tween 0.01% y se incubaron con anticuerpos anti-conejo marcados con diferentes fluoróforos a la misma dilución que los anticuerpos primarios durante 1 hora a 4 °C. Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI durante 5 min a temperatura ambiente. Todos los tejidos fueron fijados con medio de montaje Floroshield de Abcam[®] y observados en microscopio ZEISS Microscopio Axio-ScopeA1[®].

Análisis estadístico

El análisis de los datos de los diferentes grupos se analizó en el programa estadístico GraphPad Prism 5.0 Software por análisis unidireccional de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre grupos y posterior prueba de Tukey (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). Todos los datos se representaron como la media \pm con desviación estándar (SD). Las ratas Fischer 344 tuvieron una $n=3$ para cada uno de los grupos experimentales; mientras que para las ratas Wistar el grupo normal tuvo una $n=5$ y el grupo de 18 semanas tuvo una $n=6$.

Resultados

Purificación de ARN total

La purificación del ARN por medio de RNeasy Mini kit de Qiagen® mostró buen rendimiento en la cantidad del ARN obtenido. Las concentraciones se describen enlistadas en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración de ARN total

Cepa de rata	Semanas de tratamiento (ID del grupo)	ID de la muestra	Concentración (ng/ μ L)
Fischer 344	Normal (NL)	NO/33	810.6
		NO/34	1539.2
		NO/35	1803.8
	6 Semanas (D6)	D6/3	1052.2
		D6/4	1030.8
		D6/5	911.1
	12 Semanas (D12)	D12/23	1105.7
		D12/28	348.8
		D12/30	752.0
	18 Semanas (D18)	D18/13	1961.8
		D18/18	1917.8
		D18/19	1858.9
	22 Semanas (D22)	D22/01	1791.2
		D22/03	1013.6
		D22/04	964.8
Wistar	Normal (NL)	NO/1	259.5
		NO/2	227.0
		NO/3	1739.8
		NO/4	1276.1
		NO/5	1398.3

	18 semanas (D18)	D18/2	1156.6
		D18/4	1357.5
		D18/5	1050.7
		D18/6	446.8
		D18/7	2141.7
		D18/8	1382.1

Integridad de ARN total

La integridad del ARN fue óptima para ensayos de RT-qPCR para todas las muestras incluidas. Como lo muestra la figura 5 se observan las bandas, del ARNr, 28S y 18S nítidas y claras para cada una de las muestras.

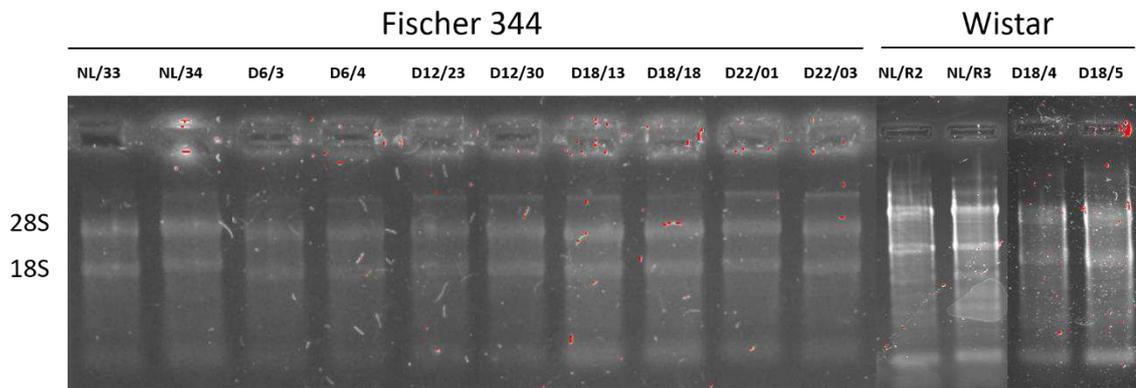


Fig. 5 Integridad del ARN total. Muestra la integridad para algunas muestras determinadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. NL=Normal, D6= 6 Semanas, D12= 12 Semanas, D18= 18 Semanas y D22= 22 semanas de tratamiento experimental. Se muestran las subunidades de ARNr 28S= 28S y ARNr 18S= 18S.

Cambio en la expresión genética de la semaforinas

Mediante RT-qPCR se midieron los cambios en la expresión genética de las *semaforinas*: *Sema6A*

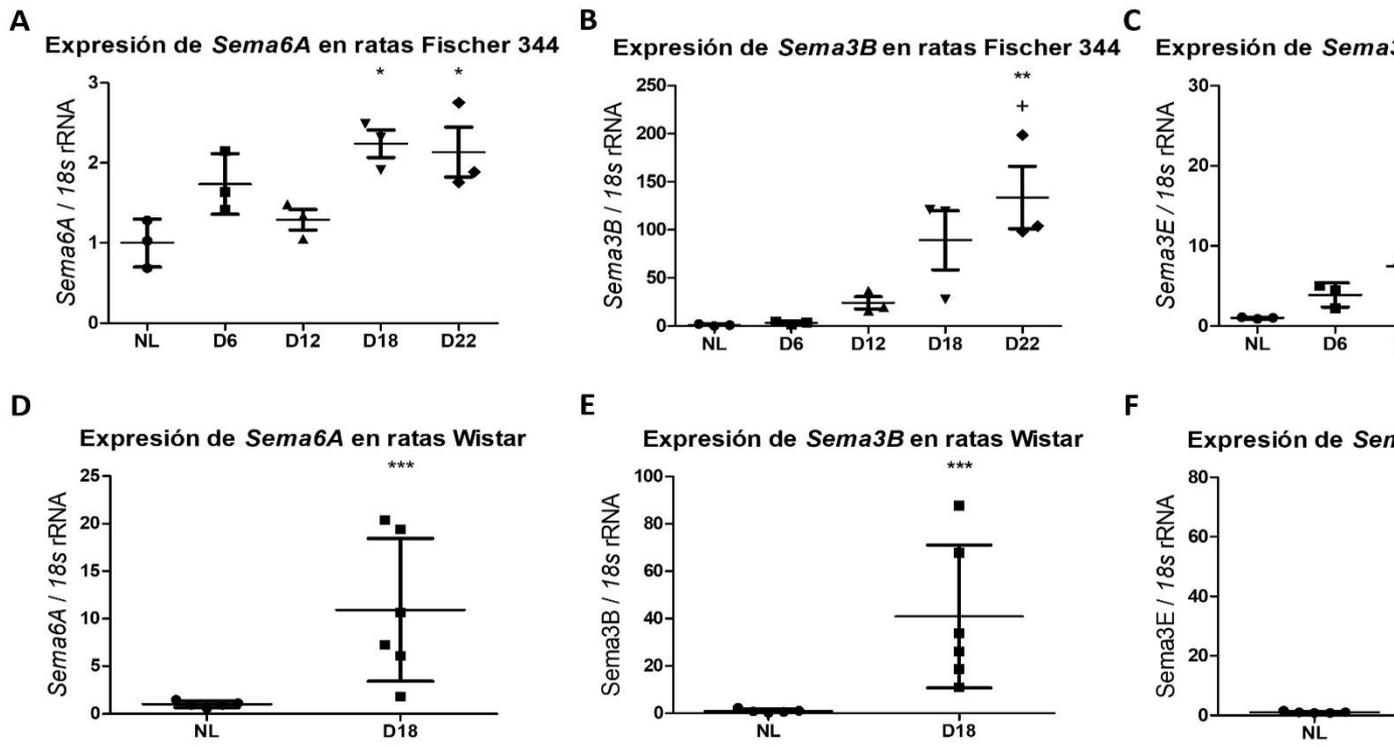


Figura 6. Expresión curso temporal de las semaforinas en la hepatocarcinogénesis experimental. A y D. Expresión de *Sema6A* en ratas Fischer 344 y ratas Wistar, B y E. Expresión de *Sema3B* en ratas Fischer 344 y Wistar, C y F. Muestra la expresión de *Sema6A*, *Sema3B* y *Sema3E* en ratas Fischer 344 y ratas Wistar en diferentes semanas de tratamiento experimental. Media +/- desviación estándar. * y + ($p < 0.05$) diferencia estadísticamente significativa vs NL y D6. ** ($p < 0.01$) diferencia estadísticamente significativa vs NL. *** ($p < 0.001$) diferencia estadísticamente significativa vs NL. $n = 3$ para todos los grupos experimentales en las ratas Fischer 344; mientras que para ratas Wistar $n = 5$ en grupo NL.

Cambios en la expresión genética de las semaforinas en ratas Fischer 344

El gen *Sema6A* mostró un incremento de acuerdo con el tiempo de desarrollo del modelo experimental, dicho aumento de más de 2 veces respecto al NL fue estadísticamente significativo a partir de la semana 18 ($p < 0.05$) y se mantuvo en la semana 22 ($p < 0.05$) (Fig.6 A). Los genes *Sema3B* y *Sema3E* similar a *Sema6A* mostraron un aumento gradual. El cambio en la expresión genética para *Sema3B* fue estadísticamente significativo exclusivamente a la semana 22 ($p < 0.01$), pero fue más de 100 veces respecto al nivel de expresión del NL (Fig.6 B), mientras que el aumento en la expresión de *Sema3E* fue estadísticamente significativo únicamente a la semana 18 ($p < 0.05$) y alcanzó un incremento de 19 veces la expresión de NL (Fig.6 C). Es de notar, que el aumento de *Sema3B* (>100 veces $p < 0.01$) a las 22 semanas, pudo corresponder al proceso tumoral más que al efecto agudo del carcinógeno, ya que la última administración del carcinógeno DEN (semana 16), implicó una diferencia de 6 semanas libres de carcinógeno.

Cambios en la expresión genética de las semaforinas en ratas Wistar

En los análisis de expresión génica se incluyó la determinación de semaforinas en la cepa de ratas Wistar para determinar si los cambios en la expresión génica eran asociados a la susceptibilidad a la formación de neoplasias en las cepas de ratas [42].

Los genes *Sema6A*, *Sema3B* y *Sema3E* mostraron un aumento de 12 ($p < 0.001$), 40 ($p < 0.001$) y 25 ($p < 0.05$) veces respectivamente, siendo estadísticamente significativo a la semana 18 del protocolo de hepatocarcinogénesis (Fig.6 D-F). En particular, las 40 veces de aumento de *Sema3B* observado en las muestras de la semana 18 de las ratas Wistar tienen correspondencia con la elevada expresión observada en las ratas Fischer 344. Así, la sobre expresión de los genes Semaforinas fue reproducible en el protocolo de hepatocarcinogénesis a las 18 semanas tanto en la cepa de ratas susceptible a la carcinogénesis (Fischer 344) como en la cepa resistente a carcinogénesis (Wistar).

Cambios en la expresión genética de las plexinas

La expresión del ARNm de *Plexn3A* en ratas Fischer 344 aumentó, hasta 9 veces, de modo curso temporal siendo estadísticamente significativo en la semana 18 ($p < 0.05$). (Fig. 7 A). Mientras que el aumento en la expresión de *PlexnD1* fue una constante desde la semana 6 hasta la semana 22. Sin embargo, el aumento de dos veces en la expresión no mostró significancia estadística con respecto a NL (Fig.7 B).

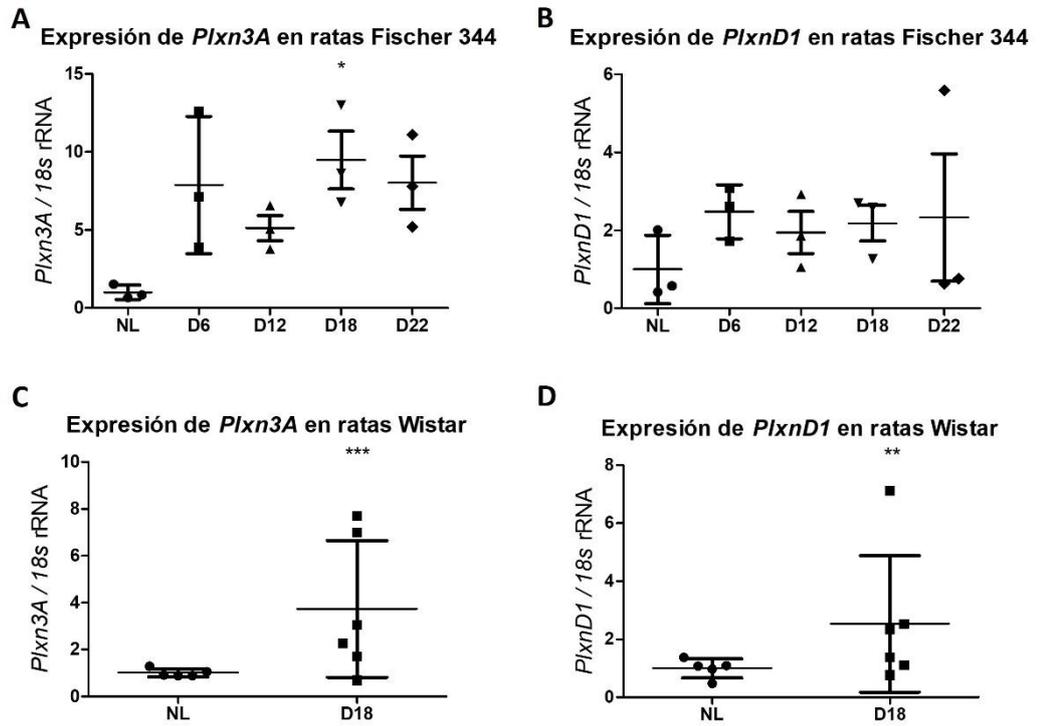


Figura 7. Expresión curso temporal de plexinas en la hepatocarcinogénesis experimental. A y C. Expresión de *Plexin3A* en ratas Fischer 344 y ratas Wistar, B y D. Expresión de *PlexinaD1* en ratas Fischer 344 y Wistar en diferentes semanas de tratamiento. Error de desviación estándar. * ($p < 0.05$) diferencia estadísticamente significativa vs NL. ** ($p < 0.01$) diferencia estadísticamente significativa vs NL. *** ($p < 0.001$) diferencia estadísticamente significativa vs NL. $n = 3$ para todos los grupos experimentales en las ratas Fischer 344, $n = 5$ en grupo NL y $n = 6$ en grupo D18.

Los genes *Plxn3A* y *PlxnD1* mostraron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) y ($p < 0.01$) respectivamente) (Figs.7 C y D) en los hígados de 18 semanas de ratas Wistar.

Las ratas Fischer 344 mostraron un aumento mayor de *Plxn3A*, en los hígados de 18 semanas, que en ratas Wistar. El aumento relativo para *PlxnD1* fue similar en ambos tipos de rata a las 18 semanas.

Cambios de expresión genética de las neuropilinas

La Figura 8 muestra los cambios de expresión de *Nrp-1* y *Nrp-2* de manera temporal en el modelo de Schiffer. Como lo muestran las figuras 8A y 8B hubo un aumento, en la expresión de *Nrp-1* y *Nrp-2* en ratas Fischer 344. Aunque el incremento fue fluctuante, fue estadísticamente significativo para *Nrp-2* en los hígados de 18 semanas.

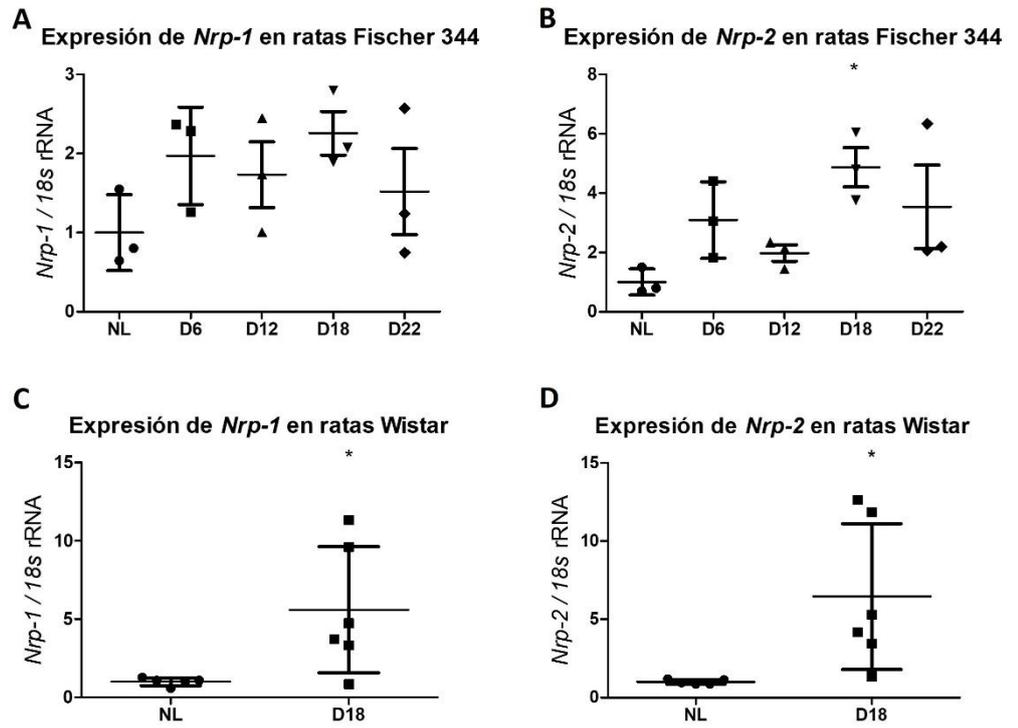


Figura 8. Expresión de neuropilinas en la hepatocarcinogénesis experimental. A y C. Expresión de *Nrp-1* en ratas Fischer 344 y Wistar, B y D. Expresión de *Nrp-2* en ratas Fischer 344 y Wistar en diferentes semanas de tratamiento experimental. * ($p < 0.05$) diferencia estadísticamente significativa vs NL. $n = 3$ para todos los grupos experimentales en las ratas Fischer 344 y $n = 5$ en grupo NL y $n = 6$ en grupo D18.

El incremento en la expresión de *Nrp-1* y *Nrp-2* fue significativo en los hígados de 18 semanas de ratas Wistar (Figuras 8C y D).

El incremento en la expresión de *Nrp-1* fue superior en los tumores de 18 semanas de ratas Wistar (5 unidades en promedio) comparado con los tumores de 18 semanas de ratas Fischer 344. En tanto, el incremento en la expresión relativa para *Nrp-2* (cinco unidades en promedio) tuvo correspondencia en ambos tipos de rata para los tumores de 18 semanas.

Localización histológica de las semaforinas en la hepatocarcinogénesis experimental

La técnica de inmunofluorescencia se utilizó para localizar a las semaforinas de manera curso temporal en el hígado del modelo de Schiffer en ratas Fischer 344.

Localización de SEMA6A en la hepatocarcinogénesis experimental

La SEMA6A en hígado normal (NL) se localizó en el núcleo de los hepatocitos periportales zona 1 (Fig. 9). Mientras que en los grupos experimentales la SEMA6A se localizó en el núcleo celular desde la semana 6 hasta la semana 18, particularmente en la semana 22, la proteína se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma.

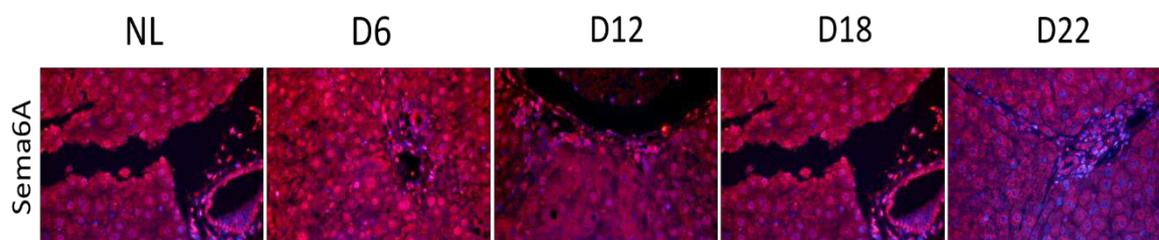


Figura 9. Expresión y localización curso temporal de la SEMA6A en la hepatocarcinogénesis experimental utilizando inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de la localización de la SEMA6A marcada con fluorocromo en rojo y los núcleos marcados con DAPI (azul) en el hígado normal (NL) y en cuatro etapas de la progresión de la hepatocarcinogénesis experimental: seis semanas de tratamiento= D6, 12 semanas de tratamiento= D12, 18 semanas de tratamiento = D18 y 22 semanas de tratamiento = D22. Muestras observadas a 40X.

Localización de SEMA3B en la hepatocarcinogénesis experimental

En el hígado normal como en los grupos experimentales (hígados con nódulos y tumores), la expresión de SEMA3B se localizó en el citoplasma de los hepatocitos (Fig. 10) sin mostrar ninguna diferencia de intensidad de marca.

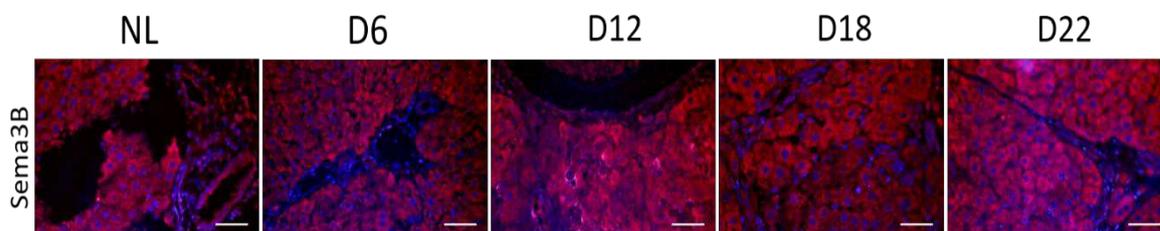


Figura 10. Localización celular curso temporal de SEMA3B en la hepatocarcinogénesis. Se muestran imágenes representativas de SEMA3B de manera curso temporal tratadas con DEN. Muestra normal= NL, seis semanas de tratamiento= D6, 12 semanas de tratamiento= D12, 18 semanas de tratamiento= D18 y 22 semanas de tratamiento=D22. Muestras observadas a 40X. Barra de escala= 50 μ m.

Localización de la SEMA3E en la hepatocarcinogénesis experimental

La Figura 11 muestra la expresión y localización de la SEMA3E en secciones hepáticas. La SEMA3E se localizó en el núcleo de los hepatocitos de la zona 1 en el NL; mientras que, en los grupos experimentales, en la semana 6, 12 y 18 se observó en el núcleo y citoplasma, mientras que en la semana 22, la marca predominó en el citoplasma.

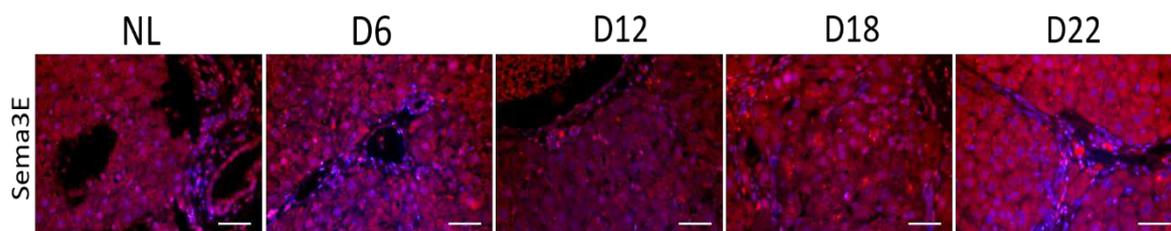


Figura 11. Expresión de la SEMA3E en la hepatocarcinogénesis experimental. Se muestran imágenes representativas de SEMA3E inmunomarcada con un fluorocromo en rojo y los núcleos marcados con DAPI (azul). Muestra normal= NL, seis semanas de tratamiento= D6, 12 semanas de tratamiento= D12, 18 semanas de tratamiento= D18 y 22 semanas de tratamiento=D22. Muestras observadas a 40X. Barra de escala= 50 μ m.

Localización de la NRP-1 en la hepatocarcinogénesis experimental

La Figura 12 muestra la inmunofluorescencia para NRP-1 en el modelo de hepatocarcinogénesis. La localización de la NRP-1 en el hígado normal y en los grupos experimentales de 6, 12, 18 y 22 semanas se observó en el citoplasma de los hepatocitos.

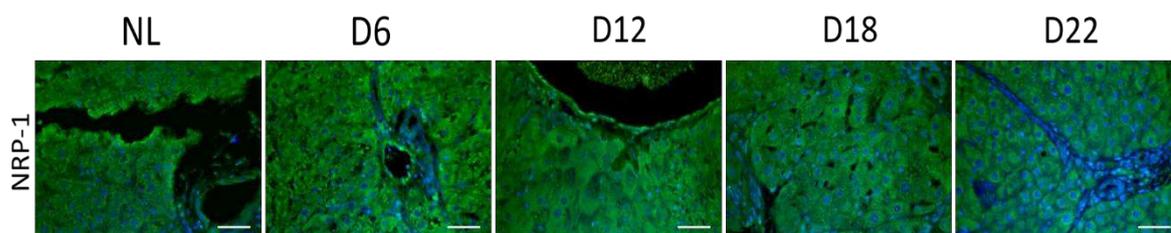


Figura 12. Expresión de NRP-1 en la hepatocarcinogénesis experimental. Se muestran imágenes representativas de NRP-1 de manera curso temporal tratadas con DEN. Muestra normal= NL, seis semanas de tratamiento= D6, 12 semanas de tratamiento= D12, 18 semanas de tratamiento= D18 y 22 semanas de tratamiento=D22. Muestras observadas a 40X. Barra de escala= 50 μ m.

Expresión de las proteínas semaforinas en la hepatocarcinogénesis

Utilizando la metodología de Western blot se determinó la expresión de Semaforina 3B, Semaforina 6A y Neuropilina-1. Los niveles de expresión se ajustaron al nivel de expresión de la proteína GAPDH, como un control de carga.

Cambios de la SEMA6A en la hepatocarcinogénesis experimental

La proteína SEMA6A ha mostrado funciones celulares de acuerdo con los diferentes pesos moleculares de las proteínas [43]. En el hígado de ratas localizamos Sema6A como un duplete a 98 kDa y 89 kDa (Figura 13). Además, se observó una proteína de 44 kDa, y que corresponden con las imágenes proporcionadas en la ficha técnica del anticuerpo Anti-Sema6A (ab154938) de Abcam®.

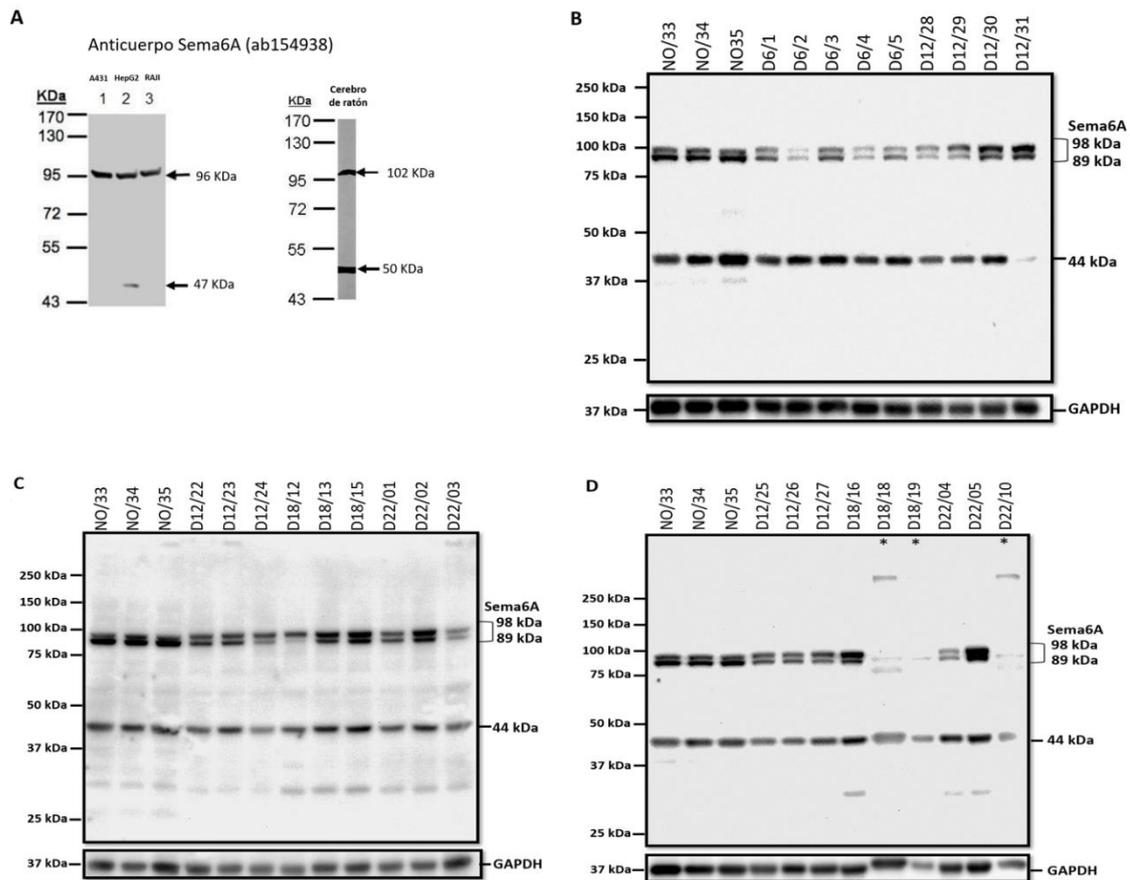


Figura 13. Expresión curso temporal de la proteína Semaforina 6A en la hepatocarcinogénesis experimental en ratas Fischer 344. A. Imágenes tomadas de la ficha técnica del anticuerpo Anti-SEMA6A (ab154938) de Abcam®. **B.** Muestra la expresión de SEMA6A en el hígado normal (N), lesiones nodulares de 6 (D6) y 12 semanas (D12). **C.** Muestra la expresión de SEMA6A en el hígado normal (N), lesiones nodulares de 12 semanas (D12), de 18 semanas (D18) y 22 semanas (D22). **D.** Expresión de la SEMA6A en el hígado normal (N), lesiones nodulares de 12 semanas (D12) y en tumores multifocales de 18 (D18) y 22 semanas (D22) de inducción. * Muestras omitidas en análisis debido a migración electroforética inusual.

La expresión de SEMA6A en la banda de 98 kDa mostró variaciones sin significancia estadística; una disminución en la semana 6 y un aumento gradual hasta la semana 18 (Fig. 14A), mientras que la banda de 89 kDa disminuyó significativamente desde la semana 6 hasta la semana 22 ($p < 0.05$) (Fig. 14B). La banda de 44 kDa no tuvo cambios significativos durante la hepatocarcinogénesis (Fig. 14C). La sumatoria de las bandas observadas no presentó cambios de acuerdo con el curso de la hepatocarcinogénesis (Fig. 14D). Un fenómeno interesante se observó en la comparación de intensidades para las proteínas 98 y 89 kDa (Fig. 14E) donde se encontró un cambio de perfil entre ambas bandas en el hígado normal y los grupos experimentales de la hepatocarcinogénesis. En los grupos experimentales, la expresión de la proteína de 89 kDa tiende a disminuir, mientras que la de 98 kDa aumentó, estos cambios fueron estadísticamente significativos para las muestras de 18 semanas que contienen tumores multinodulares. Esta observación se confirmó al graficar el cociente de la intensidad (Sema6A 98 / 89 kDa) y (Sema6A 89 / 98) de estas proteínas (Fig. 14F). Mostrando variaciones que son claras en la semana 18.

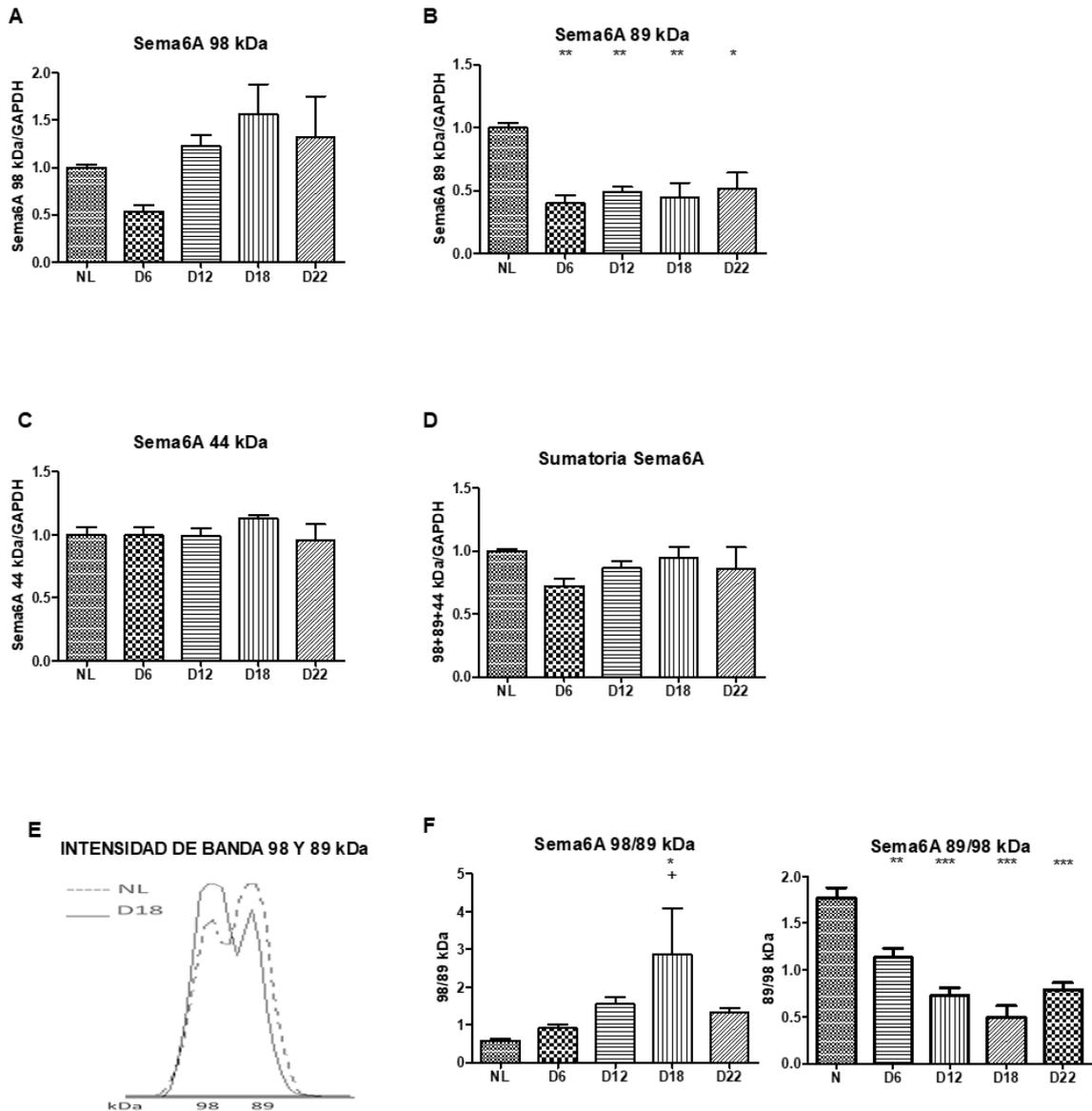


Figura 14. Cuantificación curso temporal de la Semaforina 6A relativo a la expresión de GAPDH, en la hepatocarcinogénesis experimental. A. Expresión de SEMA6A a 98 kDa. **B.** Expresión de SEMA6A a 89 kDa. ** ($p < 0.01$); * ($p < 0.05$) **C.** Expresión de SEMA6A a 44 kDa. **D.** Presenta gráfico de la sumatoria de las bandas observadas a 98, 89 y 44 kDa. **E.** Gráfico del perfil de intensidad para las proteínas de 98 y 89 kDa en el hígado normal (N) y tumoral (D18). **F.** Gráfico de la expresión de la relación de las proteínas de 98/89 kDa; * ($p < 0.05$) + ($p < 0.05$). * Respecto N; + Respecto a D6

Cambios de la SEMA3B en la hepatocarcinogénesis experimental

La proteína SEMA3B se observó como una banda de 50 kDa en los extractos de proteína hepática. Las muestras del modelo de hepatocarcinogénesis mostraron

una disminución en la expresión de la SEMA3B de alrededor del 40% que fue estadísticamente significativa a partir de la semana 12 ($p < 0.05$) respecto del NL. La disminución fue mayor, alrededor del 70%, en los tumores multinodulares de la semana 18 y 22 ($p < 0.001$) (Fig. 15). La banda correspondiente a 29 kDa es una posible inespecificidad del anticuerpo, ya que no se encuentra reportada en la literatura actual ni en las imágenes proporcionadas por el anticuerpo.

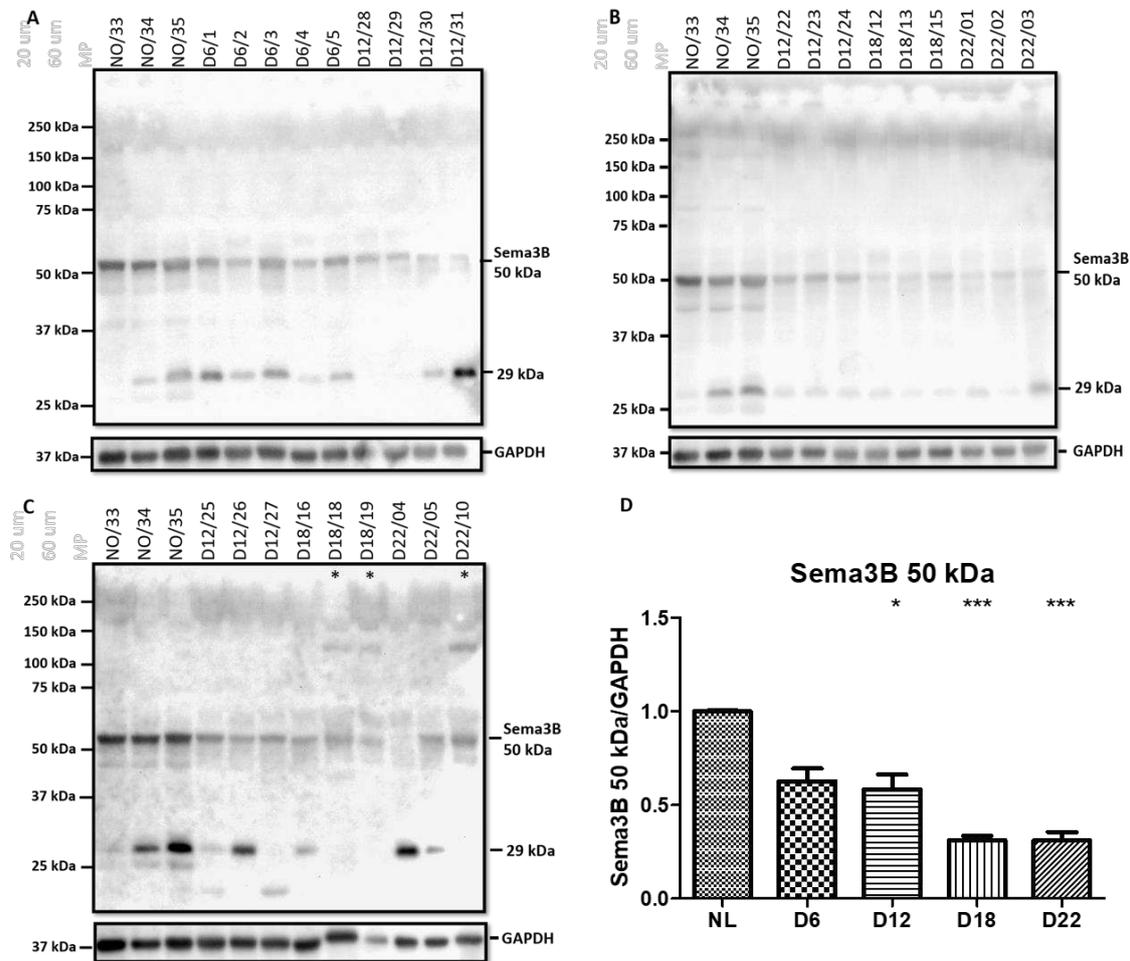


Figura 15. Expresión de la proteína Semaforina 3B en la hepatocarcinogénesis experimental.

A. Muestra la expresión de SEMA3B en el hígado normal (N) y lesiones nodulares de 6 (D6) y 12 semanas (D12). B. Indica la expresión de SEMA3B en hígado normal (N), lesiones nodulares de 12 semanas (D12) y en los tumores multifocales de 18 (D18) y 22 semanas (D22) de inducción. C. Expresión de Sema3B en hígado normal (N), lesiones nodulares de 12 semanas (D12), tumores multifocales de 18 (D18) y 22 semanas (D22) de inducción. D. Cuantificación de Sema3B relativo a la expresión de GAPDH. * ($p < 0.05$); *** ($p < 0.001$) y *** Respecto N. * Muestras omitidas en análisis debido a migración electroforética inusual.

Cambios de la NRP-1 en la hepatocarcinogénesis experimental

La neuropilina-1 se observó como una banda de 130 kDa en los extractos de proteína hepática. La cantidad de neuropilina-1 no mostró cambios entre el hígado normal y en los grupos experimentales analizados (Fig. 16D).

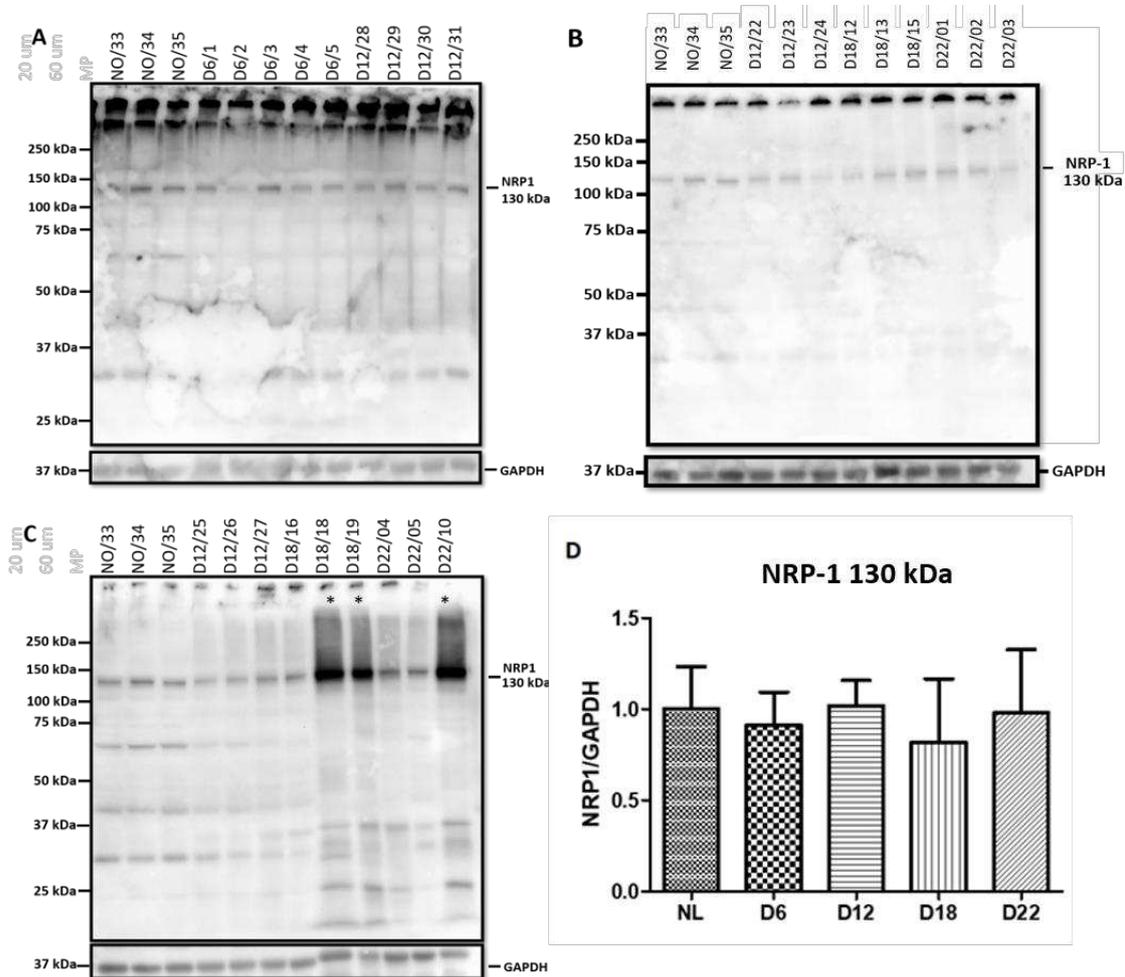


Figura 16. Expresión de la proteína Neuropilina-1 en la hepatocarcinogénesis experimental. A. Muestra la expresión de NRP-1 en hígado normal (N), lesiones nodulares de 6 (D6) y 12 semanas (D12). B. Indica la expresión de NRP-1 en hígado normal (N), lesiones nodulares de 12 semanas (D12) y tumores multifocales de 18 (D18) y 22 semanas (D22). C. Expresión de NRP-1 en hígado normal (N), lesiones nodulares de 12 semanas (D12), tumores multifocales de 18 (D18) y 22 semanas (D22). D. Cuantificación de NRP-1 relativo a la expresión de GAPDH. * Muestras no consideradas en el análisis debido a migración electroforética inusual.

Discusión

Las semaforinas y sus receptores son anormalmente expresados en varios tipos de cáncer, pero se conoce poco sobre su expresión y la función que desempeñan. En particular en el cáncer hepático, se desconoce si los desbalances de expresión de estos genes podrían influir en el desarrollo del cáncer hepático. En primer etapa decidimos medir los posibles cambios en la expresión de los productos génicos de las semaforinas y sus receptores en el proceso de hepatocarcinogénesis. Seleccionamos 7 genes para analizar los cambios en el ARNm, se utilizaron sondas Taqman para hacer la determinación. Para analizar el nivel de proteína, utilizamos anticuerpos específicos. A continuación, se analizan los resultados obtenidos en cada gen estudiado y se comparan con los datos disponibles en la literatura.

Sema3E

Observamos un aumento temporal en la expresión del gen de *Sema3E*, este aumento es estadísticamente significativo a las 18 semanas en los dos tipos de rata analizadas. El aumento en la expresión del gen *Sema3E* ha sido reportado por Maejima (2016) donde describió una asociación entre el nivel de la expresión del gen *Sema3E* con la progresión metastásica, una pobre diferenciación celular y una sobrevida más corta en estudios en el ser humano con cáncer gástrico [44]. Contrario a las demás semaforinas de la clase 3, SEMA3E promueve la progresión tumoral al unirse directamente a la PLXND1 sin necesidad de unirse con alguna neuropilina mediante la activación ERK aun cuando la cantidad de PLXND1 es baja [5, 44].

Casazza (2010) observó que un producto proteolítico de SEMA3E denominado p61-SEMA3E favorece la asociación de PLXND1 con el receptor ERBB2 que promueve la invasividad y diseminación metastásica [45]. El mismo autor reportó en (2012) que una mutación protegía a la proteína del corte de la proteasa tipo furina, y SEMA3E de longitud completa no mantenía la unión con ERBB2, e impedía la unión de p61-SEMA3E con PLXND1 conservando así su actividad anti angiogénica [46], adicionalmente, se observó un aumento de los heterodímeros del receptor ERBB2-EGFR que se encuentran en las células cancerosas pero no en las células

endoteliales, lo anterior, relaciona la expresión de p61-SEMA3E y PLEXINAD1 con el riesgo de progresión metastásica [45]. En contraste, Chen (2015) encontró una reducción significativa en la expresión de *Sema3E* en comparación con el tejido sano adyacente en cáncer gástrico lo que resultó en la inhibición de la proliferación, la migración y la invasividad [47].

La detección de la proteína SEMA3E por inmunofluorescencia reveló una localización en el núcleo de los hepatocitos del hígado normal mientras que en los tejidos del protocolo de hepatocarcinogénesis se observó una localización en el núcleo y citoplasma de los hepatocitos (Fig. 11). Resultados que contrastan con los reportados por Yong (2016) donde se observa una expresión débil en el citoplasma en tejido sano y una expresión alta en el núcleo de las células de cáncer de páncreas en humanos; esta expresión también se relacionó con un mal pronóstico y una progresión agresiva de la enfermedad [48].

En conclusión, existe una relación entre el aumento de la expresión genética de *Sema3E* y la progresión tumoral en los dos tipos de rata analizados; por otra parte su localización celular contrasta con los reportados debido quizá al tipo de muestra utilizado (rata y el ser humano), es necesario más estudios para poder determinar el papel que desempeña en la hepatocarcinogénesis.

PlexinaD1

Como se mencionó anteriormente, PLXND1 es el receptor canónico de SEMA3E; en condiciones normales tiene una expresión baja en la edad adulta y está limitado a fibroblastos y macrófagos activados, pero se ha observado una expresión anormal en diferentes tipos de cáncer como el de páncreas, melanoma, ovario y colon [49]. La expresión de PlexinD1 aumenta en biopsias de cáncer de mama y en melanomas cutáneos en el ser humano [50, 51], resultados que concuerdan con los nuestros donde observamos un aumento de 2 veces en el nivel de ARNm en la semana 22, en ratas Fischer 344 y casi 3 veces más en ratas Wistar a la semana 18 con respecto al hígado normal (Fig. 7B y 7D). Luchino (2013) demostró que PLXND1 es un receptor dependiente de SEMA3E que modula la muerte celular al interactuar con NR4A1. La interacción promueve la liberación del citocromo c que activa la caspasa-

9 provocando la muerte mediada por mitocondrias, este mecanismo ocurre cuando se encuentra disociado de las semaforinas.

Por otro lado, la expresión de SEMA3E inhibe la muerte celular mediada por PLXND1 en células de cáncer de mama como consecuencia al cambio estructural que sufre al unirse con SEMA3E; así, al interactuar con el receptor ERBb2 como se menciona anteriormente y promueve la respuesta de supervivencia y diseminación metastásica [50]. Estudios han colocado a PLEXINAD1 como un receptor promotor del crecimiento tumoral que, al ser suprimido, reduce la metástasis [46]. Rehman (2016) estudió la regulación de PLXND1 y encontró que las proteínas Notch (Notch1 y Notch3) regulan la expresión de PLXND1 en cáncer de próstata y ésta a su vez regula SLUG que finalmente modula la expresión de E-Cadherina; como resultado, fomenta así la migración y la invasión de las células cancerosas [52]. Por lo tanto, la expresión de SEMA3E es un mecanismo de evasión de la muerte celular con consecuencias en el crecimiento y la metástasis de las células cancerosas mientras que PLXND1 es un receptor que podría ser blanco de estudio para elucidar el mecanismo de acción completo.

Es importante determinar la expresión de plexinaD1 a nivel de proteína en el desarrollo de la hepatocarcinogénesis para poder determinar si la traducción de la proteína tiene relación con el aumento observado de los transcritos; además, para determinar si PLXND1 modula la muerte celular en la hepatocarcinoma, Para determinar los efectos de PLXND1 en la supervivencia celular, se podría diseñar experimentos *in vivo* que permitan agregar un ligando que secuestre a Sema3E.

PLEXINA3A

Los miembros de la familia de plexina-A son los receptores de las semaforinas de clase 3; estos miembros ligando-receptor generalmente están regulados negativamente en el desarrollo del cáncer lo que hace suponer que tienen funciones supresoras de tumor [53].

En condiciones fisiológicas PLXN3A participa en la señalización durante el desarrollo neuronal [54]. PLXN3A junto al correceptor NRP-1 funcionan como receptores de SEMA3A [54, 55]; Katayama (2013) reveló que NRP-1 funciona como

correceptor de PLEXINA3A y PLEXINA1A en el desarrollo adecuado de las neuronas del ganglio estatoacústico en el oído interno [54]; mientras que Ben-Zvi (2008) demostró que la expresión de PLEXINA3A es necesaria para la muerte celular inducida por SEMA3A en las células neuronales, este resultado se confirma al silenciar PLEXINA3A y observar una completa resistencia a la muerte celular *in vitro* [55].

La determinación de la expresión genética de *Plxn3A* mostró un aumento significativo en el grupo de 18 semanas, cuando los hígados presentan tumores multifocales para las dos cepas de ratas. Sin embargo, no existe información publicada para analizar si la expresión de PLXN3A se asocia con el desarrollo del cáncer en general (modelos en animales y el ser humanos). Así, la elevada expresión de este gen en la hepatocarcinogénesis podría ser novedosa y contribuir al entendimiento del desarrollo del CHC.

NRP-2

Las NRP se relacionan con correceptores de diferentes proteínas entre ellas STAT, MAPK, PI3K, RAS, TGF- β y Notch. Se ha descrito una expresión alterada de las NRP en diferentes tipos de cáncer como mama, cerebro, pulmón, próstata y ovario, por lo anterior se ha establecido que contribuyen al desarrollo del cáncer debido a que los tejidos tumorales a menudo presentan una expresión elevada de estas proteínas con respecto a tejidos normales. Las semaforinas de la clase 3 tienen la capacidad de unirse a complejos que contengan alguna de las NRP. En el caso particular de NRP-2 tiene una expresión basal en células epiteliales de los túbulos distales y proximales, células endoteliales de venas y vasos linfáticos [56], su alta expresión se ha correlacionado con un mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer. Las semaforinas SEMA3C, SEMA3B y SEMA3D interactúan con ambas NRP mientras que SEMA3F se une a NRP-2 promoviendo una vascularización normal e inhibe la metástasis. La disminución de NRP-2 en cáncer gástrico previene la migración e invasividad *in vivo* siendo importante para la supervivencia de las células neoplásicas [57].

Nuestros datos muestran un aumento en la expresión de *Nrp-2* conforme la temporalidad de la hepatocarcinogénesis, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la semana 18 en los dos tipos de ratas analizados. Este incremento de expresión concuerda con los datos reportados por Wittmann (2015) que muestran un incremento en la expresión de *Nrp-2* en las líneas celulares (SNU-398, SNU-423, SNU-449, SNU-475, Hep3B, HepG2 y FLC-4) con características del CHC del ser humano poco diferenciado y una expresión alta de NRP-2 en cáncer hepático avanzado. Mientras que, en tejido hepático normal no se detectó la expresión de NRP-2 [58]. La elevada expresión de NRP-2 es inducida por una señalización anormal de Factor de Crecimiento Transformante – β (TGF- β / Smad) en células del CHC que otorgan características de migración a las células tumorales [58].

El aumento en la expresión genética de *Nrp-2* podría ser un marcador del CHC, como consecuencia de regular funciones necesarias en el CHC como son la migración e invasión celular de acuerdo con lo reportado en la literatura [58]; correlacionándolo con un grado tumoral alto *in vivo*. Sin embargo, su determinación a nivel de proteína sigue siendo necesaria.

NRP-1

Por otro lado, la expresión de NRP-1 en condición fisiológica se expresa en corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón y páncreas. Su expresión aumenta en cáncer gástrico, colorrectal, próstata, mama, colangiocarcinoma y adenocarcinoma de conducto pancreático y el CHC. Al igual que NRP-2 puede funcionar como receptor para diferentes ligandos como son los VEGF, TGF- β y las semaforinas. SEMA3A se une a NRP-1 en una forma homodimérica al complejo dimérico de NRP-1 / PLEXINA1A en estequiometría de 2:2:2 y SEMA3C se une a ambas NRP [56]. En las células de cáncer, NRP-1 funciona como barrera en la inmunidad antitumoral celular, donde NRP-1 interactúa con SEMA4A que se expresa en las células T reguladoras intratumorales para regular la función y luego limitar sus funciones frente al tumor. Lin (2018) demostró que el Factor de Transcripción de Dominio TEA (TEAD) es el promotor de la expresión de NRP-1 en el CHC, y éste es responsable

de procesos como la angiogénesis tumoral, viabilidad celular, disminución en la capacidad de formar colonias y un aumento de apoptosis; lo anterior expone las capacidades protumorigénicas de NRP-1 en el CHC [59].

De manera interesante, la expresión de *Nrp-1* aumentó entre 6 a 22 semanas del modelo de hepatocarcinogénesis, siendo significativo solo en ratas Wistar en la semana 18 de tratamiento. Berge (2011) identificó una expresión en aumento oscilante de *Nrp-1* en el CHC del ratón [60]. Lin (2018) y Berge (2011) reportaron un aumento de NRP-1 en el CHC, en líneas celulares del CHC del ser humano y el CHC del ratón. Nuestros resultados no muestran un aumento de la proteína NRP-1 en el hígado de ratas Fischer 344 sometida a hepatocarcinogénesis. La localización histológica de NRP-1 se encontró en el citoplasma de los hepatocitos en hígado normal y en muestras hepáticas con tumores. Estos hallazgos discrepan de los reportados por Lin (2018) y Berge (2011) donde reportan una expresión en la membrana celular con intensidad débil a muy predominante tanto en tejido hepático normal, así como en el tejido neoplásico. Ambos trabajos no reportan expresión en muestras normales de pacientes; pero sí en muestras que provienen del ratón [59, 60].

Posiblemente las discrepancias encontradas podrían deberse a la especie de estudio (el ser humano, el ratón y la rata); por lo tanto, sería necesario investigar en muestras del ser humano y ratones para replicar los experimentos.

SEMA6A

Es una proteína transmembranal que se descubrió en el desarrollo del sistema nervioso central. Controla la guía de axones mediante la reorganización del citoesqueleto neuronal mediante su región intracelular. Los receptores canónicos para SEMA6A son PLEXINA2A y PLEXINA4A. SEMA6A se ha relacionado como regulador de la angiogénesis y en el crecimiento vascular, modula la señalización del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR)-2 en células endoteliales HUVEC [61]. De igual manera, se relaciona con la viabilidad y supervivencia de células de glioblastoma humano U251 y U87 [62].

Loria (2015) observó que la sobreexpresión de SEMA6A aumenta la proliferación y supervivencia de células BRAF^{V600E} derivadas de melanoma, aunque el mecanismo que produce el efecto se desconoce, éste no se realiza por medio de sus receptores PLEXINA2A ó PLEXINA4A [63]. Diversos reportes indican que las diferentes regiones de SEMA6A tienen efectos diferentes en las células del cáncer. Chen (2019) reportó que Sema6A de longitud completa regula la migración de células de cáncer de pulmón H1299 mediante la regulación de NRF2/HMOX1. Aunque aún se desconoce el mecanismo molecular, se ha propuesto que pudiera ser regulando la expresión del complejo de receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) y el translocador nuclear del receptor de hidrocarburo de arilo (ARNT) [64]. Por otro lado, Shen (2018) observó el efecto que tiene el dominio extracelular de SEMA6A sobre la señalización del dominio de muerte asociado a FAS (FADD). Se determinó que existe una disminución sobre la apoptosis en células de cáncer de pulmón A549 y H1299 cuando está presente SEMA6A de longitud completa, mientras que SEMA6A sin el dominio extracelular induce apoptosis al interactuar con FADD, lo cual provoca la escisión de caspasa-8 y posterior muerte celular [65].

Los datos de expresión de ARNm de *Sema6A* mostraron un aumento significativo de hasta 12 veces en los hígados con tumores multifocales de 18 semanas respecto del hígado normal. Dhanabal (2005) reportó un aumento de ARNm de *Sema6A* en células de carcinoma renal [66],[67]; estos resultados sugieren que el aumento de *Sema6A* podría ser común en los procesos de carcinogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*.

La determinación de la expresión de SEMA6A por inmunofluorescencia en tejidos hepáticos incluidos en parafina reveló una expresión en el núcleo de los hepatocitos que no cambió con el desarrollo de la hepatocarcinogénesis. Hasta el momento no existen reportes que describan el papel que desempeña SEMA6A en el núcleo de las células, por lo que este dato es valioso en la investigación del desarrollo del cáncer y en concreto del CHC. Sin embargo, en otros tipos de cáncer, la determinación de la expresión de SEMA6A por IHC reveló una localización celular en el citoplasma y núcleo de células provenientes de glioblastoma multiforme. La

baja expresión de SEMA6A en tumores se asoció con el tiempo de progresión, diámetro del tumor y un peor pronóstico de vida [62].

El análisis de la expresión de SEMA6A por Western blot reveló una banda a 98 kDa con un aumento curso temporal en la hepatocarcinogénesis (Figura 13 y 14). Dhanabal (2005), expresó el dominio extracelular de SEMA6A del ser humano en células derivadas de Ovario de Hámster Chino (CHO-K1), posterior a la purificación; la proteína migró con un peso ~98 kDa y mostró actividad inhibitoria del VEGF/bFGF y con ello la migración de células endoteliales tumorales que expresan SEMA6A de longitud completa (~120 kDa según lo reportado por el autor) proveniente del ser humano. La adición de SEMA6A extracelular induce cambios morfológicos en células HUVEC al regular la organización de los filamentos de actina e inhibir la migración endotelial [67]. Shen (2018) transfectó SEMA6A de longitud completa, el dominio extracelular y el dominio citoplasmático-transmembranal y por Western blot encontró diferentes bandas donde el dominio extracelular de SEMA6A muestra tres bandas a ~103 kDa, ~98 kDa y ~70 kDa [65]. Nuestro análisis de expresión de SEMA6A por Western blot mostró tres bandas a ~98 kDa, ~89 kDa y ~44 kDa, lo anterior, hace suponer que la proteína detectada en el CHC de la rata podría corresponder a la región extracelular de SEMA6A. Lo anterior concuerda también con lo reportado en el inserto del anticuerpo anti-Sema6A (identificado con el código ab154938 propiedad de abcam®), el cual especifica que el inmunógeno utilizado corresponde a una región de la parte extracelular de Sema6A.

Observamos un fenómeno interesante, donde la expresión de SEMA6A de 98 kDa aumentó en la hepatocarcinogénesis en la rata, mientras que SEMA6A de 89 kDa disminuyó significativamente desde las lesiones nodulares de 6 semanas de tratamiento. Tampoco se sabe si es específico del CHC o puede encontrarse en otros tipos de cáncer. Es necesaria la investigación de este fenómeno en el futuro para determinar si el cambio de perfil de bandas de 98 y 89 kDa tiene alguna relevancia en la hepatocarcinogénesis.

SEMA3B

La proteína SEMA3B es una proteína secretada. Su expresión en tejido normal (pulmón, mama y ovario) es alta, pero, disminuye en diferentes tipos de cáncer como: los cánceres que provienen de los órganos mencionados anteriormente, cáncer de endometrio y carcinoma de próstata. La SEMA3B inicialmente se describió como una molécula inhibitoria del guiado axonal. Los receptores de SEMA3B son NRP-1 y NRP-2 en conjunto con PLEXINA1A y PLEXINA3A estas últimas son las responsables de la traducción de señal celular. La SEMA3B se considera una proteína supresora de tumores cuya expresión aumentada se relaciona con un mejor pronóstico al inhibir la invasión e inducir apoptosis tumoral [68-70]. Nuestros resultados mostraron que la expresión de *Sema3B* a nivel de ARNm aumentó en la hepatocarcinogénesis en los dos tipos de ratas analizadas alcanzando una significancia estadística en los hígados con tumores multinodulares de 18 semanas.

Castro (2008) reportó que SEMA3B posee actividad inhibitoria sobre la fosfatidilinositol 3 quinasa PI3K/Akt (regula la supervivencia celular, progresión del ciclo celular y crecimiento celular). Esta actividad es realizada al competir con el VEGF-A por el receptor NRP-1 en cáncer de pulmón en células no pequeñas y células de cáncer mama MDA-MB-231; por lo que la alta expresión de SEMA3B en tumores podría resultar en inhibición de la proliferación celular y en la inducción de apoptosis de manera dependiente de NRP-1 [70].

Las siguientes referencias describen aspectos sobre la regulación de *Sema3B* en diversos tipos de cáncer: Shani (2017) realizó un análisis *in silico* que indicó una disminución en la expresión de *Sema3B* en cáncer de mama junto con el factor de transcripción *GATA3* [69]. Experimentos *in vitro* demuestran que *GATA3* es promotor positivo de la expresión de *Sema3B* en células epiteliales mamarias, a su vez SEMA3B regula la migración celular en células de cáncer de mama MDA-MB-231. *GATA3* y SEMA3B inhiben la migración tumoral al regular negativamente los genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima (EMT) y aumentando la comunicación célula-célula [69]. Hu (2019) por otro lado, observó que la proteína de

matriz extracelular similar a fibulina, que contiene el factor de crecimiento epidérmico (EFEMP 1), modula la proliferación celular y promueve la apoptosis mediante apoptosis mitocondrial en el CHC al modular la expresión de SEMA3B [71].

Al interrogar la localización histológica de SEMA3B observamos una expresión conservada en el citoplasma de los hepatocitos desde tejido normal, lesiones nodulares de 6 semanas hasta tumores multifocales de 22 semanas. Aunque no existen datos suficientes sobre la localización de la proteína SEMA3B en el hígado, Dziobek (2019) reportó una expresión de SEMA3B en muestras de cáncer de endometrio por inmunohistoquímica, observó una expresión reducida en la membrana de las células [72]; mientras que Guo (2019) observó una expresión en el núcleo y citoplasma de muestras de adenocarcinoma de cardias gástrico (ACG), con una prevalencia en el citoplasma de las muestras normales sobre las tumorales [73].

La expresión de la proteína SEMA3B mostró una disminución conforme avanzó el tiempo de hepatocarcinogénesis, alcanzó una significancia estadística desde las muestras de 12 semanas y hasta las 22 semanas. Similarmente a nuestros resultados, Tischoff (2005) analizó la expresión de *Sema3B* en muestras del CHC y encontró una disminución de la expresión que se correlacionó con la hipermetilación de la región promotora del gen *Sema3B* [74]. En otros tipos de cáncer se han documentado variaciones en la expresión de SEMA3B; Joseph (2010) observó una disminución de la expresión de SEMAB en células de cáncer de ovario al compararlas con la expresión de las células epiteliales de ovario normal proveniente del ser humano. La sobreexpresión de SEMA3B en células OVCA-420 disminuyó el crecimiento celular y la invasividad [68]. Castro (2008) no detectó expresión de SEMA3B en células de cáncer de mama y pulmón por Western blot, mientras que al añadir SEMA3B de manera exógena indujo una disminución en la supervivencia celular y un aumento de la apoptosis [70]. La disminución de SEMA3B está relacionada con el tiempo de progresión del CHC (Figura 10) concuerda con los

reportes para diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, hasta el momento no hay publicaciones sobre la función y relevancia biológica de SEMA3B en el CHC.

Existen procesos celulares cuyo propósito es mantener un estado de equilibrio entre las células y su entorno. El dogma central de la biología sostiene que el flujo de información va de ADN a ARN y finalmente a proteína, pero existe una incertidumbre en la correlación entre los niveles de ARNm y los niveles de proteína. Estos genes muestran una discrepancia entre la expresión de ARNm y el nivel de proteína; evidenciando la importante función de los procesos de regulación postranscripcional (proteínas de unión al RNAm, modificación de ARN y regulaciones de microARN) y traduccional (control global y regulación específica) [75, 76]; sin embargo, aún no está claro en qué momentos del proceso y hasta qué grado, contribuyen cada uno de los procesos de regulación [77].

La discrepancia entre ARNm y proteína se ha logrado observar mejor con el mejoramiento de la tecnología que permite observar la diferencia cada vez más precisa; en la literatura se encuentran reportados diversos genes con esta discrepancia. Wang (2009) analizó la expresión de la enzima convertidora de angiotensina intrarrenal (ECA) y la ECA tipo 2 en área tubulointerstitial en pacientes con nefropatía diabética; la expresión de ARNm aumentó en ambos genes, pero ACE a nivel de proteína no cambió con respecto a sus controles sanos, mientras que, ACE2 disminuyó al compararlos con controles sanos [78]. Por otra parte, Thanhaei (2018) describió una discrepancia en la expresión génica de la proteína 5 que contiene el dominio de unión de fibronectina tipo II (Fndc5); esta discrepancia es causada por miARN que se dirigen a Fndc5, desempeñando un papel importante en la regulación de la cantidad de proteína en el sistema nervioso central de rata y ratón [79]. Actualmente, el mecanismo por el cual se regula la expresión génica aún no está claro.

La discrepancia que existe entre el aumento de expresión de *Sema3B* a nivel de ARNm y los niveles disminuidos de proteína SEMA3B probablemente se deban las alteraciones en los mecanismos moleculares desregulados en la carcinogénesis.

Estos mecanismos incluyen desregulaciones postraduccionales o alteraciones en la regulación de la traducción [80, 81].

El estudio de enfermedades en modelos animales tiene como reto recapitular las patologías del ser humano. Esto se debe a que, la rata tiene un metabolismo similar al ser humano [82]. La rata es el mejor modelo para estudiar el cáncer debido a los mecanismos genéticos similares que llevan a desarrollar cáncer. Actualmente, se han desarrollado cepas de ratas mediante la crianza selectiva de individuos que expresan características deseadas, creando así una gran cantidad de modelos genéticos con características que se pueden aprovechar en la investigación de patologías [83].

La cepa de ratas Wistar se utiliza en modelos de diversas áreas de investigación incluyendo toxicología y oncología. Estudios longitudinales para observar la incidencia de tumores espontáneos en esta cepa de rata concluyen que es resistente a carcinogénesis a pesar de ser una rata con altas tasas de supervivencia al ser comparadas con ratas Sprague - Dawley y Fischer 344 [84].

En ratas Fischer 344 se han utilizado en diferentes modelos como: toxicología, estudios de envejecimiento y cáncer. Entre los estudios de cáncer destacan los modelos con mutaciones en *TP53* [82]; al estudiar su genoma se ha encontrado a las ratas Fischer 344 como una cepa de rata susceptible a desarrollar el CHC [85].

En general, la comparación de ARNm en ratas Fischer 344, sensible a la carcinogénesis y ratas Wistar, resistente a la carcinogénesis, fueron similares. De manera general, la discrepancia entre los niveles de proteínas y la expresión de ARNm evidencian mecanismos de regulación de las semaforinas y sus receptores que requieren ser investigados, así como las funciones que desempeñan en procesos que incluyen la carcinogénesis.

Conclusiones

1. Se confirmó cuantitativamente el aumento en la expresión de los genes *Sema3B*, *Sema3E*, *Sema6A*, *PlxnD1*, *Plxn3A*, *Nrp-1* y *Nrp-2* en el modelo de hepatocarcinogénesis descrito por Schiffer.
2. El desarrollo de la hepatocarcinogénesis mediante en el modelo descrito por Schiffer, es semejante entre las ratas Fischer 344 susceptible a carcinogénesis y Wistar, resistente a desarrollar carcinogénesis.
3. El aumento en la expresión génica de las semaforinas (*Sema3B*, *Sema3E*, *Sema6A*), plexinas (*PlxnD1* y *Plxn3A*) y neuropilinas (*Nrp-1* y *Nrp-2*) fue consistente a las 18 semanas, considerada como etapa tumoral, para las dos cepas de ratas analizadas.
4. No se observaron cambios en la expresión de la proteína NRP-1, mientras que la proteína SEMA3B disminuyó desde la semana 6, considerado como etapa temprana de la hepatocarcinogénesis.
5. Se observó un cambio en el perfil de la expresión de SEMA6A, este perfil se invierte de manera curso temporal, y la proteína correspondiente a 89 kDa de SEMA6A disminuyó desde etapas tempranas.
6. La localización histológica de SEMA3B y NRP-1 se observó en el citoplasma de los hepatocitos en muestras hepáticas normales y en muestras del protocolo de hepatocarcinogénesis
7. SEMA6A se observó en el núcleo de los hepatocitos en el hígado normal y en las muestras de 6 a 18 semanas del protocolo de hepatocarcinogénesis, mientras que para la semana 22 se observó en el citoplasma de los hepatocitos.
8. No se encontró una relación entre el nivel de ARNm y los niveles de proteína, mostrando una desregulación de los productos génicos de las semaforinas, plexinas y neuropilinas en el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

Perspectivas

Los resultados muestran que las semaforinas y sus receptores están presentes en el desarrollo del CHC; debido a que algunas de las semaforinas se excretan o sufren escisión, se sugiere realizar un análisis de estas proteínas en plasma o en suero. Y así determinar su presencia en sangre periférica.

Debido a que en la determinación de la localización histológica de las semaforinas se esperaba una localización en la membrana de los hepatocitos, se sugiere realizar análisis compartimentalizado de núcleo, membrana y citoplasma para confirmar su localización.

Se sugiere seguir investigando para conocer el papel que desempeñan las semaforinas en la hepatocarcinogénesis; así como los mecanismos que regulan su expresión a nivel de proteínas.

Referencias

- [1] WHO. "Cancer." <https://www.who.int/cancer/es/> (accessed 25 Febrero 2020, 2020).
- [2] J. Rehm *et al.*, "Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis," *Drug Alcohol Rev*, vol. 29, no. 4, pp. 437-45, Jul 2010, doi: 10.1111/j.1465-3362.2009.00153.x.
- [3] A. Roskilly and I. A. Rowe, "Surveillance for hepatocellular cancer," *Clin Med (Lond)*, vol. 18, no. Suppl 2, pp. s66-s69, Apr 1 2018, doi: 10.7861/clinmedicine.18-2-s66.
- [4] M. Rehman and L. Tamagnone, "Semaphorins in cancer: biological mechanisms and therapeutic approaches," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 24, no. 3, pp. 179-89, Mar 2013, doi: 10.1016/j.semcdb.2012.10.005.
- [5] G. Neufeld *et al.*, "The role of the semaphorins in cancer," *Cell Adh Migr*, vol. 10, no. 6, pp. 652-674, Nov 2016, doi: 10.1080/19336918.2016.1197478.
- [6] E. Schiffer *et al.*, "Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis," *Hepatology*, vol. 41, no. 2, pp. 307-14, Feb 2005, doi: 10.1002/hep.20538.
- [7] K. Murakami and H. Matsubara, "Chronology of gastrointestinal cancer," *Surg Today*, vol. 48, no. 4, pp. 365-370, Apr 2018, doi: 10.1007/s00595-017-1574-y.
- [8] J. M. Llovet *et al.*, "Hepatocellular carcinoma," *Nat Rev Dis Primers*, vol. 2, p. 16018, Apr 14 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.18.
- [9] D. Janevska, V. Chaloska-Ivanova, and V. Janevski, "Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors, Diagnosis and Treatment," *Open Access Maced J Med Sci*, vol. 3, no. 4, pp. 732-6, Dec 15 2015, doi: 10.3889/oamjms.2015.111.
- [10] C. Meng, X. Shen, and W. Jiang, "Potential biomarkers of HCC based on gene expression and DNA methylation profiles," *Oncol Lett*, vol. 16, no. 3, pp. 3183-3192, Sep 2018, doi: 10.3892/ol.2018.9020.
- [11] WHO. "Source: Mexico Globocan 2018." <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf> (accessed 26 Noviembre 2019, 2019).
- [12] M. Pinter, M. Trauner, M. Peck-Radosavljevic, and W. Sieghart, "Cancer and liver cirrhosis: implications on prognosis and management," *ESMO Open*, vol. 1, no. 2, p. e000042, 2016, doi: 10.1136/esmoopen-2016-000042.
- [13] M. G. Chavez-Lopez, V. Zuniga-Garcia, J. I. Perez-Carreón, A. Avalos-Fuentes, Y. Escobar, and J. Camacho, "Eag1 channels as potential early-stage biomarkers of

- hepatocellular carcinoma," *Biologics*, vol. 10, pp. 139-148, 2016, doi: 10.2147/BTT.S87402.
- [14] H. B. El-Serag, J. A. Marrero, L. Rudolph, and K. R. Reddy, "Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma," *Gastroenterology*, vol. 134, no. 6, pp. 1752-63, May 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.090.
- [15] N. Rich and A. G. Singal, "Hepatocellular carcinoma tumour markers: current role and expectations," *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, vol. 28, no. 5, pp. 843-53, Oct 2014, doi: 10.1016/j.bpg.2014.07.018.
- [16] K. Schutte, C. Schulz, A. Link, and P. Malfertheiner, "Current biomarkers for hepatocellular carcinoma: Surveillance, diagnosis and prediction of prognosis," *World J Hepatol*, vol. 7, no. 2, pp. 139-49, Feb 27 2015, doi: 10.4254/wjh.v7.i2.139.
- [17] N. Tsuchiya, Y. Sawada, I. Endo, K. Saito, Y. Uemura, and T. Nakatsura, "Biomarkers for the early diagnosis of hepatocellular carcinoma," *World J Gastroenterol*, vol. 21, no. 37, pp. 10573-83, Oct 7 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i37.10573.
- [18] N. P. Santos, A. A. Colaco, and P. A. Oliveira, "Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review," *Tumour Biol*, vol. 39, no. 3, p. 1010428317695923, Mar 2017, doi: 10.1177/1010428317695923.
- [19] E. Deml, D. Oesterle, T. Wolff, and H. Greim, "Age-, sex-, and strain-dependent differences in the induction of enzyme-altered islands in rat liver by diethylnitrosamine," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 100, no. 2, pp. 125-34, 1981, doi: 10.1007/BF00403362.
- [20] M. A. Pereira, S. L. Herren-Freund, A. L. Britt, and M. M. Khoury, "Effects of strain, sex, route of administration and partial hepatectomy on the induction by chemical carcinogens of gamma-glutamyltranspeptidase foci in rat liver," *Cancer Lett*, vol. 20, no. 2, pp. 207-14, Sep 1983, doi: 10.1016/0304-3835(83)90050-2.
- [21] F. E. Solt D, "New principle for the analysis of chemical carcinogenesis," *Nature*, vol. 263, no. 5579, pp. 701-703, 1976, doi: <https://doi.org/10.1038/263701a0>.
- [22] K. Okita, M. Gruenstein, M. Klaiber, and E. Farber, "Localization of alpha-fetoprotein by immunofluorescence in hyperplastic nodules during hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene," *Cancer Res*, vol. 34, no. 10, pp. 2758-63, Oct 1974. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4370173>.

- [23] R. M. Pascale, M. M. Simile, G. Peitta, M. A. Seddaiu, F. Feo, and D. F. Calvisi, "Experimental Models to Define the Genetic Predisposition to Liver Cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 10, Sep 27 2019, doi: 10.3390/cancers11101450.
- [24] M. Yano *et al.*, "Decreased activation of carcinogens in the liver of carcinogen-resistant rats," *Cancer Res*, vol. 49, no. 19, pp. 5352-7, Oct 1 1989. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548720>.
- [25] M. Asamoto *et al.*, "Strain differences in susceptibility to 2-acetylaminofluorene and phenobarbital promotion of hepatocarcinogenesis: immunohistochemical analysis of cytochrome P-450 isozyme induction by 2-acetylaminofluorene and phenobarbital," *Jpn J Cancer Res*, vol. 80, no. 11, pp. 1041-6, Nov 1989, doi: 10.1111/j.1349-7006.1989.tb02256.x.
- [26] Y. Yan *et al.*, "Resistance of DRH strain rats to chemical carcinogenesis of liver: genetic analysis of later progression stage," *Carcinogenesis*, vol. 23, no. 1, pp. 189-96, Jan 2002, doi: 10.1093/carcin/23.1.189.
- [27] Z. Z. Zeng *et al.*, "Genetic resistance to chemical carcinogen-induced preneoplastic hepatic lesions in DRH strain rats," *Cancer Res*, vol. 60, no. 11, pp. 2876-81, Jun 1 2000. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10850431>.
- [28] K. Enomoto and E. Farber, "Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis," *Cancer Res*, vol. 42, no. 6, pp. 2330-5, Jun 1982. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6122502>.
- [29] K. Ogawa, D. B. Solt, and E. Farber, "Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis," *Cancer Res*, vol. 40, no. 3, pp. 725-33, Mar 1980. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6110477>.
- [30] J. E. Torres Mena *et al.*, "Laser capture microdissection after gamma-glutamyl transferase histochemistry: an optimization for gene expression analysis," *Anal Biochem*, vol. 447, pp. 126-32, Feb 15 2014, doi: 10.1016/j.ab.2013.11.015.
- [31] L. Capparuccia and L. Tamagnone, "Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin," *J Cell Sci*, vol. 122, no. Pt 11, pp. 1723-36, Jun 1 2009, doi: 10.1242/jcs.030197.
- [32] L. T. Alto and J. R. Terman, "Semaphorins and their Signaling Mechanisms," *Methods Mol Biol*, vol. 1493, pp. 1-25, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6448-2_1.

- [33] L. Tamagnone, "Emerging role of semaphorins as major regulatory signals and potential therapeutic targets in cancer," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 2, pp. 145-52, Aug 14 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.031.
- [34] C. Junqueira Alves, K. Yotoko, H. Zou, and R. H. Friedel, "Origin and evolution of plexins, semaphorins, and Met receptor tyrosine kinases," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 1970, Feb 13 2019, doi: 10.1038/s41598-019-38512-y.
- [35] L. Tamagnone *et al.*, "Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates," *Cell*, vol. 99, no. 1, pp. 71-80, Oct 1 1999, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80063-x.
- [36] E. S. Ch'ng and A. Kumanogoh, "Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression," *Mol Cancer*, vol. 9, p. 251, Sep 21 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-251.
- [37] G. Neufeld and O. Kessler, "The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis," *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 632-45, Aug 2008, doi: 10.1038/nrc2404.
- [38] L. M. Ellis, "The role of neuropilins in cancer," *Mol Cancer Ther*, vol. 5, no. 5, pp. 1099-107, May 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0538.
- [39] H. F. Guo and C. W. Vander Kooi, "Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor," *J Biol Chem*, vol. 290, no. 49, pp. 29120-6, Dec 4 2015, doi: 10.1074/jbc.R115.687327.
- [40] R. A. Bradshaw and E. A. Dennis, *Handbook of cell signaling*. Academic Press, 2004.
- [41] P. K. Smith *et al.*, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal Biochem*, vol. 150, no. 1, pp. 76-85, Oct 1985, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [42] K. Weber, "Differences in Types and Incidence of Neoplasms in Wistar Han and Sprague-Dawley Rats," *Toxicol Pathol*, vol. 45, no. 1, pp. 64-75, Jan 2017, doi: 10.1177/0192623316672075.
- [43] S. Prislei *et al.*, "From plasma membrane to cytoskeleton: a novel function for semaphorin 6A," *Mol Cancer Ther*, vol. 7, no. 1, pp. 233-41, Jan 2008, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0390.
- [44] R. Maejima *et al.*, "Enhanced expression of semaphorin 3E is involved in the gastric cancer development," *Int J Oncol*, vol. 49, no. 3, pp. 887-94, Sep 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3593.

- [45] A. Casazza *et al.*, "Sema3E-Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice," *J Clin Invest*, vol. 120, no. 8, pp. 2684-98, Aug 2010, doi: 10.1172/JCI42118.
- [46] A. Casazza *et al.*, "Tumour growth inhibition and anti-metastatic activity of a mutated furin-resistant Semaphorin 3E isoform," *EMBO Mol Med*, vol. 4, no. 3, pp. 234-50, Mar 2012, doi: 10.1002/emmm.201100205.
- [47] H. Chen *et al.*, "Epigenetically downregulated Semaphorin 3E contributes to gastric cancer," *Oncotarget*, vol. 6, no. 24, pp. 20449-65, Aug 21 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3936.
- [48] L. K. Yong *et al.*, "Overexpression of Semaphorin-3E enhances pancreatic cancer cell growth and associates with poor patient survival," *Oncotarget*, vol. 7, no. 52, pp. 87431-87448, Dec 27 2016, doi: 10.18632/oncotarget.13704.
- [49] S. Vivekanadhan and D. Mukhopadhyay, "Divergent roles of Plexin D1 in cancer," *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, vol. 1872, no. 1, pp. 103-110, Aug 2019, doi: 10.1016/j.bbcan.2019.05.004.
- [50] J. Luchino *et al.*, "Semaphorin 3E suppresses tumor cell death triggered by the plexin D1 dependence receptor in metastatic breast cancers," *Cancer Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 673-85, Nov 11 2013, doi: 10.1016/j.ccr.2013.09.010.
- [51] I. Roodink *et al.*, "Semaphorin 3E expression correlates inversely with Plexin D1 during tumor progression," *Am J Pathol*, vol. 173, no. 6, pp. 1873-81, Dec 2008, doi: 10.2353/ajpath.2008.080136.
- [52] M. Rehman, S. Gurrapu, G. Cagnoni, L. Capparuccia, and L. Tamagnone, "PlexinD1 Is a Novel Transcriptional Target and Effector of Notch Signaling in Cancer Cells," *PLoS One*, vol. 11, no. 10, p. e0164660, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0164660.
- [53] P. K. Hota and M. Buck, "Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions," *Cell Mol Life Sci*, vol. 69, no. 22, pp. 3765-805, Nov 2012, doi: 10.1007/s00018-012-1019-0.
- [54] K. Katayama, F. Imai, F. Suto, and Y. Yoshida, "Deletion of Sema3a or plexinA1/plexinA3 causes defects in sensory afferent projections of statoacoustic ganglion neurons," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e72512, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0072512.
- [55] A. Ben-Zvi, O. Manor, M. Schachner, A. Yaron, M. Tessier-Lavigne, and O. Behar, "The Semaphorin receptor PlexinA3 mediates neuronal apoptosis during dorsal root

- ganglia development," *J Neurosci*, vol. 28, no. 47, pp. 12427-32, Nov 19 2008, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3573-08.2008.
- [56] S. Niland and J. A. Eble, "Neuropilins in the Context of Tumor Vasculature," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 3, Feb 1 2019, doi: 10.3390/ijms20030639.
- [57] S. Samuel *et al.*, "Neuropilin-2 mediated beta-catenin signaling and survival in human gastro-intestinal cancer cell lines," *PLoS One*, vol. 6, no. 10, p. e23208, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0023208.
- [58] P. Wittmann *et al.*, "Neuropilin-2 induced by transforming growth factor-beta augments migration of hepatocellular carcinoma cells," *BMC Cancer*, vol. 15, p. 909, Nov 16 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1919-0.
- [59] J. Lin *et al.*, "Neuropilin 1 (NRP1) is a novel tumor marker in hepatocellular carcinoma," *Clin Chim Acta*, vol. 485, pp. 158-165, Oct 2018, doi: 10.1016/j.cca.2018.06.046.
- [60] M. Berge *et al.*, "Neuropilin-1 is upregulated in hepatocellular carcinoma and contributes to tumour growth and vascular remodelling," *J Hepatol*, vol. 55, no. 4, pp. 866-75, Oct 2011, doi: 10.1016/j.jhep.2011.01.033.
- [61] M. Segarra *et al.*, "Semaphorin 6A regulates angiogenesis by modulating VEGF signaling," *Blood*, vol. 120, no. 19, pp. 4104-15, Nov 8 2012, doi: 10.1182/blood-2012-02-410076.
- [62] J. Zhao, H. Tang, H. Zhao, W. Che, L. Zhang, and P. Liang, "SEMA6A is a prognostic biomarker in glioblastoma," *Tumour Biol*, vol. 36, no. 11, pp. 8333-40, Nov 2015, doi: 10.1007/s13277-015-3584-y.
- [63] R. Loria *et al.*, "Sema6A and Mical1 control cell growth and survival of BRAFV600E human melanoma cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 5, pp. 2779-93, Feb 20 2015, doi: 10.18632/oncotarget.2995.
- [64] L. H. Chen, C. Y. Liao, L. C. Lai, M. H. Tsai, and E. Y. Chuang, "Semaphorin 6A Attenuates the Migration Capability of Lung Cancer Cells via the NRF2/HMOX1 Axis," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 13302, Sep 16 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49874-8.
- [65] C. Y. Shen *et al.*, "The extracellular SEMA domain attenuates intracellular apoptotic signaling of semaphorin 6A in lung cancer cells," *Oncogenesis*, vol. 7, no. 12, p. 95, Dec 5 2018, doi: 10.1038/s41389-018-0105-z.

- [66] S. Yu *et al.*, "Correlation of Long Noncoding RNA SEMA6A-AS1 Expression with Clinical Outcome in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma," *Clin Ther*, vol. 42, no. 3, pp. 439-447, Mar 2020, doi: 10.1016/j.clinthera.2020.01.012.
- [67] M. Dhanabal *et al.*, "Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis," *Cancer Biol Ther*, vol. 4, no. 6, pp. 659-68, Jun 2005, doi: 10.4161/cbt.4.6.1733.
- [68] D. Joseph, S. M. Ho, and V. Syed, "Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer," *Mol Cancer Ther*, vol. 9, no. 2, pp. 499-509, Feb 2010, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0664.
- [69] P. Shahi *et al.*, "GATA3 targets semaphorin 3B in mammary epithelial cells to suppress breast cancer progression and metastasis," *Oncogene*, vol. 36, no. 40, pp. 5567-5575, Oct 5 2017, doi: 10.1038/onc.2017.165.
- [70] E. Castro-Rivera, S. Ran, R. A. Brekken, and J. D. Minna, "Semaphorin 3B inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway through neuropilin-1 in lung and breast cancer cells," *Cancer Res*, vol. 68, no. 20, pp. 8295-303, Oct 15 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6601.
- [71] J. Hu, B. Duan, W. Jiang, S. Fu, H. Gao, and L. Lu, "Epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1) suppressed the growth of hepatocellular carcinoma cells by promoting Semaphorin 3B(SEMA3B)," *Cancer Med*, vol. 8, no. 6, pp. 3152-3166, Jun 2019, doi: 10.1002/cam4.2144.
- [72] K. Dziobek *et al.*, "Expression of Semaphorin 3B (SEMA3B) in Various Grades of Endometrial Cancer," *Med Sci Monit*, vol. 25, pp. 4569-4574, Jun 20 2019, doi: 10.12659/MSM.916762.
- [73] W. Guo *et al.*, "MiR-6872 host gene SEMA3B and its antisense lncRNA SEMA3B-AS1 function synergistically to suppress gastric cardia adenocarcinoma progression," *Gastric Cancer*, vol. 22, no. 4, pp. 705-722, Jul 2019, doi: 10.1007/s10120-019-00924-0.
- [74] I. Tischoff *et al.*, "Allele loss and epigenetic inactivation of 3p21.3 in malignant liver tumors," *Int J Cancer*, vol. 115, no. 5, pp. 684-9, Jul 10 2005, doi: 10.1002/ijc.20944.
- [75] J. M. Kim, H. C. Jung, K. I. Im, I. S. Song, and C. Y. Kim, "Synergy between *Entamoeba histolytica* and *Escherichia coli* in the induction of cytokine gene expression in human colon epithelial cells," *Parasitol Res*, vol. 84, no. 6, pp. 509-12, Jun 1998, doi: 10.1007/BF03356595.

- [76] X. Wu, W. Zhao, Q. Cui, and Y. Zhou, "Computational screening of potential regulators for mRNA-protein expression level discrepancy," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 523, no. 1, pp. 196-201, Feb 26 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.12.052.
- [77] C. Vogel and E. M. Marcotte, "Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses," *Nat Rev Genet*, vol. 13, no. 4, pp. 227-32, Mar 13 2012, doi: 10.1038/nrg3185.
- [78] G. Wang *et al.*, "Discrepancy between intrarenal messenger RNA and protein expression of ACE and ACE2 in human diabetic nephropathy," *Am J Nephrol*, vol. 29, no. 6, pp. 524-31, 2009, doi: 10.1159/000185629.
- [79] S. Tanhaei, P. Nikpour, K. Ghaedi, F. Rabiee, F. Homayouni Moghadam, and M. H. Nasr-Esfahani, "RNA/Protein Discordant Expression of Fndc5 in Central Nervous System Is Likely to Be Mediated Through microRNAs," *DNA Cell Biol*, vol. 37, no. 4, pp. 373-380, Apr 2018, doi: 10.1089/dna.2017.4067.
- [80] C. Buccitelli and M. Selbach, "mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control," *Nat Rev Genet*, vol. 21, no. 10, pp. 630-644, Oct 2020, doi: 10.1038/s41576-020-0258-4.
- [81] J. Schedel *et al.*, "Discrepancy between mRNA and protein expression of tumour suppressor maspin in synovial tissue may contribute to synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis," *Ann Rheum Dis*, vol. 63, no. 10, pp. 1205-11, Oct 2004, doi: 10.1136/ard.2003.006312.
- [82] S. A. Hansen *et al.*, "Fischer-344 Tp53-knockout rats exhibit a high rate of bone and brain neoplasia with frequent metastasis," *Dis Model Mech*, vol. 9, no. 10, pp. 1139-1146, Oct 1 2016, doi: 10.1242/dmm.025767.
- [83] C. Szpirer, "Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes," *J Biomed Sci*, vol. 27, no. 1, p. 84, Aug 2 2020, doi: 10.1186/s12929-020-00673-8.
- [84] R. Eiben and E. M. Bomhard, "Trends in mortality, body weights and tumor incidences of Wistar rats over 20 years," *Exp Toxicol Pathol*, vol. 51, no. 6, pp. 523-36, Nov 1999, doi: 10.1016/S0940-2993(99)80133-X.
- [85] F. Feo *et al.*, "Hepatocellular carcinoma as a complex polygenic disease. Interpretive analysis of recent developments on genetic predisposition," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1765, no. 2, pp. 126-47, Apr 2006, doi: 10.1016/j.bbcan.2005.08.007.