

PONIENDO EN CLARO

Modelos animales de carcinoma hepatocelular y sus aplicaciones en biomedicina

Irati López de la Pisa (ilopedo2@unileon.es)

Resumen

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la segunda causa de muerte por cáncer en todo el mundo y el subtipo histológico más común cáncer primario de hígado. Teniendo este escenario en consideración, los modelos animales de CHC son esenciales para entender la enfermedad a nivel molecular, para el desarrollo de nuevas vías de tratamiento y para la realización de ensayos preclínicos. La presente revisión se centra en las características de los modelos animales químicamente inducidos, de implantación y de los modelos animales de enfermedad de hígado graso no alcohólico/esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD/NASH). Además, dado que los métodos de detección identifican el CHC en etapas tardías, su naturaleza asintomática en etapas tempranas y su refractariedad a casi todas las terapias actuales, las nuevas líneas de investigación junto con las nuevas y actuales vías de tratamiento también se discuten en esta revisión.

Palabras clave: antioxidantes, carcinoma hepatocelular, inhibidores de quinasas, metabolómica, modelos animales, terapéutica.

Introducción

El carcinoma hepatocelular (CHC) es la segunda causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo (García *et al.*, 2018) y, con mucho, el subtipo histológico más común del cáncer primario de hígado (Santos *et al.*, 2017). Se desarrolla en el 80% de los casos, en un hígado con lesión crónica (Caviglia y Schwabe, 2015) y presenta dos grupos principales de factores de riesgo: virales (infecciones por el virus de la hepatitis B y el virus de la hepatitis C) y no virales (obesidad, síndrome metabólico (SM), enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), exposición ambiental a aflatoxinas y consumo excesivo de alcohol, etc.) (Shankaraiah *et al.*, 2019).

Modelos animales de carcinoma hepatocelular

Actualmente, se emplea una gran variedad de modelos murinos de CHC para estudios preclínicos que incluyen modelos inducidos químicamente, transgénicos y de xenoinjerto (Rao *et al.*, 2016) (**Tabla 1**).

Forma de mencionar este artículo: López de la Pisa, I. 2020, Modelos animales de carcinoma hepatocelular y sus aplicaciones en biomedicina. AmbioCiencias, 18, 19-30. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

Modelos químicamente inducidos

Existen dos tipos de compuestos cancerígenos: compuestos genotóxicos que inducen cambios estructurales en el ADN y compuestos promotores mejoran la formación de tumores (Santos *et al.*, 2017).

1. Dietinitrosamina (DEN)

La DEN produce la alquilación de estructuras del ADN y la inducción de especies reactivas de oxígeno en los hepatocitos (Zhang *et al.*, 2019) pero no abarca ni inflamación ni fibrosis (Caviglia y Schwabe, 2015). Se administra mediante una sola inyección intraperitoneal (Henderson *et al.*, 2017) y lleva al menos un año manifestar y representar el CHC humano de manera relativamente efectiva (Zhang *et al.*, 2019).

2. Fenobarbital (PB)

El PB es un fármaco antiepiléptico que causa tumores en el hígado de roedores después de la administración crónica (Zhang *et al.*, 2019) y cuyos mecanismos en el desarrollo del CHC no se comprenden completamente (Santos *et al.*, 2017).

3. Tetracloruro de carbono (CCL₄)

El CCL₄ produce la liberación del radical peróxido de triclorometil que altera la integridad de las membranas celulares (Santos *et al.*, 2017) y, en consecuencia, conduce a ciclos repetidos de lesión, inflamación y reparación que derivan en fibrosis y eventualmente en CHC (De Minicis *et al.*, 2013). Se administra a través de una inyección intraperitoneal (Henderson *et al.*, 2017), en gases inhalados o en agua potable junto a compuestos como PB (Newell *et al.*, 2008).

4. 2-acetilaminofluoreno (2-AAF)

El 2-AAF es empleado principalmente como control positivo en estudios de carcinogenicidad y mutagenicidad. Es transformado en N- hidroxí-AAF cuya activación conduce a la formación de formas reactivas que causan toxicidad, muerte celular y carcinogénesis (Santos *et al.*, 2017).

5. Tioacetamida (TAA)

La TAA es un modelo bien establecido de fibrosis hepática en roedores, sin embargo, sus mecanismos moleculares todavía no se comprenden completamente (Henderson *et al.*, 2017). Puede ser administrado mediante agua potable o inyecciones intraperitoneales que conducen a necrosis centrilobular hepática y fibrosis hepática (Zhang *et al.*, 2019).

6. Aflatoxinas

La aflatoxina B1 es el componente principal de las mezclas de aflatoxinas (Mazzanti *et al.*, 2008), micotoxinas producidas por el hongo *Aspergillus* spp. (De Minicis *et al.*, 2013) que es metabolizada en AFB₁-exo-8,9-epóxido el cual se une al ADN formando aductos con residuos de guanina y con la albúmina del suero sanguíneo. El desarrollo de CHC se logra con una tasa de éxito de casi el 100% (McGlynn *et al.*, 2003).

Modelos de implantación

Los modelos de implantación pueden dividirse en dos tipos: modelos ectópicos y modelos ortotópicos, en función del lugar de implantación de los injertos, y modelos de aloinjerto y xenoinjerto, en función de la relación entre el injerto y el hospedador (He *et al.*, 2015) (**Tabla 1**).

1. Modelos de xenoinjerto

Los modelos de xenoinjerto se inducen mediante la inyección de células cancerosas humanas en ratones inmunodeficientes (Heindryckx *et al.*, 2009) y presentan un crecimiento tumoral rápido (De Minicis *et al.*, 2013).

Los principales modelos de xenoinjerto son, por un lado, los modelos ectópicos que se caracterizan por la implantación subcutánea de células CHC humanas o fragmentos de tejido tumoral en ratones inmunodeficientes (He *et al.*, 2015). Por otro lado, se encuentran los modelos ortotópicos que se basan en un microambiente inmunosupresor murino (Jung, 2014) y presentan cuatro enfoques, siendo el enfoque de implantación intrahepática el más relevante clínicamente ya que presenta patologías típicas y un patrón de metástasis similar al que se manifiesta clínicamente en pacientes con CHC (Rao *et al.*, 2016).

Por último, se encuentra el ensayo de fibra hueca (HFA). Este método se basa en la colocación de líneas celulares tumorales en fibras de fluoruro de polivinilideno que permite determinar la eficacia del fármaco (Santos *et al.*, 2017) y probar múltiples líneas celulares en un mismo ratón (Heindryckx *et al.*, 2009).

2. Modelos de aloinjerto

Los modelos de aloinjerto se establecen mediante la implantación de líneas celulares de CHC murinas o fragmentos de tumores murinos en ratones inmunocompetentes (no necesariamente singénicos) (He *et al.*, 2015).

Tabla 1. Resumen de los principales modelos químicamente inducidos y de implantación.

Modelos animales		Tiempo de desarrollo tumoral	Ventajas	Desventajas	Referencias
Químicos	DEN	45-104 semanas (dependiendo de la dosis)	Fácilmente combinable con métodos que promueven enfermedades hepáticas	El tiempo de desarrollo del CHC no depende únicamente de la dosis, sino que también depende de la cepa, sexo y edad	Zhang <i>et al.</i> , 2019
	Administración única	40-60 semanas			Santos <i>et al.</i> , 2017
	Administración a corto plazo	20-35 semanas			Brown <i>et al.</i> , 2018
	Administración a largo plazo	20-40 semanas			Heindryckx <i>et al.</i> , 2009
	+ PB + HP	4-8 semanas (en ratas)			
	CCl ₄	104 semanas	Induce fibrosis mediante radicales libres	El grado de susceptibilidad varía entre especies, cepas y programas de administración	Zhang <i>et al.</i> , 2019 Santos <i>et al.</i> , 2017
	2-AAF	22 semanas	Agente promotor en modelos de hepatocarcinogénesis	-	Santos <i>et al.</i> , 2017
	TAA	50-80 semanas	Modelo bien establecido de fibrosis hepática	Compresión incompleta de sus mecanismos de acción	Zhang <i>et al.</i> , 2019 Henderson <i>et al.</i> , 2016
	Aflatoxinas	CHC temprano 52 semanas	Útil para evaluar los mecanismos involucrados en la hepatocarcinogénesis inducida por AFB	Se limita a los casos específicos en los que los mecanismos del CHC inducido por AFB tienen que ser aclarados	Santos <i>et al.</i> , 2017
CHC avanzado 92-110 semanas		De Minicis <i>et al.</i> , 2013			
		McGlynn <i>et al.</i> , 2013			
					Heindryckx <i>et al.</i> , 2009

Tabla 1. (continuación).

Modelos animales		Tiempo de desarrollo tumoral	Ventajas	Desventajas	Referencias
Implantación	Ectópicos	5–20 semanas	Crecimiento tumoral rápido, fácil de realizar, altamente reproducible, bajo coste y baja mortalidad por procedimientos	Sin interacción directa con tejido hepático Las interacciones tumor-hospedador no se pueden evaluar Diferencias considerables entre líneas celulares, se necesitan probar múltiples líneas celulares Débilmente extrapolables a los humanos	Santos <i>et al.</i> , 2017 He <i>et al.</i> , 2015 Heindryckx <i>et al.</i> , 2009
	Ortotópicos	± 2 semanas	Rápido crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis Proporciona un modelo realista de la ubicación del tumor, daño hepático, variaciones bioquímicas y heterogeneidad de las células tumorales Permite la interacción tumor-hospedador, entre células tumorales y microambiente circundante. Permite la expresión de genes específicos y proteínas	Técnicamente complejo y relativamente caro Ratones inmunocomprometidos que pueden proporcionar un microambiente tumoral menos realista Diferencias considerables entre líneas celulares, se necesitan probar múltiples líneas celulares.	Santos <i>et al.</i> , 2017 He <i>et al.</i> , 2015 Heindryckx <i>et al.</i> , 2009 Bagi y Andersen, 2010 Jung, 2014 García <i>et al.</i> , 2018
	HFA	1-2 semanas	Efectos mínimos sobre el bienestar animal Reducción del número de ratones necesarios Recuperación de células tumorales no contaminadas por células hospedadoras Tiempo de evaluación más corto	No hay interacción directa con el tejido hepático Técnicamente complejo y costoso No es adecuado para estudiar interacciones complejas huésped-tumor La aparición de neovascularización alrededor de las fibras puede afectar a los resultados a largo plazo. No es posible evaluar datos sobre el tamaño del tumor	Santos <i>et al.</i> , 2017 Heindryckx <i>et al.</i> , 2009 Shnyder <i>et al.</i> , 2006
	Aloinjerto	-	Se requiere cuando se prueban medicamentos contra el cáncer que activan el sistema inmunitario (inmunoterapia)	La eficacia de los medicamentos contra el CHC humano estudiado es imprevista	Santos <i>et al.</i> , 2017

Modelos NAFLD/NASH-CHC

La NAFLD junto con su variante progresiva, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) son manifestaciones hepáticas del SM que pueden conducir a cirrosis y CHC (Tsuneyama *et al.*, 2017) (**Tabla 2**).

1. Ratones TSOD

Los tumores guanina sintetasa-positivos en ratones TSOD poseen características similares a las del CHC bien diferenciado en humanos, sin embargo, la secuencia de NAFLD/NASH a CHC no progresa a través de la cirrosis (Takahasi *et al.*, 2016).

2. Ratones GMS

Los ratones GMS son inducidos por la administración de glutamato monosódico y presentan características patológicas y un proceso de progresión de la enfermedad similares a los pacientes con NASH basados en el SM (Tsuneyama *et al.*, 2017).

3. Ratones DIAR-NSTZ

Es un modelo de cepa endogámica sin diabetes con estreptozotocina (STZ), toxina de las células β pancreáticas, que presenta un desarrollo muy rápido de CHC con una tasa de éxito del 100%. El proceso es muy similar a la progresión de CHC en humanos, sin embargo, no se observa fibrosis hepática ni tampoco explica el desarrollo "estable" de CHC que exhiben (Baba *et al.*, 2014).

4. Ratones STAM

Este modelo se realiza mediante la administración de una única inyección subcutánea de STZ y una dieta alta en grasas. Recapitula efectivamente la progresión de NASH a CHC humana (Shankaraiah *et al.*, 2019), sin embargo, no presenta resistencia a la insulina ni obesidad (Wu, 2016).

5. Dieta deficiente en metionina y colina (MCD)

Representa uno de los mejores modelos para el estudio de los elementos inflamatorios y fibróticos del espectro NAFLD/NASH gracias a su fácil establecimiento y disponibilidad (Jacobs *et al.*, 2016). Se basa en la deficiencia en metionina y colina que deriva en lesión hepática y potencia la transformación maligna (Zhong *et al.*, 2019; Wu, 2016).

6. Dieta alta en grasas (HFD)

El modelo HFD muestra características similares a NASH en humanos, pero el daño hepático no es grave (Zhong *et al.*, 2019).

7. Dieta deficiente en colina (CDD)

La CDD produce daño oxidativo del ADN e inestabilidad cromosómica a causa del agotamiento de los mecanismos antioxidantes del hígado (de Lima *et al.*, 2008).

8. Dieta definida por L-aminoácidos y deficiencia en colina (CDA)

La CDA desarrolla una lesión hepática que imita las características de NASH y conduce a CHC (Lau *et al.*, 2017). Sin embargo, el modelo es opuesto a la NASH humana típica (Zhong *et al.*, 2019).

9. Dieta occidental (WD)

La WD induce la histología de NASH, pero no progresa completamente a esteatohepatitis severa y fibrosis avanzada (Asgharpour *et al.*, 2016). Sin embargo, la combinación con CCl₄ desarrolla características histopatológicas de NASH con progresión rápida de fibrosis extensa y CHC (Tsuchida *et al.*, 2018).

Tabla 2: Resumen de las características de los modelos de NAFLD/NASH – CHC.

Modelos	Obesidad	Diabetes	Esteatosis	NASH	Fibrosis	Tumor hepático	Referencias
Ratones TSOD	+	+	+	+	+/-	+	Tsuneyama <i>et al.</i> , 2017 Lau <i>et al.</i> , 2017
Ratones DIAR-nSTZ	-	+	-	-	-	-	
Ratones STAM	+	+	+	+	+	+	
Ratones GMS	+	+	+	+	+/-	+	
MCD	+	+	+	+	+/-	-	Lau <i>et al.</i> , 2017
CCD	+	-	+	+	+	+	
HFD	+	+	+	+	+	-	Takahasi <i>et al.</i> , 2012 Henderson <i>et al.</i> , 2017 Lau <i>et al.</i> , 2017
CDA	+	-	+	+	+	+	Lau <i>et al.</i> , 2017
WS	+	+	+	+/-	-	-	Tsuchida <i>et al.</i> , 2018

Aplicaciones biomédicas de los modelos animales de CHC

Avances en la terapéutica

Los modelos animales de CHC también se emplean en la evaluación de la eficacia de diferentes líneas de tratamiento (**Fig. 1**) como, por ejemplo, los tratamientos sistémicos como sorafenib (Henderson *et al.*, 2017), regorafenib y lenvatinib, que han demostrado alterar significativamente la viabilidad de las líneas celulares Huh7 y HepG2 (Sasaki *et al.*, 2020).

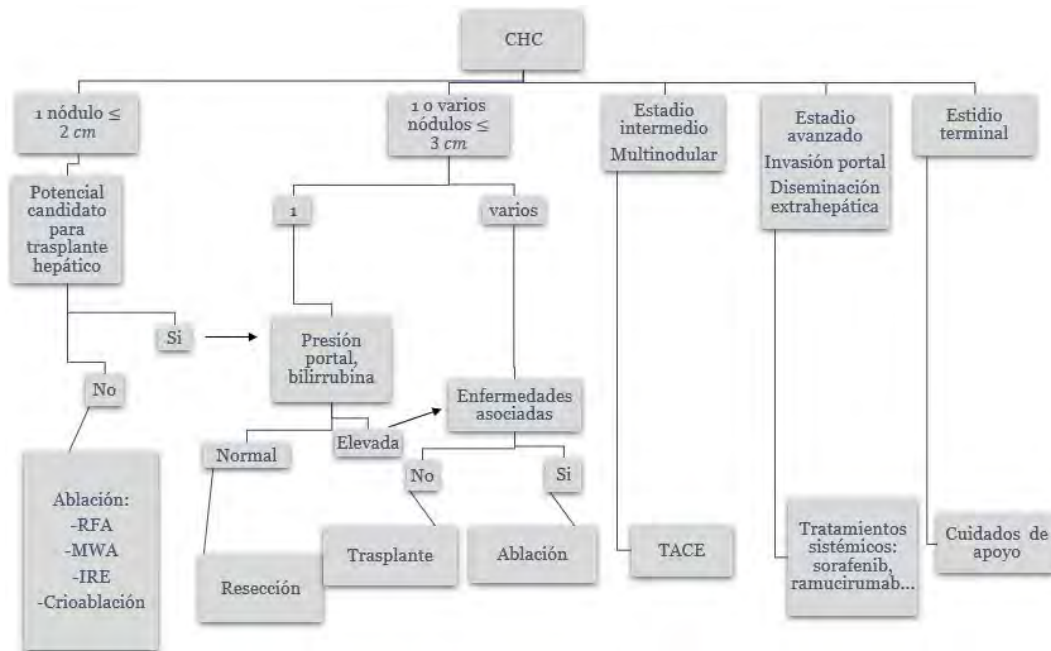


Figura 1. Diagrama de flujo de los actuales tratamientos del CHC.

Recientemente, se ha probado un tratamiento con nanopartículas de óxido de cerio (CeO_2NP) en ratas con CHC inducido por DEN que ha demostrado un aumento de la relación hígado/peso corporal, entre otros (Fernández-Varo *et al.*, 2020).

Actualmente, existe un interés creciente en el estudio de polifenoles debido a la resistencia del CHC a los medicamentos quimioterapéuticos actuales (García *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2018). En líneas celulares de CHC HepG2, HepB3 y PLC/PRF/5 la galangina ha demostrado suprimir el crecimiento, la proliferación y la viabilidad (Fang *et al.*, 2019). Por otro lado, en las células tumorales LM3, SMMC-7721 y HepG2 el tratamiento con quercetina ha demostrado promover la autofagia y revertir el daño generado por compuestos como AFB1 (Fernández-Palanca *et al.*, 2019). Asimismo, la curcumina ha demostrado inhibir la expresión inducida por DEN de HRAS oncogénico y hepatocarcinogénesis (Shankaraiah *et al.*, 2019) al igual que la melatonina que ha demostrado efectos antiproliferativos en las líneas celulares HepG2 y Hep3B (Mi y Kuang, 2020).

Nuevas líneas de investigación

El diagnóstico del CHC depende principalmente de la biopsia invasiva, de pruebas de α -fetoproteína (Stefaniuk *et al.*, 2010) cuya sensibilidad y especificidad es subóptima (Beyoğlu y Idle, 2020) y de los métodos de imagen que detectan el CHC en etapas medias y tardías debido a su naturaleza asintomática. Por ello, se requiere de mejores biomarcadores que mejoren el diagnóstico y tratamiento (Guo *et al.*, 2018).

La metabolómica proporciona biomarcadores potenciales para el diagnóstico y monitorización de enfermedades complejas (Guo *et al.*, 2018), patogénesis y tratamientos personalizados (Gong *et al.*, 2017). Ejemplo de ello son los niveles elevados de isoleucina, leucina y fenilalanina y niveles disminuidos de glucosa observados en las células HepG2 en comparación con hepatocitos normales y la eliminación de la espermina oxidasa (SMOX) en las líneas celulares Hep3B y SK-HEP-1 que ha demostrado suprimir la proliferación y aumentar la apoptosis (Hu *et al.*, 2018).

Conclusiones

Dadas las elevadas tasas de incidencia y mortalidad del CHC, y su refractariedad a la mayoría de los tratamientos actuales, los modelos animales de CHC son vitales para comprender los mecanismos de la enfermedad y poder desarrollar un tratamiento efectivo. Los modelos de xenoinjerto son los modelos más empleados en el estudio del CHC junto con los modelos de DEN y CCl₄. Además, dado que el CHC ocurre comúnmente en un contexto de patología crónica hepática, los modelos animales de NAFLD/NASH que reproducen la progresión de la enfermedad hepática crónica a CHC son imprescindibles.

Bibliografía

- Asgharpour, A., Cazanave, S. C., Pacana, T., Seneshaw, M., Vincent, R., Banini, B. A., Kumar, D. P., Daita, K., Min, H. K., Mirshahi, F., *et al.* 2016. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *Journal of Hepatology*, 65:579-588
- Baba, H., Tsuneyama, K., Nishida, T., Hatta, H., Nakajima, T., Nomoto, K., Hayashi, S., Miwa, S., Nakanishi, Y., Hokao, R. e Imura, J. 2014. Neonatal streptozotocin treatment causes type 1 diabetes and subsequent hepatocellular carcinoma in DIAR mice fed a normal diet. *Hepatology International*, 8:415-424
- Beyoğlu, D. e Idle, J. R. 2020. Metabolomic and lipidomic biomarkers for premalignant liver disease diagnosis and therapy. *Metabolites*, 10:50
- Caviglia J.M. y Schwabe R.F. 2015. Mouse Models of Liver Cancer, en Eferl R. y Casanova E. (eds.) *Mouse Models of Cancer*. New York: Humana Press, pp. 165-183.

- De Minicis, S., Kisseleva, T., Francis, H., Baroni, G. S., Benedetti, A., Brenner, D., Alvaro, D., Alpini, G. y Marzoni, M. 2013. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 45:450-459
- Fang, D., Xiong, Z., Xu, J., Yin, J. y Luo, R. 2019. Chemopreventive mechanisms of galangin against hepatocellular carcinoma: a review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109:2054-2061
- Fernández-Palanca, P., Fondevila, F., Méndez-Blanco, C., Tuñón, M. J., González-Gallego, J. y Mauriz, J. L. 2019. Antitumor effects of quercetin in hepatocarcinoma in vitro and in vivo models: a systematic review. *Nutrients*, 11:2875
- Fernández-Varo, G., Perramón, M., Carvajal, S., Oró, D., Casals, E., Boix, L., Oller, L., Macías-Muñoz, L., Marfá, S., Casals, *et al.* 2020. Bespoke nanoceria: a new effective treatment in experimental hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 72:1267-1282
- García, E. R., Gutierrez, E. A., Melo, F. C. S. A. D., Novaes, R. D. y Gonçalves, R.V. 2018. Flavonoids effects on hepatocellular carcinoma in murine models: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 28:6328970
- Gong, Z. G., Zhao, W., Zhang, J., Wu, X., Hu, J., Yin, G. C. y Xu, Y. J. 2017. Metabolomics and eicosanoid analysis identified serum biomarkers for distinguishing hepatocellular carcinoma from hepatitis B virus- related cirrhosis. *Oncotarget*, 8:63890-63900
- Guo, W., Tan, H. Y., Wang, N., Wang, X. y Feng, Y. 2018. Deciphering hepatocellular carcinoma through metabolomics: from biomarker discovery to therapy evaluation. *Cancer Management and Research*, 10:715-734
- He, L., Tian, D. A., Li, P. Y. y He, X. X. 2015. Mouse models of liver cancer: progress and recommendations. *Oncotarget*, 6:23306-23322
- Heindryckx, F., Colle, I. y Van Vlierberghe, H. 2009. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *International Journal of Experimental Pathology*, 90:367-386
- Henderson, J. M., Zhang, H. E., Polak, N. y Gorrell, M. D. 2017. Hepatocellular carcinoma: mouse models and the potential roles of proteases. *Cancer Letters*, 387:106-113
- Hu, T., Sun, D., Zhang, J., Xue, R., Janssen, H. L., Tang, W. y Dong, L. 2018. Spermine oxidase is upregulated and promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research*, 48:967-977
- Jacobs, A., Warda, A. S., Verbeek, J., Cassiman, D. y Spincemaille, P. 2016. An overview of mouse models of nonalcoholic steatohepatitis: from past to present. *Current Protocols in Mouse Biology*, 6:185- 200

- Jung, J. 2014. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicological Research*, 30:1-5
- Lau, J. K. C., Zhang, X. y Yu, J. 2017. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology*, 241:36-44
- de Lima, V. M., Oliveira, C. P., Alves, V. A., Chammass, M. C., Oliveira, E. P., Stefano, J. T., de Mello, E. S., Cerri, G. G., Carrilho, F. J. y Caldwell, S. H. 2008. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 49:1055-1061
- Mazzanti, R., Gramantieri, L. y Bolondi, L. 2008. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 29:130-143
- McGlynn, K. A., Hunter, K., LeVoyer, T., Roush, J., Wise, P., Michielli, R. A., Shen, F. M., Evans, A. A., London, W. T. y Buetow, K. H. 2003. Susceptibility to aflatoxin B1-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Research*, 63:4594-4601
- Newell, P., Villanueva, A., Friedman, S. L., Koike, K. y Llovet, J. M. 2008. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 48:858-879
- Rao, Q., You, A., Guo, Z., Zuo, B., Gao, X., Zhang, T., Du, Z., Wu, C. y Yin, H. F. 2016. Intrahepatic tissue implantation represents a favorable approach for establishing orthotopic transplantation hepatocellular carcinoma mouse models. *PLoS ONE*, 11:1-12
- Santos, N. P., Colaço, A. A. y Oliveira, P. A. 2017. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: a review. *Tumor Biology*, 39: 1-20
- Sasaki, R., Kanda, T., Fujisawa, M., Matsumoto, N., Masuzaki, R., Ogawa, M., Matsuoka, S., Kuroda, K. y Moriyama, M. 2020. Different mechanisms of action of regorafenib and lenvatinib on toll-like receptor- signaling pathways in human hepatoma cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 21:3349
- Shankaraiah, R. C., Gramantieri, L., Fornari, F., Sabbioni, S., Callegari, E. y Negrini, M. 2019. Animal models of hepatocellular carcinoma prevention. *Cancers*, 11:1-15
- Stefaniuk, P., Cianciara, J. y Wiercinska-Drapalo, A. 2010. Present and future possibilities for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 16:418-424
- Takahashi, T., Nishida, T., Baba, H., Hatta, H., Imura, J., Sutoh, M., Toyohara, S., Hokao, R., Watanabe, S., Ogawa, *et al.* 2016. Histopathological characteristics of glutamine synthetase-positive hepatic tumor lesions in a mouse model of spontaneous metabolic syndrome (TSOD mouse). *Molecular and Clinical Oncology*, 5:267-270
- Tsuchida, T., Lee, Y. A., Fujiwara, N., Ybanez, M., Allen, B., Martins, S., Fiel, M. I., Goossens, N., Chou, H. I., Hoshida, Y. y Friedman, S. L. 2018. A simple diet-and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *Journal of Hepatology*, 69:385-395



- Tsuneyama, K., Nishitsuji, K., Matsumoto, M., Kobayashi, T., Morimoto, Y., Tsunematsu, T. y Ogawa, H. 2017. Animal models for analyzing metabolic syndrome-associated liver diseases. *Pathology International*, 67:539-546
- Wu, J. 2016. Utilization of animal models to investigate nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7:42762-42776
- Zhang, H. E., Henderson, J. M. y Gorrell, M. D. 2019. Animal models for hepatocellular carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Basis of Disease*, 1865:993-1002
- Zhong, F., Zhou, X., Xu, J. y Gao, L. 2020. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestion*, 101:522-535