



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Modificaciones de la Regulación Epigenética por
el Hepatoprotector IFC-305 en Cirrosis**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Jesús Rafael Rodríguez Aguilera



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Estela Sánchez Quintanar
VOCAL: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre
SECRETARIO: Profesora: Victoria Eugenia Chagoza Hazas
1er. SUPLENTE: Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova
2° SUPLENTE: Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ
(nombre y firma)



SUPERVISOR TÉCNICO: DR. CARLOS ALBERTO GUERRERO HERNÁNDEZ
(nombre y firma)



SUSTENTANTE: JESÚS RAFAEL RODRÍGUEZ AGUILERA
(nombre (s) y firma (s))



La Misericordia del Señor es eterna

Salmo 117

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 305 sur del Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Dirección de la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas con el financiamiento de los proyectos auspiciados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA-UNAM a través del donativo IN225909 y del apoyo de la Red Farmed® 2010-2011

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque que sin El no puedo hacer nada.

A mi papá Jesús Rodríguez Flores, a mi mamá María Elena Aguilera Mendieta †, a mis hermanas María Elena y María de Lourdes y a mi cuñado Rafael Medrano Huerta por todo el amor, consejos y apoyo.

A mis amigos que siempre están presentes.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme adoptado, por sus profesores e investigadores de más alto nivel, que me transmitieron sus conocimientos y experiencia para mi formación.

A la QFB Norma Silvia Sánchez Sánchez por introducirme al mundo de la investigación.

A la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas por permitirme formar parte de su equipo de investigación.

Al Dr. Carlos Alberto Guerrero Hernández por la dirección teórica y práctica a lo largo de ésta investigación.

A la QFB Mónica Liliana Guzmán López por su colaboración durante éste proyecto.

A la M. en C. Lidia Martínez Pérez, a la M. en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca y a la Biol. Nuria Guerrero Celis por sus asesorías en los *Wester blots* realizados en este proyecto.

Al Dr. Antonio Peña Díaz por facilitar el termociclador para las PCRs realizadas en éste proyecto.

A la M. en C. Lucía Yáñez Maldonado por ser la primera persona que me permitió colaborar en sus experimentos cuando llegué al laboratorio.

A la Biol. Susana Vidrio Gómez y a la Dra. Gabriela Velasco Loyden por su apoyo en el laboratorio.

A la Dra. Graciela Guadalupe Pérez Villaseñor, quién siempre recalcó la importancia de las buenas prácticas de laboratorio.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, a la Dra. Perla Carolina Castañeda López, a la QFB Cristina Aranda Fraustro y a la Lic. María Elena Rodríguez Aguilera por sus valiosos comentarios y observaciones al revisar el trabajo escrito.

A los miembros del Jurado: Dra. Estela Sánchez Quintanar, Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre y Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes por revisar éste manuscrito.

A mis sobrinos Lulú, Pedro y Sebastián como aliciente en sus estudios.

ÍNDICE

ÍNDICE	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
LISTA DE GRÁFICOS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	15
I.1. El hígado.....	15
I.2. La cirrosis	18
I.2.1. La proteína colágena I se sobreexpresa en cirrosis.....	22
I.3. Epigenética y cirrosis.....	25
I.3.1. La cromatina	26
I.3.2. Acetilación de histonas.....	28
I.3.3. Metilación de histonas.....	29
I.3.4. Metilación del ADN y su papel en el silenciamiento génico.....	31
I.4. Receptores nucleares.....	33
I.4.1. Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs).....	34
1. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	39
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
3. HIPÓTESIS	48
4. OBJETIVO GENERAL.....	48
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	49
6. MÉTODOS	50
6.1. Sustancias químicas.....	50
6.2. Tratamiento de animales e inducción de cirrosis con CCl ₄	51
6.3. Extracción de ADN genómico	52
6.4. Evaluación de la metilación global del ADN genómico	53
6.4.1. Evaluación cualitativa de la metilación de ADN genómico con enzimas de restricción	53

6.4.2. Evaluación cuantitativa de la metilación global de ADN genómico con el <i>Kit Imprint Methylated DNA Quantification</i>	54
6.5. Estudio de las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor de <i>Pparg</i>	56
6.6. Determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado	58
6.7. Análisis estadístico	63
7. RESULTADOS	64
7.1. Obtención de Material Biológico	64
7.2. Extracción de ADN genómico	67
7.3. Evaluación de la metilación global del ADN genómico	68
7.3.1. Evaluación cualitativa de la metilación del ADN genómico con enzimas de restricción	68
7.3.2. Evaluación cuantitativa de la metilación global del ADN genómico con el <i>Kit Imprint Methylated DNA Quantification</i>	72
7.4. Estudio de las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor de <i>Pparg</i>	74
7.5. Determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado	78
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	83
9. CONCLUSIONES	94
10. PERSPECTIVAS	95
11. REFERENCIAS	96
APENDICE 1: Preparación de soluciones	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las diversas partes que integran el aparato digestivo
Figura 2	Representación de las poblaciones celulares hepáticas en el hígado sano
Figura 3	Representación gráfica de las tres concepciones de la unidad funcional del hígado
Figura 4	Representación del hígado cirrótico
Figura 5	Patogenia biomédica y celular de la lesión hepática que es consecuencia del consumo prolongado de etanol
Figura 6	Estructura de la Colágena
Figura 7	Esquema donde se representan los distintos niveles de estructuración de la cromatina
Figura 8	Residuos de aminoácidos de las histonas H3 y H4 que son sujetos a modificaciones covalentes
Figura 9	Ruta metabólica de la metionina en el hígado
Figura 10	Representación esquemática de un receptor nuclear típico
Figura 11	Mecanismo de acción de PPARs
Figura 12	Integración metabólica de PPARs
Figura 13	Tejido hepático de rata fijado en paraformaldehído, teñido con tricrómica de Masson
Figura 14	Modificaciones en el perfil expresión genética global en hígados cirróticos así como el efecto del IFC-305 en este modelo
Figura 15	Efecto del IFC-305 sobre la expresión de <i>Pparg</i> y <i>Col1a1</i> en hígados cirróticos
Figura 16	Efecto del IFC-305 sobre células estelares hepáticas
Figura 17	Grupos experimentales para evaluar el efecto del IFC-305 en el modelo de cirrosis inducido por CCl ₄ .
Figura 18	Integridad del ADN genómico
Figura 19	ADNs genómicos del modelo de Cirrosis inducida con CCl ₄ digeridos con las enzimas <i>MspI</i> y <i>HpaII</i>
Figura 20	Representación esquemática de ADNs genómicos del modelo de Cirrosis inducida con CCl ₄ digeridos con las enzimas <i>MspI</i> y <i>HpaII</i>
Figura 21	Integridad de las muestras de ADN genómico utilizadas para el ensayo de cuantificación de la metilación global.
Figura 22	Estructura del gen <i>Pparg</i>
Figura 23	Fragmentos de cromatina obtenidos después de sonicar
Figura 24	Modificaciones post-traduccionales de histonas sobre el promotor de <i>Pparg</i> en el modelo de cirrosis inducida con CCl ₄
Figura 25	Detección de las proteínas totales
Figura 26	Expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico en el hígado cirrótico
Figura 27	Dogma central de la Biología Molecular
Figura 28	Modificaciones epigenéticas por el IFC-305 en el hígado cirrótico y su efecto a lo largo del proceso genético básico

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Distintas capacidades funcionales de los hepatocitos, según su distribución en el acino hepático
Tabla 2	Causas de la cirrosis
Tabla 3	Parámetros serológicos de la función hepática
Tabla 4	Modificaciones en el perfil expresión genética global en hígados cirróticos así como el efecto del IFC-305 en este modelo
Tabla 5	Enzimas de resticción utilizadas en la determinación cualitativa de la metilación global de ADN genómico
Tabla 6	Anticuerpos utilizados en el ensayo CHIP
Tabla 7	Oligonucleótidos utilizados para la PCR de la zona P del promotor de <i>Pparg</i>
Tabla 8	Curva de proteína para el ensayo estándar en microplaca
Tabla 9	Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado
Tabla 10	Anticuerpos secundarios utilizados para la determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado
Tabla 11	Características fenotípicas del hígado de rata de los diferentes estadios del modelo de cirrosis inducida con CCl_4
Tabla 12	Evaluación de la metilación de ADNg con las endonucleasas <i>MspI</i> y <i>HpaII</i>

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Tamaño del hígado de las ratas con los diferentes tratamientos del modelo de cirrosis inducida con CCl_4
Gráfico 2	Pureza del DNA genómico
Gráfico 3	Concentración del DNA genómico
Gráfico 4	Curva estándar de ADN metilado usando el <i>Kit Imprint Methylated DNA Quantification</i>
Gráfico 5	Cuantificación de la metilación global de ADN genómico en el modelo de cirrosis inducida con CCl_4
Gráfico 6	Curva estándar de proteína
Gráfico 7	Efecto del IFC-305 sobre la expresión de la proteína Colágena I en el hígado cirrótico
Gráfico 8	Efecto del IFC-305 sobre la expresión de la proteína Desmina en el hígado cirrótico
Gráfico 9	Efecto del IFC-305 sobre la expresión de la proteína PPAR- γ en el hígado cirrótico

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
15d-PGJ2	15-desoxi-prostaglandina J2
5hmC	5-hidroximetilcitosina
6-ARP	6-aminoribofuranosil purina o adenosina
ADH	Alcohol deshidrogenasa

Continúa lista de abreviaturas

Continúa lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARP	Gen de la proteína ácida ribosomal
AST	Aspartato aminotransferasa
BTEB	Elemento de transcripción básico de proteína de unión
CCl ₄ (to)	Rata tratada con CCl ₄ vía IP durante 10 semanas, rata cirrótica
CHC	Cáncer hepatocelular
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
<i>Col1a1</i>	Gen de la cadena pro-alpha 1 de la Colágena tipo I
CTE	Extensión carboxilo terminal
DBD	Dominio central de unión a DNA
DEM	Desviación estándar de la media
DNMT	ADN metiltransferasa
ECM	Matriz extracelular
EZH2	Homólogo 2 del potenciador zeste
Gly	Glicina
H1	Histona H1
H2A	Histona H2A
H2B	Histona H2B
H3	Histona H3
H3K27	Lisina 27 de la histona H3
H3K4	Lisina 4 de la histona H3
H3K9	Lisina 9 de la histona H3
H4	Histona H4
H4K20	Lisina 20 de la histona H4
HAT	Acetiltransferasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HDM	Desmetilasa de histonas
HMGs	Proteínas de alta movilidad electroforética
HMT	Metil transferasa de histonas
HP1	Proteína de heterocromatina 1
HRP	Peroxidasa de rábano
HSC	Célula estelar hepática
Hyp	Hidroxiprolina

Continúa lista de abreviaturas

Continúa lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
IFC-305	Aspartil adenosina
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IP	Intraperitoneal
I κ B α	Inhibidor de NF κ B
JARID1	Dominio 1 rico en AT de jumonji
JNK	Cinasa N-terminal <i>c-jun</i>
K	Lisina
kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
KFL	Factor de transcripción tipo kruppel
LBD	Dominio de unión a ligando
LSD1	Desmetilasa 1 específica de lisina
Me	Metilación
Me1	Monometilación
Me2	Dimetilación
Me3	Trimetilación
MEOS	Sistema microsómico oxidante del etanol
miARN	Micro ARN
min	Minuto
mL	Mililitro
MLL	Leucemia de linaje mixto
n	Número de muestras ó repeticiones de ensayo
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NF κ B	Factor nuclear κ B
ng	Nanogramo
NHR	Receptor nuclear hormonal
NL	Hígado sano (Control)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PPAR	Receptor Activado por Proliferadores Peroxisomales
<i>Pparg</i>	Gen del Receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales
PPAR- α	Receptor alfa activado por proliferadores peroxisomales
PPAR- β/δ	Receptor beta/delta activado por proliferadores peroxisomales
PPAR- γ	Receptor gamma activado por proliferadores peroxisomales
PPRE	Elemento respuesta a PPARs
Pro	Prolina

Continúa lista de abreviaturas

Continúa lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
RE	Elementos de respuesta
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor de retinoides X
S	Serina
SAH	S-adenosilhomocisteina
SAM	S-adenosilmetionina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
to+10IFC	Rata cirrótica trata con IFC-305 durante 10 semanas
to+10ss	Rata cirrótica trata con solución salina IP durante 10 semanas
to+5IFC	Rata cirrótica trata con IFC-305 IP durante 5 semanas
to+5ss	Rata cirrótica trata con solución salina IP durante 5 semanas
U	Unidad internacional
α -SMA	Actina alpha de músculo liso

RESUMEN

La cirrosis es un proceso muy complejo que involucra una modificación dinámica del fenotipo de las células hepáticas asociado a cambios en la expresión de genes; las características patológicas son la generación de un grado de fibrosis que produce una distorsión estructural y la formación de nódulos de regeneración. Ensayos de transcriptoma realizados en nuestro laboratorio mostraron que 414 genes se encuentran desregulados en muestras cirróticas y tienden a normalizarse con el tratamiento con un compuesto derivado de la adenosina (IFC-305). En dicho estudio se observó que el IFC-305 modula la expresión de *Pparg* y *Col1a1*, dos genes involucrados en la cirrosis (Pérez-Carreón, et al., 2010). Además es importante mencionar que la expresión de Colágena I, proteína relacionada con el proceso fibrótico, es regulada por la proteína PPAR- γ (Yavrom, et al., 2005). Por lo anterior, decidimos investigar el efecto epigenético del IFC-305 sobre el gen *Pparg* como posible mecanismo regulador de los niveles de expresión de la proteína Colagena I en un modelo de cirrosis en rata. Los animales fueron tratados con IFC-305 o solución salina por 5 o 10 semanas después de la inducción de cirrosis (tratamiento con tetracloruro de carbono por 10 semanas). Se realizaron experimentos para evaluar la metilación global de ADN con enzimas de restricción metilosensibles, así como ensayos tipo ELISA con anti-5metilcitosina; para estudiar las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del gen *Pparg* se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) y para estudiar los niveles de expresión de la proteína PPAR- γ y las proteínas de matriz extracelular Colagena y Desmina se llevaron a cabo experimentos de *Western blot*.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento de ratas cirróticas con IFC-305 induce: 1) Un incremento en la metilación global de ADN genómico en ratas tratadas con IFC-305 durante 5 o 10 semanas; 2) El promotor del gen *Pparg* adquiere marcas de activación con el tratamiento a ratas cirróticas con IFC-305 por 5 semanas, mientras que al tratarlas por 10 semanas se ve un enriquecimiento de marcas de represión y 3) La proteína PPAR- γ incrementa y la proteínas colágena I disminuye con la administración de IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis y con el tratamiento durante 10 semanas se presenta una disminución de la proteína PPAR- γ y el nivel de la proteína colágena I es muy similar al del tejido control.

Por lo anterior, podemos decir que estos resultados representan el inicio de la comprensión del mecanismo de acción a nivel epigenético del IFC-305 a través del cual el fármaco disminuye los niveles de expresión de la principal proteína profibrogénica, Colágena I, observándose una correlación entre la sobreexpresión de la proteína PPAR- γ y la disminución de la proteína Colágena I. Además se observó un efecto del IFC-305 sobre las modificaciones post-traduccionales de histonas presentes en el promotor del gen *Pparg* mismos que corresponden con sus niveles de expresión de ARNm y de proteína durante los tratamientos de reversión de cirrosis con IFC-305.

INTRODUCCIÓN

I.1. El hígado

El hígado es un órgano enorme, en el adulto pesa en promedio 1.5kg (Ham and Cormack 1985); representa de 2 a 5 % del peso corporal del adulto y 5% en el neonato (Drucker 2005). Su color es pardo rojizo y está cubierto con una fina capa de tejido conectivo resistente que suele ser llamada cápsula de Glisson. La mayor parte del hígado está en la mitad derecha del cuerpo con superficie superior convexa adaptada íntimamente a la concavidad de la hemicúpula diafragmática derecha (Figura 1). Tiene dos lóbulos principales, de los cuales, el derecho es mucho mayor que el izquierdo. Posee una cisura transversal profunda y corta llamada surco transversal o hilio hepático (Ham y Cormack, 1985).

El hígado a semejanza de otras glándulas, tiene parénquima y estroma. En general, el primero comprende células epiteliales de origen endodérmico llamadas *hepatocitos*. El segundo deriva del mesodermo y consiste en tejido conectivo ordinario.

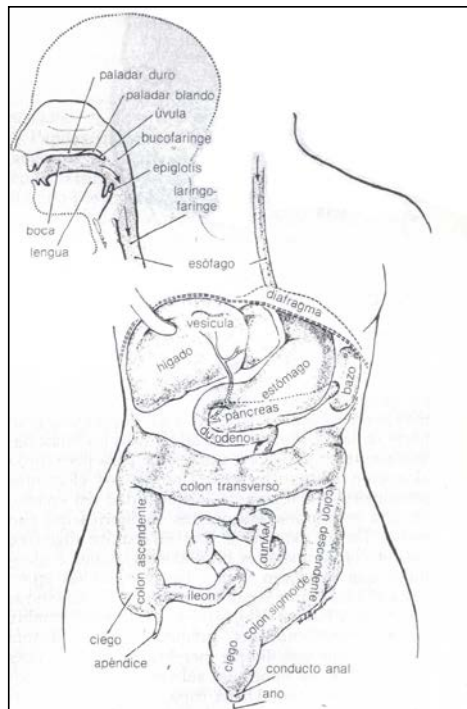


Fig. 1. Esquema de las diversas partes que integran el aparato digestivo. (Tomado de Ham y Cormack, 1985)

Este órgano se compone de distintos tipos de células (Figura 2), entre las cuales destacan los hepatocitos, células endoteliales, células estelares (HSC), células de Kupffer y linfocitos residentes, dispuestas en un complejo esqueleto, con diversas capas estructurales y metabólicas, responsables de más de 5000 diferentes funciones (Drucker 2005).

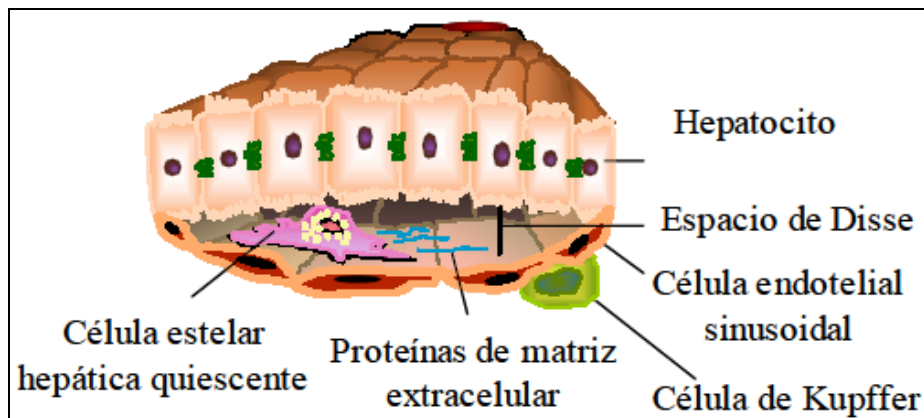


Fig. 2. Representación de las poblaciones celulares hepáticas en el hígado sano.
(Tomado de Chagoya-de-Sánchez, et al., 2005)

En el desarrollo embrionario el hígado se produce en estrecha relación con la pared del tubo digestivo. El hepatocito, que deriva del epitelio intestinal primitivo, se dispone en columnas o tabernáculos que se ramifican y anastomosan entre sí, interconectándose a través de sinusoides o capilares. Los sinusoides se constituyen por una delgada y continua capa de células endoteliales aplanadas, por células macrofágicas de Kupffer, linfocitos y células perisinusoidales que las separan de la superficie del hepatocito. Los sinusoides carecen de membrana basal verdadera, esto les facilita la función de intercambio de metabolitos entre la sangre y la célula hepática a través del espacio de Disse, que separa la pared endotelial y el polo sinusoidal del hepatocito. El espacio de Disse no es un espacio vacío, entre sus componentes tiene fibras de reticulina, nervios, células estelares. Asimismo, contiene colágenas tipo I, III, IV, VI y VIII, así como fibronectina, pequeñas cantidades de colágena V, laminina, tenacina y proteoglicanos. Estos componentes de la matriz extracelular son esenciales para mantener el fenotipo y funciones específicas de los hepatocitos, así como de las células que cubren los

sinusoides, además de modular, de acuerdo con su fisiología, distintos factores de crecimiento, la diferenciación celular y el almacenamiento de citocinas esenciales en la comunicación intercelular (Drucker, 2005).

La unidad funcional del hígado es el acino hepático (Drucker, 2005) (Figura 3). Está constituido por pequeños segmentos de dos lobulillos clásicos delimitados y dos venas hepáticas terminales (venas centrales del lobulillo clásico). Su forma es oval o romboidal y se encuentra centrado por un eje terminal portal que contiene ramas de los diferentes componentes del espacio porta. Dentro de cada acino, las células se colocan concéntricamente alrededor de su eje conectivo, de forma que las próximas a éste (zona I) recibirán la sangre con mayor concentración de oxígeno y de nutrientes y, por el contrario, las más lejanas (las próximas a las venas terminales) (zona III) recibirán sangre de menor calidad. Entre estas dos zonas se encuentra una formación aproximadamente circular en corte transversal (zona II), por la que circula sangre de calidad intermedia (Herrerías, 1996).

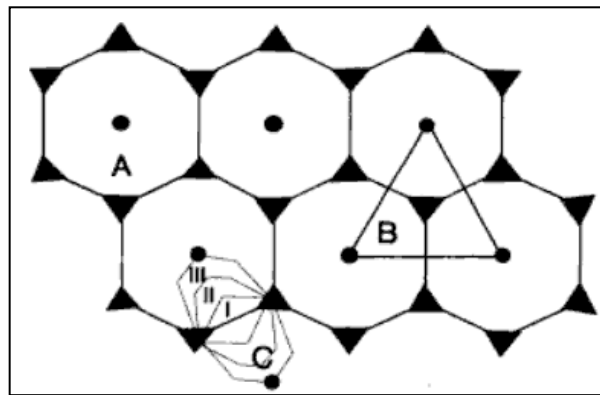


Fig. 3. Representación gráfica de las tres concepciones de la unidad funcional del hígado. A: Lobulillo clásico; B: Lobulillo portal; C: Acino hepático. Esta forma de concebir al hígado y las diferencias en el gradiente de actividad metabólica (Tabla 1) en relación con la irrigación, ayudan a explicar el proceso de regeneración y de desarrollo de cirrosis, y esclarecer diferentes aspectos histológicos de la distribución de la bilis en diversas afecciones hepáticas. (Tomado de Herrerías, 1996).

A lo largo del acino hepático, los hepatocitos presentan diferencias morfológicas y bioquímicas, que se reflejan de manera directa en su función especializada (Tabla 1)

Tabla 1. Distintas capacidades funcionales de los hepatocitos, según su distribución en el acino hepático. (Tomada de Drucker, 2005)

Zona I	Zona II	Zona III
Procesos Oxidativos Gluconeogénesis β -oxidación de ácidos grasos Síntesis de colesterol Secreción de ácidos biliares <ul style="list-style-type: none"> • Mitocondrias • Lisosomas • Aparato de Golgi 		
		Glucólisis Lipogénesis Destoxificación Menor cantidad de oxígeno Núcleos más grandes Retículo Endoplásmico

El hígado importa una gran cantidad de endobióticos y xenobióticos. Realiza funciones de biotransformación, convierte sustancias hidrofóbicas en productos hidrosolubles que pueden excretarse en la bilis o en la orina. Dispone además de múltiples y complejos sistemas enzimáticos que transforman los xenobióticos en metabolitos, determinando su inactivación o mayor actividad biológica. Asimismo, el hígado recibe un aporte intermitente de nutrientes proveniente del aparato digestivo, se encarga de captar aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas, para cumplir con las funciones del metabolismo intermediario. Es responsable de la síntesis, degradación y almacenamiento de hidratos de carbono y lípidos. Además, secreta la mayor parte de las proteínas del plasma, como por ejemplo la albúmina (Drucker, 2005).

I.2. La cirrosis

Históricamente, las alteraciones estructurales causadas por esta enfermedad fueron detectadas desde 1761 por el patólogo Gianbattista Morgagni que en un reporte de 500 autopsias describió alteraciones morfológicas del hígado similares

a las que actualmente se reportan en hígados cirróticos. En 1826 Laennec al describir esta patología la llama por primera vez *cirrosis*, por el aspecto café naranja que adquiere el hígado y que en griego se llama *kirrhos* y en su monografía clásica comenta: “El hígado reduce una tercera parte de su tamaño ordinario... parece estar compuesto por multitud de pequeños gránulos redondos u ovoides... estos granos son fáciles de separar uno de otro, no mostrando entre ellos algún lugar en el que se pueda distinguir algún remanente de tejido hepático propiamente dicho... el resto da al tacto una sensación de una pieza de cuero suave” (Chagoya-de-Sánchez, et al., 2005).

Los primeros intentos para entender esta patología datan de 1930 en que Roessle la sugiere como un proceso degenerativo, hay cicatrización de una lesión y proliferación del tejido (Chagoya-de-Sánchez, et al., 2005).

La cirrosis es un trastorno hepatocelular que se define por sus características histopatológicas y tiene muchas manifestaciones clínicas y complicaciones, algunas de las cuales son potencialmente fatales. En el pasado se consideraba que la cirrosis nunca era reversible, sin embargo, es evidente que cuando se elimina la agresión fundamental que la ha producido se puede resolver la fibrosis. Esto se ha observado, por ejemplo, en algunos enfermos con hepatopatía alcohólica que han suspendido el consumo de alcohol. Los pacientes se clasifican según la causa de su hepatopatía (Tabla 2); los grupos generales de esta división son: cirrosis alcohólica, cirrosis debida a hepatitis vírica o crónica, cirrosis biliar y otras causas menos comunes de cirrosis como cirrosis cardiaca, cirrosis criptógena y otras causas (Fauci, et al., 2009).

Tabla 2. Causas de la cirrosis. (Tomada de Fauci, et al., 2009).

Alcoholismo	<p>Cirrosis biliar</p> <p>Cirrosis biliar primaria</p> <p>Colangitis esclerosante primaria</p> <p>Colangiopatía autoinmunitaria</p>
<p>Hepatitis vírica crónica</p> <p>Hepatitis B</p> <p>Hepatitis C</p>	Cirrosis cardiaca
Hepatitis autoinmunitaria	<p>Hepatopatía metabólica hereditaria</p> <p>Hemocromatosis</p> <p>Enfermedad de Wilson</p> <p>Deficiencia de antitripsina α_1</p> <p>Fibrosis quística</p>
Esteatohepatitis no alcohólica	Cirrosis criptógena

Independientemente de la etiología de la cirrosis, las características patológicas consisten en la aparición de fibrosis de un grado tal que se produce una distorsión estructural y se forman nódulos de regeneración. Esto da por resultado una disminución de la masa hepatocelular y por tanto en su función, así como alteraciones en el flujo sanguíneo (Fauci, et al., 2009).

La fibrosis hepática es una exacerbación de un proceso genético de lesión-cicatrización en el hígado que está definido por un exceso de síntesis y deposición de componentes de matriz extracelular (ECM) (Figura 4), entre los que predomina la colágena tipo I. La acumulación de ECM en el espacio subendotelial de Disse puede interrumpir la microcirculación hepática acentuando el daño y la muerte de células parenquimales (Thompson, et al., 2011). La estimulación de la fibrosis ocurre cuando se activan las células estelares hepáticas lo cual lleva a la formación de mayores cantidades de colágena y otros componentes de la matriz extracelular (Figura 5) (Fauci, et al., 2009).

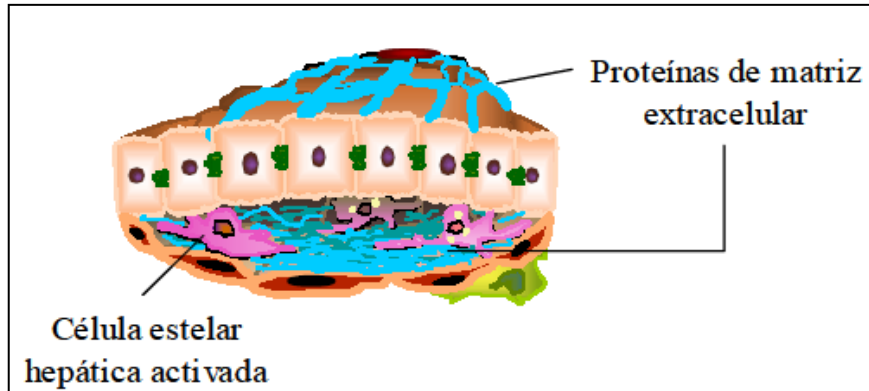


Fig. 4. Representación del hígado cirrótico. Se observa la abundancia de componentes de matriz extracelular en el espacio de Disse. (Tomado de Chagoya-de-Sánchez, et al., 2005)

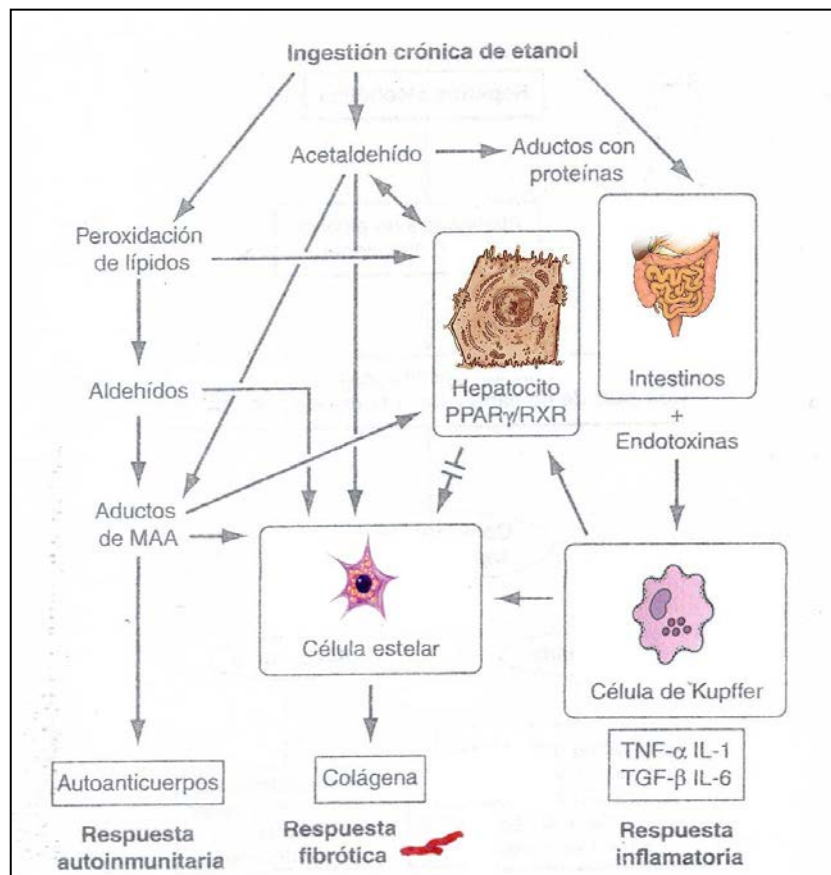


Fig. 5. Patogénesis biomédica y celular de la lesión hepática que es consecuencia del consumo prolongado de etanol. MMA, malondialdehído-acetaldehído; TNF, factor de necrosis tumoral; TGF, factor crecimiento transformante; IL, interleucina; PPAR Receptor activado por proliferadores peroxisomales; RXR, receptores X de ácido retinóico. (Modificado de Fauci, et al., 2009).

Las manifestaciones clínicas de la cirrosis son resultado de cambios patológicos y reflejan la gravedad de la hepatopatía. Los pacientes con cirrosis tienen grados variables de compensación de la función hepática y es necesario distinguir entre los que presentan una cirrosis estable y compensada y los que tienen una cirrosis descompensada. Los enfermos que han desarrollado complicaciones de su hepatopatía y que se han descompensado deben ser considerados para un trasplante hepático (Fauci, et al., 2009).

I.2.1. La proteína colágena I se sobreexpresa en cirrosis

Las HSCs son las principales productoras de ECM en el hígado fibrótico. Cuando el tejido se encuentra sano, dichas células son quiescentes y almacenan ácido retinóico (vitamina A), sin embargo, después de un estímulo fibrótico las HSCs se activan y se desdiferencian a miofibroblastos, con un fenotipo caracterizado por la pérdida de las reservas de vitamina A, incremento en su proliferación así como la expresión de la proteína α -SMA y un exceso en la síntesis de proteínas de ECM como Colágena I (Velasco-Loyden, et al., 2010). El exceso en la deposición de componentes de ECM en la fibrosis hepática puede atribuirse ampliamente a miembros de tres familias de proteínas: colágenas, en particular a los tipos I, III y IV; proteoglicanos, como la fibronectina, laminina y el ácido hialurónico; y glucoproteínas, incluyendo la heparina, sulfatos de condroitina y glucanos de gran tamaño (*biglycans*). Es importante recalcar que múltiples componentes de ECM se encuentran dramáticamente sobreexpresados en la fibrosis hepática y que la colágena tipo I es la proteína más abundante en el cuerpo y ha sido caracterizada ampliamente, lo que la hace un blanco atractivo para el desarrollo de terapias antifibrogénicas (Thompson, et al., 2011).

La colágena (Figura 6) es sintetizada en forma de triple hélice a partir de tres cadenas α polipeptídicas compuestas de repetidos continuos de glicina (Gly)-X-Y. La glicina es esencial en la primera posición en la cadena, ya que por su tamaño es el único aminoácido lo suficientemente pequeño para colocarse en

el centro de la triple hélice. La prolina frecuentemente se encuentra en la posición X y la hidroxiprolina en la posición Y. Estos aminoácidos limitan la rotación de la triple estructura helicoidal y su localización en la superficie facilita el autoensamblaje y polimerización de las moléculas de colágena a través de interacciones entre cargas hidrofóbicas (Nelson y Cox 2008).

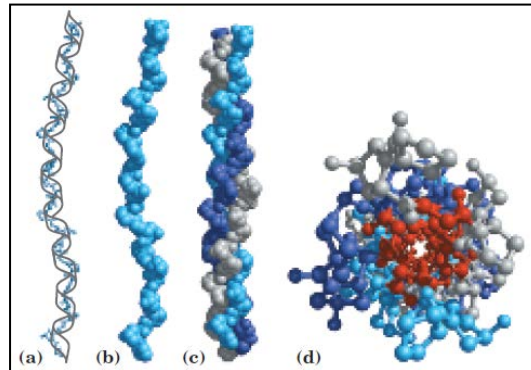


Fig. 6. Estructura de la Colágena. a) La cadena α de la colágena tiene una estructura secundaria repetida, única en esta proteína. El tripéptido de la secuencia repetida Gly-X-Pro o Gly-X-4-Hyp adopta una estructura helicoidal levógira con tres residuos por vuelta. La secuencia repetida representada en este modelo es Gly-X-4-Hyp. b) Modelo de estructura espacial de la misma cadena α . c) Tres de éstas hélices (aquí se muestran en gris, azul claro y azul marino) enredadas una sobre otra hacia la derecha. d) Las tres cadenas de la súper hélice de colágena vistas desde un extremo. Los residuos Gly se muestran en rojo. Glicina, que por su tamaño pequeño, se requiere en las uniones estrechas donde las tres cadenas están en contacto. Las esferas en la ilustración no representan los radios de Van der Waals de los átomos individuales. El centro de las tres cadenas de la súper hélice no es hueco, como aparece aquí, pero es muy compacto. (Tomado de Nelson y Cox, 2008).

En los tejidos sanos las colágenas son secretadas dentro de la matriz extracelular y ayudan a mantener la integridad del tejido a través de la interacción entre las superficies celulares, con otros componentes de ECM y con los factores de crecimiento y diferenciación. La colágena tipo I es un importante componente en el proceso de lesión-cicatrización y se encuentra en grandes cantidades en el tejido cicatrizado asociado a una gran variedad de condiciones. En el hígado el daño crónico estimula la activación de HSC y otros precursores de miofibroblastos, lo

que resulta en un cambio fenotípico debido a la producción y secreción excesiva de productos de ECM, particularmente colágena I. La síntesis de la colágena I inicia por la expresión de los genes *col1a1* y *col1a2* que codifican a los ARNm de las procolágenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$, respectivamente. Los niveles de estos productos génicos pueden ser regulados tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. A pesar de estar localizados en cromosomas diferentes, la expresión de estos dos genes está regulada coordinadamente de una manera tejido-específica dando origen a los ARNm de procolágenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$ en una proporción 2:1 respectivamente. Numerosos elementos reguladores han sido identificados en el promotor y en el primer intrón de *col1a1* y *col1a2* los cuales modulan la expresión de los transcritos a través de su interacción con los factores de transcripción (Thompson, McKillop et al. 2011).

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) ha sido descrito como la citocina fibrogénica más potente para HSCs por lo que es un blanco en la terapia antifibrótica. La expresión de TGF- β , proteína que es secretada por HSCs y otros tipos celulares como las células de Kupffer, se encuentra incrementada en la fibrosis. La estimulación con TGF- β provoca la activación de la señalización por Smad la cual puede provocar la sobreexpresión de procolágena vía la formación de un complejo heterodimérico con Smad2, 3 y 4, donde Smad7 es inhibidor. TGF- β puede también estimular la expresión de procolágena mediante la generación intracelular de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la subsecuente activación de la cinasa p38 activada por mitógenos. Además el factor nuclear κB (NF κB) esta comúnmente asociado a la fibrosis hepática. A pesar de que no se requiere para la activación de HSCs, un incremento en el heterodímero p65/p50 con un decremento concomitante de la proteína inhibidora de NF κB , I $\kappa B\alpha$, provoca la supervivencia de HSCs activadas. Aunque, se ha observado que una disminución de la expresión de NF κB en HSCs activadas en cultivo, inhibe la expresión de los transcritos de las procolágenas $\alpha 1(I)$ y $\alpha 2(I)$. Sin embargo, no está claro cómo ocurre este fenómeno *in vivo* (Thompson, et al., 2011).

Dentro de la regulación transcripcional de colágena I, recientemente se ha descrito el papel PPAR- γ ; el efecto de este factor nuclear se describe en el apartado de antecedentes directos. Es importante destacar que además de la regulación transcripcional, existen reguladores post-transcripcionales y post-traduccionales de colágena I, los cuales no son tratados en este trabajo.

I.3. Epigenética y cirrosis

Las células del cuerpo son genéticamente idénticas pero son estructural y funcionalmente heterogéneas debido a la expresión diferencial de genes. Estas diferencias pueden surgir durante el desarrollo, la diferenciación celular o en la enfermedad. Los cambios resultantes son estables y se conservan durante la mitosis; se denominan epigenéticos, porque son heredables en el corto plazo pero no involucran mutaciones en el propio ADN. Existen tres principales mecanismos que intervienen en los fenómenos epigenéticos: modificaciones de histonas, metilación del ADN y silenciamiento por ARNs no codificantes (Mann and Mann 2008).

En la década pasada, un gran número de estudios reportaron alteraciones epigenéticas en el hígado atribuibles al alcohol incluyendo la modificación de histonas, metilación de ADN e histonas derivado del sistema de donación de grupos metilo, S-adenosilmetionina (SAM), miARN como modificadores post-transcripcionales y enzimas remodeladoras de cromatina como acetiltransferasas de histonas, desacetilasas de histonas y ADN metiltransferasas (Mandrekar, 2011).

I.3.1. La cromatina

Desde hace mucho tiempo, se conoce que los eucariontes tienen estructurado su genoma en cromatina, en donde la unidad fundamental de ésta es el nucleosoma, el cual está conformado por un octámero de histonas (compuesto por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) (Turner 2007). Un fragmento de 146 pares de bases (pb) de ADN se arregla alrededor de cada octámero (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002) y abarca 1.75 vueltas (Figura 7). Esta conformación permite, en asociación con otras proteínas, la compactación del genoma a múltiples niveles. La estructura de 10 nm, también conocida como “collar de perlas”, es el nivel primario de compactación. A su vez el collar de perlas tiene la capacidad de compactarse en niveles superiores de complejidad mediante varias proteínas, entre las que se encuentra la quinta histona conocida como histona H1, que es necesaria para alcanzar el siguiente nivel de compactación, conocido como la fibra de 30 nm o solenoide (Felsenfeld y Groudine, 2003) además de otras proteínas no histónicas como las proteínas de alta movilidad electroforética (HMGs). Cada hebra se entrelaza entre si varias veces para generar otra de mayor grosor y formar parte de una cromátida de un cromosoma que representa el mayor nivel de estructuración (Figura 7) (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002).

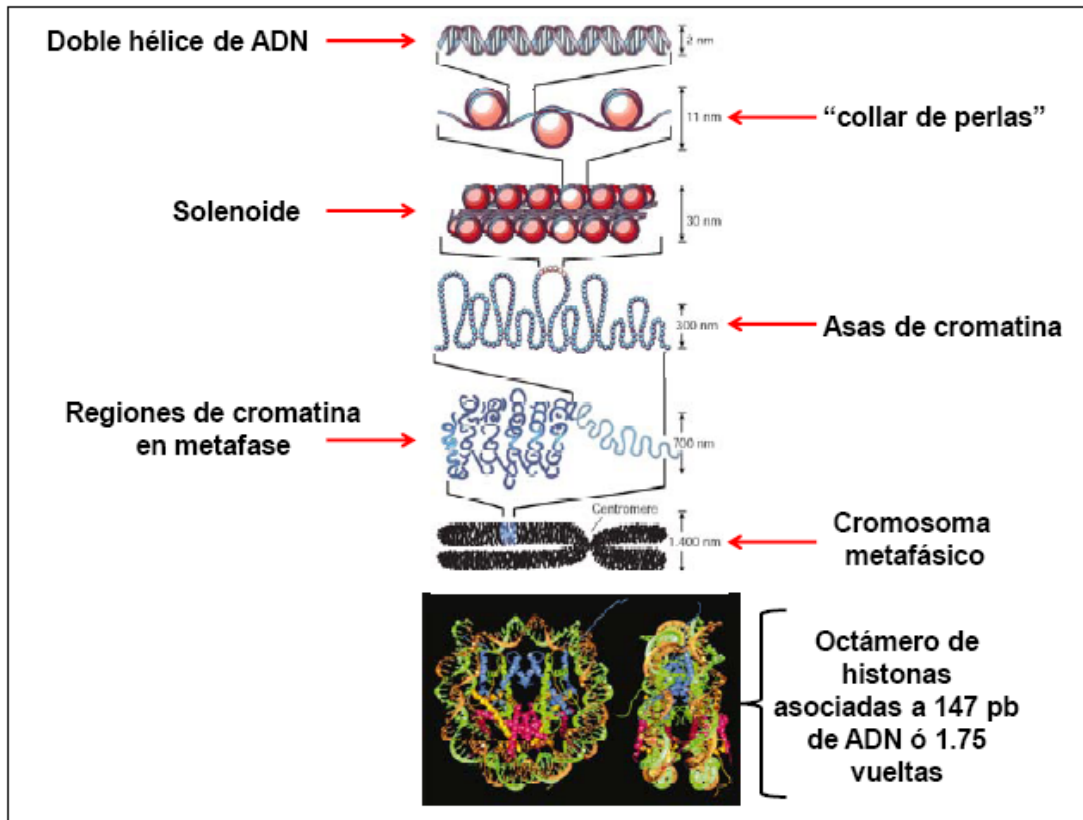


Fig.7. Representación de los distintos niveles de estructuración de la cromatina, desde su organización primaria, "el collar de perlas" hasta su forma más compacta, "el cromosoma metafásico". En la parte inferior se presenta un modelo del nucleosoma y el ADN a una resolución de 2.8 Å. (Tomado de Felsenfeld y Groudine, 2003).

Algunos estudios demostraron que el ADN organizado en el nucleosoma no es accesible a la maquinaria transcripcional. Este efecto se ve favorecido cuando las lisinas del extremo amino terminal no sufren modificaciones, de hecho las cargas positivas de estos residuos permiten la interacción electrostática con las cargas negativas de los grupos fosfato del ADN, generando una organización más cerrada y compacta (Arenas-Huertero and Recillas-Targa 2002), es decir, el empaquetamiento del genoma en cromatina tiene repercusiones directas en la actividad transcripcional, siendo necesaria su remodelación para llevar a cabo la expresión de los genes en un espacio y tiempo definido. Los responsables de llevar a cabo la remodelación de la cromatina contribuyen a la realización de diversos procesos epigenéticos, por lo cual la regulación epigenética se define

como aquellos cambios heredables en la expresión de los genes que ocurren sin que se presenten modificaciones en la secuencia del ADN (Recillas, 2002).

I.3.2. Acetilación de histonas

Se sabe que la acetilación está relacionada con la regulación de la transcripción génica. Esta relación se ha corroborado al observar que los complejos activadores de la transcripción poseen funciones de acetiltransferasas de histonas (HAT). Por otro lado, los complejos co-represores poseen actividad de desacetilasas de histonas (HDAC) y confieren represión transcripcional. De esta manera, el proceso de acetilación de histonas es dinámico y los residuos de lisinas modificados hacia el extremo amino-terminal, son hiperacetilados con vidas medias de pocos minutos en zonas de cromatina transcripcionalmente activa. Para la histona H4, los residuos 5, 8, 12 y 16 son los sitios de lisinas que pueden acetilarse. La histona H3 tiene 4 residuos potenciales de modificación: éstos son el 14, 18, 23 y 27 (Figura 8). Finalmente para las H2A y H2B los sitios de acetilación son los residuos 5; así como el 5, 12, 15 y 20, respectivamente. La acetilación facilita la unión de los factores de transcripción a las secuencias de ADN en las zonas promotoras de los genes, fomentando una estructura abierta de la cromatina. Incluso la acetilación incrementa la solubilidad de la cromatina en medios más acuosos. Sin embargo los niveles de acetilación requeridos para facilitar la transcripción son realmente bajos, del total de 28 residuos potenciales de lisinas a modificar por octámero de histonas, con sólo 12 de ellas que estén acetiladas se eleva hasta 15 veces más la tasa de transcripción *in vitro* (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002).

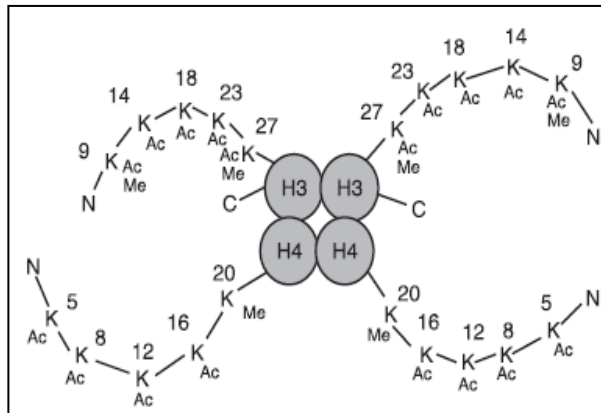


Fig. 8. Residuos de aminoácidos de las histonas H3 y H4 que son sujetos a modificaciones covalentes: acetilación y metilación. Los números indican los residuos a modificar. K, lisina; Ac, acetilación; Me, metilación. Los círculos en la figura indican la parte hidrofóbica de las histonas. (Tomado de Arenas-Huerta y Recillas-Targa, 2002)

I.3.3. Metilación de histonas

Se ha demostrado que la proteína SUV39H1 en humano y ratón, codifica para una metiltransferasa de histona (HMT), que es capaz de metilar de manera selectiva a la lisina 9 de la región amino-terminal de la histona H3. Ahora bien, funcionalmente se demostró una correlación entre la fosforilación de la serina 10 y la acetilación de la lisina 9, efecto que favorece la activación transcripcional. Por el contrario, la metilación de la lisina 9 inhibe la fosforilación de la serina 10 y genera un silenciamiento génico. Existe otro participante, la proteína de heterocromatina 1 (HP1), que es parte integral de la heterocromatina: posee un cromodominio que tiene la capacidad de unirse de manera específica y con alta afinidad a la lisina 9 metilada. De manera interesante, la lisina 14 también puede ser metilada, pero a diferencia de la lisina 9, la proteína HP1 no se le une. Todas estas observaciones hacen patente una nueva vía de regulación mediante la modificación postraduccional de las histonas. En particular la metilación de la lisina 9 y la consecuente unión de HP1, inician la formación de heterocromatina como un medio de silenciamiento (Arenas-Huerta y Recillas-Targa, 2002).

La trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9Me3) es una marca epigenética crucial de heterocromatina y se ha asociado con la represión transcripcional. Un incremento de la metilación de H3K9, conlleva al silenciamiento génico aberrante y se ha encontrado en diversos tipos de cáncer como en hígado, próstata, pulmón, colon y mama donde se ha observado la sobreexpresión de G9a, una HMT específica de la lisina 9 de la histona H3 (Fullgrabe, et al., 2011).

De igual manera, la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Me3), que se establece por el sistema *Polycomb*, está implicada en la formación de dominios de cromatina represiva. La H3K27Me3 se extiende por grandes regiones que albergan una variedad de genes diana y regula negativamente la transcripción mediante la promoción de una estructura de cromatina cerrada. Se asocia frecuentemente al silenciamiento génico, especialmente en la represión de programas de diferenciación no deseada en la diferenciación de linaje. El homólogo 2 del potenciador zeste (EZH2) es la subunidad catalítica del complejo 2 de represión *polycomb*, el cual media esta modificación sobre H3K27 (Fullgrabe, et al., 2011).

Otra modificación asociada a cromatina cerrada es la metilación de la H4K20. En particular, H4K20Me3 se encuentra en regiones de heterocromatina constitutiva, así mismo, esta marca se enriquece en regiones de cromatina que contienen genes silenciados. La metilación de H4K20 es compleja y es catalizada por diferentes HMTs, que incluyen Pr-Set7 y Suv4-20 (Suv4-20h1 y Suv4-20h2). El grueso de la monometilación de H4K20 es catalizada principalmente por Pr-Set7. H4K20Me1 sirve de sustrato para las enzimas Suv4-20 que son responsables de H4K20Me2/3 (Fullgrabe, et al., 2011).

En contraste con las modificaciones citadas en los párrafos anteriores, la di- y trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4Me2/Me3) se asocia con la capacidad transcripcional y la activación, los niveles más altos se observan próximos a los sitios de inicios transcripcionales de genes con elevada expresión.

Una disminución de H3K4Me2/Me3 se observa en un rango de tejidos neoplásicos y puede servir como factor de pronóstico clínico. La metilación de H3K4 se establece por SET1 y por HMTs en la leucemia de linaje mixto (MLL) y es removida por la desmetilasa 1 específica de lisina (LSD1) y por el dominio 1 rico en AT de jumonji (JARID1) que es miembro de la familia de desmetilasas de histonas (HDM) (Fullgrabe, et al., 2011).

I.3.4. Metilación del ADN y su papel en el silenciamiento génico

La metilación del ADN es probablemente la modificación epigenética más estudiada (Fullgrabe, Kavanagh et al. 2011); es un proceso importante en la regulación epigenética. Consiste en la incorporación de un grupo metilo en la citosina del dinucleótido CpG. Participa en la regulación de etapas tempranas del desarrollo, así como en la inmovilización de transposones, manteniendo una mayor estabilidad. La metilación del ADN puede regular la expresión génica por dos mecanismos:

- a) Por interferencia directa en la unión de los factores de transcripción con secuencias blanco, evitando su activación.
- b) La unión de proteínas que reconocen ADN metilado, conocidas como *Methyl-CpG-binding proteins*, que unen co-represores y éstos además reclutan desacetilasas de histonas, generando una cromatina altamente compacta (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002).

Las reacciones de transmetilación biológicas utilizan grupos metilo derivados de donadores de metilos de la dieta o de cofactores que acarrean unidades de carbono. Una vía central para varias de éstas reacciones es el ciclo de la metionina (Figura 9). Los sustratos para las reacciones de metilación son diversos, como pueden ser: material genético (ADN), proteínas o fosfolípidos. Además es importante mencionar que la proporción hepatocelular de SAM/SAH es crítica para controlar las reacciones de metilación (Kharbanda, 2007).

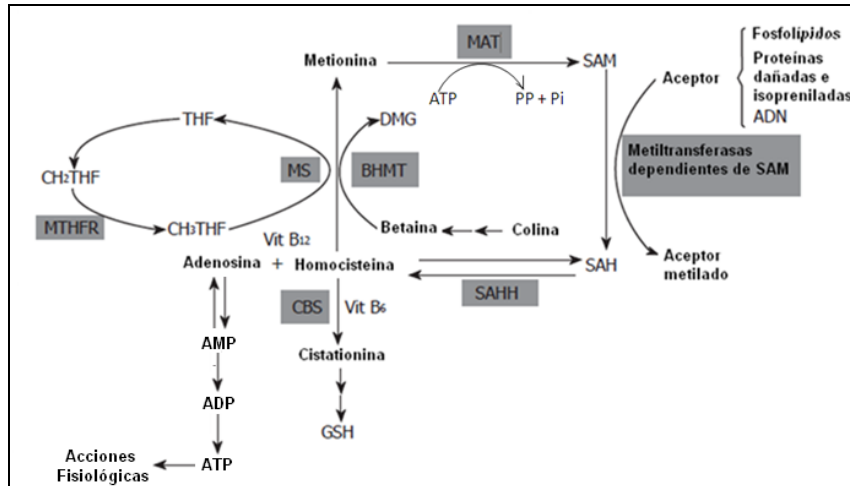


Fig. 9. Ruta metabólica de la metionina en el hígado, donde se destaca la importancia de las reacciones catalizadas por metiltransferasas que ocurren gracias a la circulación de los principales participantes: Metionina, S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), Homocisteína y Adenosina, MTHFR (metilentetrahidrofolato reductasa), MAT (metionina adenosiltransferasa), MS (Metionina sintasa), BHMT (Betaina-homocisteína S-metiltransferasa), CBS (Cistationina-β-sintasa), SAHH (S-Adenosilhomocisteína hidrolasa) (Modificado de Kharbanda, 2007).

Las metiltransferasas de ADN son las responsables de establecer y mantener los patrones de metilación del ADN, los cuales aportan represión génica estable a largo plazo. Recientemente se ha encontrado evidencia de que las rutas de metilación del ADN y de modificación de histonas pueden ser dependientes una de la otra, y que esta retroalimentación puede estar mediada por interacciones bioquímicas entre las HMTs y las ADN metiltransferasas (DNMTs) (Fullgrabe, et al., 2011), además se ha descrito el proceso por el cual ocurre la desmetilación del ADN, el cual sugiere que la 5-hidroximetilcitosina (5hmC) sirve como intermediario para remover la citosina metilada ya sea por la dilución pasiva que impide la remetilación con DNMTs cuando la célula se divide, o por reemplazamiento activo de citosinas modificadas vía la reparación de ADN en ausencia de división celular (Bhutani, et al., 2011).

I.4. Receptores nucleares

El receptor (nuclear) gamma activado por proliferadores peroxisomales (PPAR- γ) es un factor de transcripción dependiente de ligando que regula la diferenciación de adipocitos y el metabolismo lipídico. El PPAR- γ está altamente expresado en HSCs quiescentes, pero su expresión disminuye rápidamente durante su activación *in vivo* e *in vitro*. La inducción de la expresión de este receptor nuclear en HSC activadas puede revertir su fenotipo hacia células quiescentes y el tratamiento de HSCs con ligandos naturales o sintéticos de PPAR- γ inhibe su activación (Velasco-Loyden, et al., 2010).

La súper familia de receptores nucleares engloba factores transcripcionales relacionado entre sí pero a su vez muy diversos arreglo, la cual incluye receptores nucleares hormonales (NHRs) y receptores nucleares huérfanos. Los NHRs son receptores para los cuales se han identificado ligandos hormonales, mientras que los receptores huérfanos son llamados así porque aún no se ha logrado identificar el ligando endógeno que une. A diferencia de las hormonas con receptores de superficie celular, las hormonas lipofílicas pueden atravesar la membrana plasmática hacia el interior celular donde los NHRs transducen señales de glucocorticoides, mineralocorticoides, esteroides sexuales (estrógenos, progesterona y andrógenos) hormonas tiroideas y vitamina D₃. Todos los receptores nucleares tienen una estructura en común (Figura 10), la cual incluye un dominio central de unión a ADN (DBD) responsable de la unión del receptor a una secuencia de ADN de alta especificidad que comprende al elemento de respuesta. El dominio de unión a ligando (LBD) se encuentra en el extremo C-terminal de receptor y reconoce específicamente ligandos hormonales o no hormonales dirigiendo así una respuesta biológica específica. Estos receptores presentan dominios N-terminal y C-terminal variables, así como una región variable entre los DBD y LBD. Los receptores nucleares existen como homo- o heterodímeros y con su correspondiente pareja se unen a secuencias llamadas

elementos de respuesta (RE) que se encuentran separadas por un número variable de nucleótidos espaciadores (Olefsky, 2001).

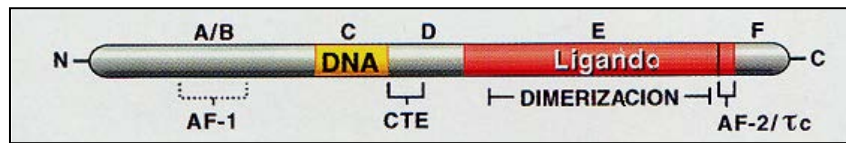


Fig. 10. Representación esquemática de un receptor nuclear típico. Estos receptores pueden dividirse en cinco regiones basándose en la similitud de su estructura y función (A, B, C, D, E y F). La región C y E contienen a las regiones conservadas DBD y LBD. Existe una extensión carboxilo terminal (CTE) del DBD, una región de dimerización con el LBD y dos dominios de transactivación (AF-1 y AF-2/ τ_c). Un segundo dominio de dimerización (no se muestra) se encuentra en el DBD y se requiere para la heterodimerización del receptor sobre los repetidos directos de REs. (Modificado de Mangelsdorf y Evans, 1995).

En 1995 Mangelsdorf y colaboradores propusieron cuatro categorías de receptores nucleares en la cual, los receptores de Clase 1 incluyen los receptores de hormonas esteroides conocidos, que funcionan como homodímeros uniendo ambas partes de sus RE que son secuencias de repetidos inversos. Los receptores de Clase 2 forman heterodímeros con el receptor de retinoides X (RXR) y su función es dependiente de ligando. El resto de las clases incluyen receptores huérfanos, que funcionan como homodímeros al unirse a sus repetidos RE (Clase 3) o monómeros que se unen a un solo sitio RE (Clase 4) (Mangelsdorf y Evans, 1995).

I.4.1. Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)

Los PPARs, así como los receptores más estudiados de estrógenos, glucocorticoides u hormonas tiroideas, pertenece a la misma familia de factores de transcripción, que comprende 49 miembros. Poseen la estructura canónica de los dominios de un receptor nuclear, con cada dominio (de unión a ADN, de unión a ligando, de transactivación) modulando el potencial regulatorio génico. Se han identificado tres isoformas: PPAR- α (NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2) y PPAR- γ (NR1C3). El PPAR α fue el primero en ser clonado a partir de roedores como un

receptor nuclear activado por agentes que producen la proliferación peroxisomal en el hígado. Sin embargo este efecto no se ha observado en humanos. Los PPARs son activados por ligando, como la mayoría de los receptores nucleares. Los ligandos endógenos de PPAR son los ácidos grasos y sus derivados como los leucotrienos y las prostaglandinas. Se ha propuesto que los PPARs actúan como “lipoestáticos” ya que se encargan de monitorear las señales lipídicas (Dufour and Clavien 2010).

Los PPARs actúan en la regulación de genes en diferentes estados, incluyendo la activación por ligando, uniéndose al ADN, disminuyendo correpresores o reclutando co-activadores. La unión a ADN requiere de la formación de un heterodímero de PPAR y RXR (receptor X de ácido retinoico: receptor para 9-cis ácido retinóico, NR2B) y la unión de este a su elemento de secuencia específica en la región reguladora de los genes diana, la cuál es llamada elemento respuesta a PPARs (PPRE) (Figura 11). Para activar la transcripción, los PPARs requieren de co-factores, algunos de los cuales tienen actividad remodeladora de cromatina, como la acetil transferasa de histonas (HAT) p300. Para regular genes diana específicos en un tejido dado, se requiere la coexpresión de PPARs y un conjunto definido de sus co-reguladores en la misma célula (Dufour y Clavien, 2010).

Adicionalmente a este control clásico de la expresión genética dependiente de ligando, la actividad transcripcional de PPARs es finamente modulada por modificaciones post-transcripcionales incluyendo la fosforilación y la sumoilación (SUMO1; un pequeño modificador tipo ubiquitina) (Dufour y Clavien, 2010).

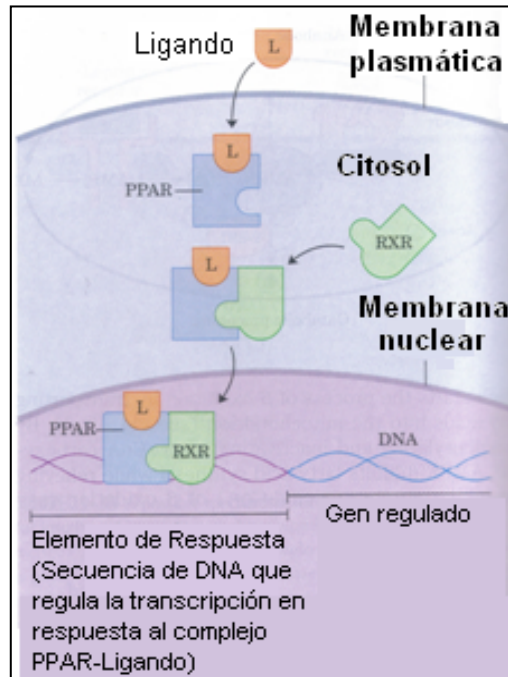


Fig. 11. Mecanismo de acción de PPARs. Los PPARs son factores de transcripción que cuando se unen a su ligando, forman un heterodímero con el receptor nuclear RXR. El dímero se une a una región específica de ADN conocida como elemento de respuesta, estimulando la transcripción de genes regulados por dicha secuencia. (Modificado de Nelson y Cox 2008).

La integración metabólica de los PPARs en el humano (Figura 12) es la siguiente: PPAR- γ , se expresa principalmente en el hígado y tejido adiposo, está involucrado en la activación de genes que son necesarios para la diferenciación de fibroblastos en adipocitos y con genes que codifican para proteínas necesarias para la síntesis de lípidos y su almacenamiento en adipocitos. PPAR- γ es activado por las tiazolidinedionas, fármacos que son usados para el tratamiento de la diabetes tipo 2. PPAR- α se expresa en el hígado, riñón, corazón, esqueleto, músculo y tejido adiposo marrón. Los ligandos que activan la transcripción de este factor incluyen eicosanoides, ácidos grasos libres, y los fármacos de la clase de los fibratos como el fenofibrato (TriCor) y el ciprofibrato (Modalim), que son utilizados para tratar la enfermedad coronaria a través de la elevación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la disminución de triacilglicerolos sanguíneos. En los hepatocitos, PPAR- α enciende genes que son necesarios para el consumo y β -oxidación de ácidos

grasos y la formación de cuerpos cetónicos durante el ayuno. PPAR- β/δ es un factor clave para la oxidación de lípidos, que actúa monitoreando los cambios en la dieta lipídica. PPAR- β/δ actúa en el hígado y músculo estimulando la transcripción de por lo menos nueve genes que codifican para proteínas de la β -oxidación así como para la dispersión de energía a través del desacoplamiento mitocondrial (Nelson y Cox, 2008).

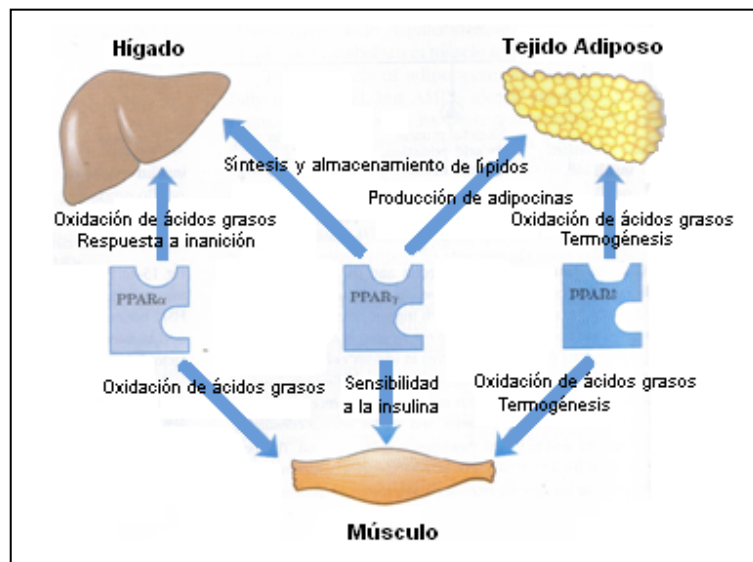


Fig. 12. Integración metabólica de PPARs. Las tres isoformas de PPARs regulan la homeostasis de lípidos y glucosa a través de la coordinación de la activación de genes a nivel hepático, muscular y de tejido adiposo. (Modificado de Nelson y Cox 2008).

Los patrones de expresión de las tres isoformas de PPAR son diferentes. PPAR- α es altamente expresado en tejidos con una elevada actividad catabólica de ácidos grasos. En roedores PPAR- α es altamente expresado en hígado, donde su máximo nivel de expresión se da en células parenquimales, mientras que en células endoteliales, Kupffer y estelares es mucho menor. PPAR- β/δ se expresa ubicuamente, pero a diferentes niveles dependiendo del tipo celular, y juega un papel importante en el metabolismo de lípidos, reparación de tejidos y desarrollo embrionario. En el hígado PPAR- β/δ se expresa en células estelares pero es pobremente expresado en células parenquimales. PPAR- γ se expresa principalmente en tejido adiposo, donde regula la adipogénesis y la integridad del

tejido adiposo. En el hígado PPAR- γ se expresa en niveles muy bajos, pero sus niveles incrementan significativamente durante la acumulación de lípidos tanto en células parenquimales como en estelares (Dufour y Clavien 2010).

Debido a su presencia y acción en órganos que intervienen en el proceso nutricional y la homeostasis de las vías energéticas, los PPARs se han vuelto blancos farmacéuticos para el tratamiento de dislipidemia, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Dufour y Clavien 2010).

1. ANTECEDENTES DIRECTOS

A pesar de los avances en el conocimiento de las enfermedades crónico-degenerativas del hígado, no existe un tratamiento curativo para estos padecimientos. Las estrategias terapéuticas están encaminadas al manejo paliativo que retrasa la aparición de la sintomatología asociada a la cirrosis y consiste principalmente en dietas con bajo contenido de grasas y en suplementos vitamínicos. Se han usado algunos medicamentos antifibróticos que presentan eventos adversos como gastritis. El único tratamiento efectivo por el momento es el trasplante ortotópico del hígado con el cual se ha logrado sobrevida de hasta un 70% durante el primer año posterior a la cirugía. Sin embargo, sus desventajas son obvias; en efecto, no todos los pacientes son candidatos a trasplante, el procedimiento tiene un costo alto, la obtención de donadores es difícil y el tratamiento con inmunosupresores necesarios después de la cirugía también es caro. Aunado a esto, existe alta posibilidad de reincidencia de la infección y de la fibrosis en el hígado trasplantado por cirrosis secundaria a infección por virus de hepatitis (Chagoya-de Sánchez, et al., 2007).

Por lo que una alternativa terapéutica muy promisoriosa para el tratamiento de la cirrosis es el uso de un nuevo fármaco derivado de la adenosina, denominado IFC-305 (Patente UNAM 207422). Este compuesto tiene una vida media muy corta debido a su metabolismo rápido en el hígado y hasta el momento no se han observado eventos adversos a la dosis y condiciones administradas.

Desde 1967, el equipo de investigación de la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez ha estado interesado en los efectos farmacológicos de la adenosina en el metabolismo hepático, encontrando que el nucleósido es capaz de aumentar la carga energética de los hepatocitos, efecto que puede modificar los flujos metabólicos hepáticos. Aumenta la síntesis de glucógeno, inhibe la oxidación de los ácidos grasos y mantiene el estado de óxido-reducción de la célula (Chagoya-de-Sánchez, et al., 2005).

El efecto de la adenosina se ha probado en modelos agudos de hepatotoxicidad inducida por la administración de etanol o tetracloruro de carbono (CCl₄) observándose una disminución en los efectos tóxicos evidenciados por una prevención de la necrosis celular y la infiltración grasa en el hígado. Además, también se han probado los efectos del IFC-305 en un modelo de hepatotoxicidad crónica como la cirrosis, la cual se induce experimentalmente por el tratamiento con CCl₄ en ratas. Estos estudios en el modelo de prevención de cirrosis con la administración simultánea del tóxico y del derivado de adenosina, mostraron una disminución de la fibrosis inducida por el tóxico al inhibir en un 50% la acumulación de colágena en el tejido hepático, como resultado de un aumento en la actividad colagenolítica del hígado, observándose una normalización del metabolismo de colágena e induciendo un aumento en la proliferación hepática del hígado cirrótico (Chagoya-de-Sánchez, Suárez et al. 2005) El fármaco es capaz de disminuir las fibras de colágena a las 5 y 10 semanas de tratamiento después de la inducción de la cirrosis, observándose en tinciones de tricrómica de Masson, una recuperación paulatina de la arquitectura normal del hígado (Figura 13) (Pérez-Cabeza-de-Vaca, 2012). Estos efectos se acompañaron de una mejoría impresionante de la función hepática recuperándose hacia valores semejantes de los animales controles (Tabla 3) (Perez-Carreón, et al., 2010)

Tabla 3. Parámetros serológicos de la función hepática en rata. (Tomado de Pérez-Carreón, et al., 2010)

Grupo	Albúmina [g/dL]	Bilirrubina [mg/dL]	ALT [U/dL]	AST [U/dL]
Control	3.5 ± 0.098	0.8 ± 0.063	42 ± 1.558	179 ± 5.369
CCl ₄ (to)	2.2 ± 0.039*	2.3 ± 0.271*	324 ± 14.318*	396 ± 33.544*
to + 5ss	3.1 ± 0.189	2.1 ± 0.210*	300 ± 13.045*	389 ± 29.646*
to + 10ss	2.5 ± 0.061*	1.4 ± 0.144*	145 ± 11.316*	229 ± 15.707
to + 5IFC	3.6 ± 0.119	1.0 ± 0.046**	81 ± 9.295**	215 ± 14.555**
to + 10IFC	3.1 ± 0.065**	1.1 ± 0.127	119 ± 8.717	237 ± 16.569

Promedio ± DEM 5 ratas/grupo; Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST)

*Diferencia significativa comparada contra el grupo control.

**Diferencia significativa comparada contra to + 5ss ó to + 10ss. (ss: solución salina)

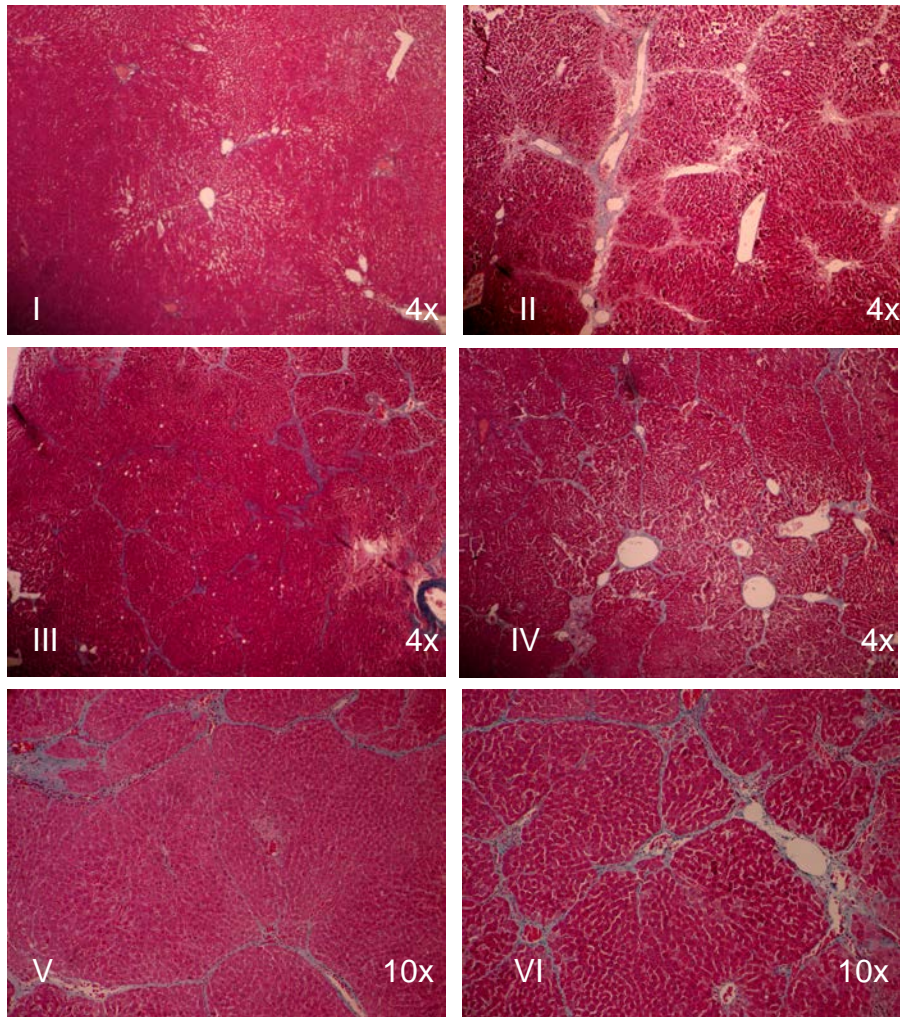


Fig. 13. Tejido hepático de rata fijado en paraformaldehído, teñido con tricrómica de Masson. Esta tinción permite observar las fibras de colágena tipo I de color azul, los citoplasmas y estructuras oxidadas en rojo y el núcleo más denso. I. Control, II. CCl_4 (to), III. to + 5IFC, IV. to + 5ss, V. to + 10IFC, VI. to + 10ss. Se observa que en II y IV existe alta deposición de fibras de colágena y una distribución desordenada de los cordones de hepatocitos, en comparación con I y III en donde se observa un parénquima más ordenado y en el caso de III que las fibras de colágena son más pequeñas respecto a IV. Por otra parte, V en comparación con VI tiene menor deposición de fibras de colágena y el tejido parenquimal se encuentra más homogéneo y con menor cantidad de estructuras oxidadas, el color rojo es menos intenso. (to + 5IFC y to + 10IFC: administración de IFC-305 durante 5 o 10 semanas después de la inducción de la cirrosis; to + 5ss y to + 10ss: administración de solución salina durante 5 o 10 semanas después de la inducción de la cirrosis) (Tomado de Pérez-Cabeza-de-Vaca, 2012)

El fármaco en este compuesto, la 6-aminoribofuranosil purina (6-ARP o adenosina), es un nucleósido con actividad fisiológica en los sistemas nervioso central y cardiovascular, es un modulador metabólico y de la respuesta inmune. La mayor parte de las células poseen receptores de adenosina de cuatro tipos A1, A2a, A2b y A3; y además dicha molécula puede penetrar a la célula por transporte facilitado (Chagoya-de Sánchez, et al., 2007).

A continuación se enumeran algunos de los efectos farmacológicos de la adenosina en la hepatotoxicidad aguda inducida por agentes hepatotóxicos:

1. Prevención del hígado graso (García-Saínez, et al., 1979).
2. Recuperación del estado energético basal, disminuido por los tóxicos (Hernández-Muñoz, et al., 1978).
3. Mantenimiento del equilibrio redox entre citosol y mitocondria (García-Saínez, et al., 1980).
4. Prevención de la necrosis inducida por CCl₄ (Hernandez-Muñoz, et al., 1984).
5. Evita la propagación de los radicales libres generados durante el metabolismo del CCl₄ (Chagoya de Sánchez, et al., 1995).
6. Control del flujo sanguíneo en la arteria hepática (García-Saínez, et al., 1980).

A medida que avanza el conocimiento de los mecanismos que desencadenan esta patología, se mantiene latente el interés de muy diversos grupos de investigación por revertir la cirrosis (Chagoya-de Sánchez, et al. 2007).

Las enfermedades crónicas del hígado representan una importante causa de morbilidad y mortalidad. Enfermedades recurrentes o crónicas y las vías de remodelado de tejido inflamado pueden originar una fibrosis severa y un eventual estado de cirrosis. La activación de las células estelares juega un papel importante durante la regulación de la regeneración hepática (Dufour y Clavien, 2010). En las

áreas dañadas, durante la fibrogénesis, ocurre la transición de células estelares quiescentes a miofibroblastos proliferativos a través de la acción de citocinas y estrés oxidante; este cambio de fenotipo, está caracterizado por la pérdida de las gotas lipídicas que contienen ácido retinóico en éstas células, y una elevada expresión de componentes de matriz extracelular como las proteínas colágena I y III, actina α de músculo liso (α -SMA) y desmina. Uno de los efectos antifibrogénicos fundamentales de PPAR- γ es su habilidad para inhibir la expresión de la colágena tipo I a nivel transcripcional (Pérez-Carreón, et al., 2010). La colágena tipo I constituye el 40-50% del total de las proteínas colágena en el hígado sano e incrementa a 60-70% en el hígado cirrótico. La colágena tipo I, como ya se mencionó en la introducción, es una proteína heterotrimérica compuesta de dos polipéptidos α 1(I) y uno α 2(I), codificados por dos genes diferentes que se encuentran sobre expresados durante la fibrogénesis hepática. Al tratar HSCs activadas con un ligando para PPAR- γ o al transfectar estas células con un plásmido que contenga el gen que codifica a PPAR- γ , se ve disminuída la expresión basal de la actividad del promotor de procolágena α 1(I) la cual es altamente dependiente de la región flanqueadora 5' en las 2.2 kb proximales. Tsukamoto y colaboradores (Yavrom, et al., 2005) demostraron que en el promotor proximal a -133pb en la región flanqueante 5' de α 1(I) procolágena es dónde PPAR- γ ejerce su efecto inhibitorio, el cual esta mediado por la habilidad de ésta proteína para suprimir la unión de NF- κ B y su transactivación facilitada vía la inhibición de la proteína p300; es decir, la isoforma PPAR- γ suprime la activación de células estelares a través de la bajo regulación de colágena y componentes de la matriz extracelular. Por el contrario, en un modelo de CCl₄ para inducir un daño agudo al hígado, la activación de PPAR- β/δ induce la proliferación de células estelares durante la fibrosis temprana y potencializa la expresión de marcadores fibróticos (Hellemans, et al., 2003)

Es por esto que, de ser posible, la manipulación farmacológica del balance de la expresión de las isoformas de PPAR en células estelares promete ser una manera de atenuar la progresión de la fibrosis hepática (Dufour y Clavien 2010).

Al estudiar el transcriptoma de muestras de hígados de ratas a las que se les indujo cirrosis con CCl_4 se observaron 414 diferentes genes desregulados, mientras que al administrar el hepatoprotector IFC-305 a ratas cirróticas la expresión de estos genes tiende a normalizarse (Tabla 4 y Figura 14) (Pérez-Carreón, et al. 2010).

Tabla 4. Modificaciones en el perfil expresión genética global en hígados cirróticos así como el efecto del IFC-305 en este modelo (Peréz-Carreón, et al., 2010)

Muestra	Sobre expresados	Bajo regulados	Total
CCl_4 (to)	85	88	173
to + 5ss	86	91	177
to + 10ss	118	72	190
to + 5IFC	83	84	167
to + 10IFC	93	63	156

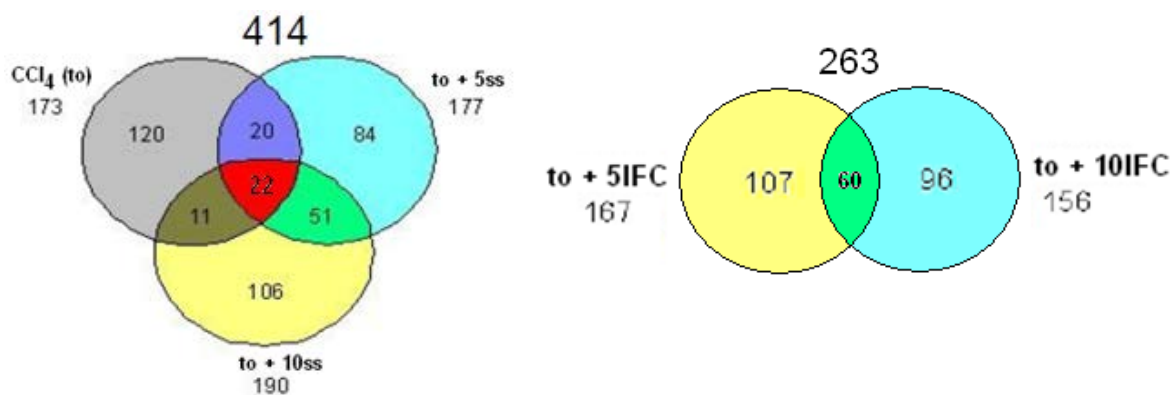


Fig. 14. Modificaciones en el perfil expresión genética global en hígados cirróticos (izquierda) así como el efecto del IFC-305 en este modelo (derecha). CCl_4 (to): Ratas tratada con CCl_4 durante 10 semanas, estado cirrótico; to+5ss: Ratas cirróticas tratadas con solución salina durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis; to+10ss: Ratas cirróticas tratadas con solución salina durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis; to+5IFC: Ratas cirróticas tratadas con IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis; to+10IFC: Ratas cirróticas tratadas con IFC-305 durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis (Pérez-Carreón, et al., 2010).

Dos genes modulados a nivel de transcripción por el IFC-305 son: *Col1a1* y *Pparg* (Figura 15) (Pérez-Carreón, et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que PPAR- γ disminuye la actividad fibrogénica en células estelares a través de la bajo-regulación de la procolágena α 1(I) y otros componentes de la matriz extracelular (Yavrom, et al., 2005); además el IFC-305 bloquea la activación de células estelares a miofibroblasto, observándose un aumento en la expresión del gen *Pparg*, y una disminución de las proteínas fibrogénicas (Figura 16) (Velasco-Loyden, et al., 2010).

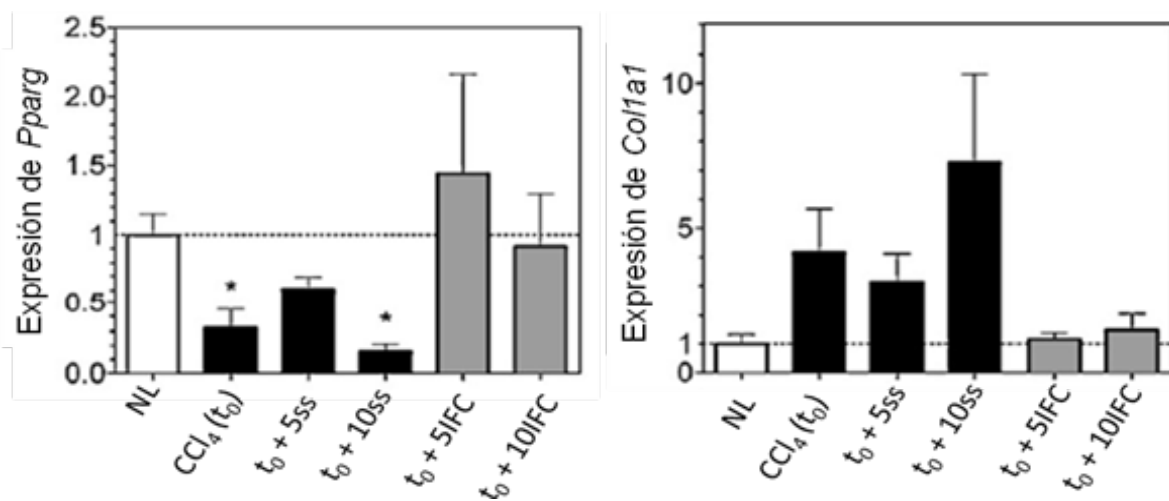


Fig. 15. Efecto del IFC-305 sobre la expresión de *Pparg* y *Col1a1* en hígados cirróticos cuantificados por RT-PCR. El mRNA de *Pparg* y *Col1a1* fue cuantificado y referido a los niveles del hígado sano (NL). Los valores de expresión arbitrarios fueron normalizados con el nivel genético de rRNA 18s eucariótico control. Los datos representan el promedio \pm DEM de 5 ratas/grupo. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el grupo NL. (Tomado de Pérez-Carreón, et al., 2010).

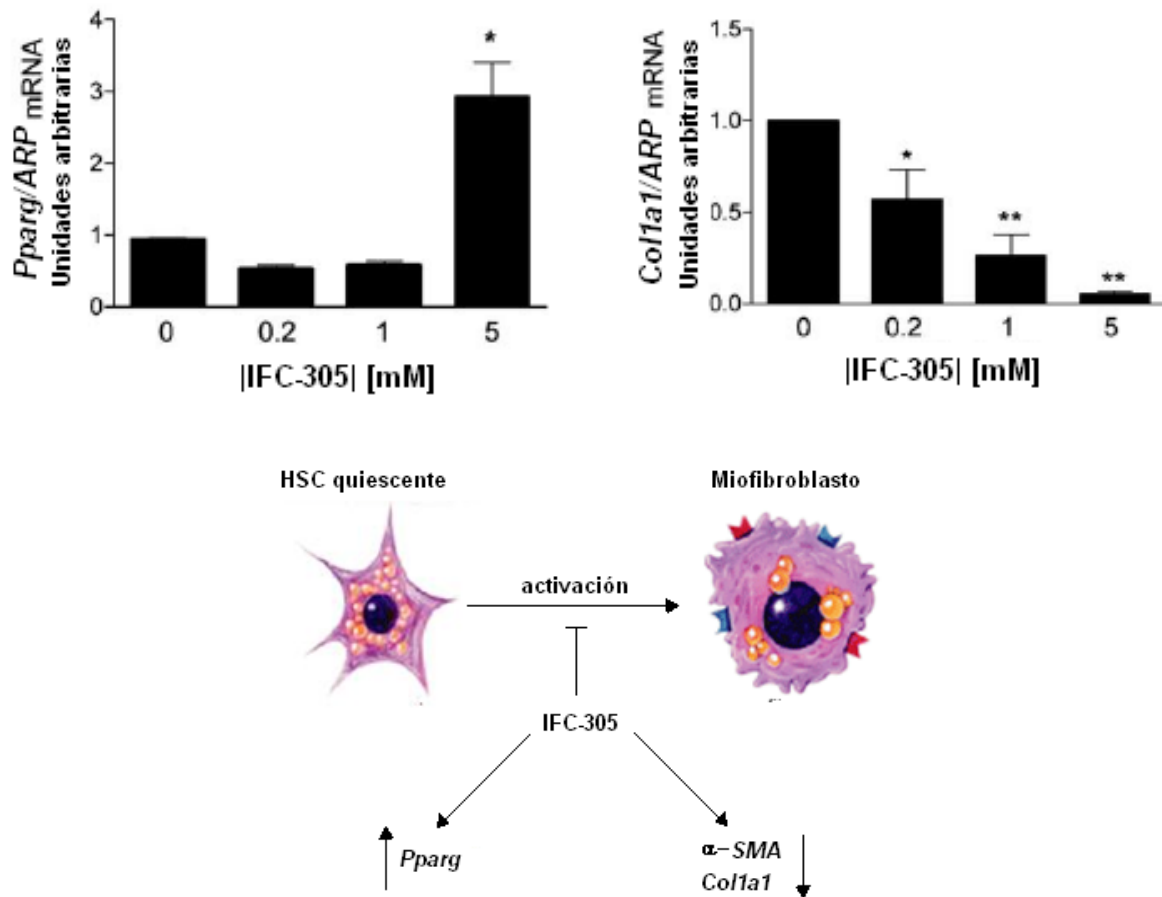


Fig. 16. Efecto del IFC-305 sobre células estelares hepáticas. El IFC-305 regula la expresión de marcadores profibrogénicos y antifibrogénicos en un cultivo de HSCs de 7 días. A las 24 después del aislamiento, las células fueron incubadas con las concentraciones indicadas de IFC-305 por 7 días, cambiando el medio cada día. A la izquierda se muestran dos gráficas con el análisis de qPCR de la expresión de *Pparg* y *Col1a1*; los datos fueron normalizados con la expresión de ARNm del gen de la proteína ácida ribosomal (*ARP*) y están expresados como el valor promedio \pm DEM de tres experimentos diferentes. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$ contra células a las que no se adicionó IFC-305. A la derecha se muestra un gráfico que resume dicho efecto del IFC-305 sobre HSCs. (Modificado de Velasco-Loyden, et al., 2010).

Es por esto que el equipo de la Dra. Chagoya se encuentra interesado en determinar si las acciones farmacológicas del compuesto IFC-305 involucran a nivel molecular una recuperación del estado epigenético de los genes antes mencionados.

La mortalidad por enfermedades hepáticas en México ha aumentado un 16% entre 1998-2009, según el Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI). En la actualidad no existe una cura para la cirrosis y los tratamientos disponibles son limitados, los cuales son la eliminación de la causa que originó la lesión (si es posible) o bien, el trasplante de hígado. Por tanto, es fundamental que sean elucidados los mecanismos moleculares que provocan la cirrosis ya que pueden proporcionar nuevas dianas farmacológicas (Mann and Mann 2008).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Dra. Chagoya y su equipo de trabajo han desarrollado un fármaco para el tratamiento de la cirrosis, el cual han denominado IFC-305 (Patente UNAM 207422) que es un aminoacil derivado de adenosina, cuyas evidencias experimentales demuestran la normalización de la función hepática. Con el interés por entender el mecanismo de acción de éste nuevo compuesto, se ha planteado la evaluación molecular, a nivel epigenético, de los cambios que ocurren en el hígado durante el proceso cirrótico así como los efectos que el fármaco tiene a dicho nivel durante la reversión de la cirrosis.

3. HIPÓTESIS

Considerando que el compuesto IFC-305 promueve un aumento en la expresión del gen *Pparg* a nivel del ARNm y que éste receptor nuclear regula negativamente la transcripción del gen *Col1a1* en HSC, es posible que la reversión de la cirrosis por la administración de este hepatoprotector esté mediada por modificaciones epigenéticas en el promotor del gen *Pparg*.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el mecanismo de acción del hepatoprotector IFC-305 involucra la regulación de modificaciones epigenéticas a nivel de ADN y en el promotor del gen *Pparg*.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el estado de la metilación global del ADN genómico (ADNg) en muestras de hígado de rata del modelo de cirrosis inducida con CCl₄, así como el efecto que el IFC-305 tiene sobre este estado de metilación de manera cualitativa y cuantitativa.
2. Determinar las modificaciones post-traduccionales de las histonas en el promotor del gen *Pparg* en muestras de hígado de rata del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ así como el efecto que el IFC-305 tiene a éste nivel epigenético de manera cualitativa.
3. Estudiar los niveles de expresión de las proteínas de matriz extracelular colágena I, desmina y el receptor nuclear PPAR-γ en muestras de hígado de rata del modelo de inducción de cirrosis con CCl₄, así como el efecto del hepatoprotector IFC-305 sobre la expresión de estas proteínas.

6. MÉTODOS

El tetracloruro de carbono (CCl_4) es un tóxico hepático y renal. En el hígado su efecto tóxico se produce por dos mecanismos diferentes. El primero consiste en la alteración de la capacidad de los hepatocitos para ligar los triglicéridos a las lipoproteínas transportadoras, lo que origina acumulación intracelular de lípidos y degeneración grasa del hígado. El segundo mecanismo consiste en la formación de metabolitos extremadamente tóxicos, que originan muerte celular y necrosis hepática centrolobulillar (Medina 2011). Una característica de algunos sustratos farmacológicos que no se relaciona con su estructura química es su capacidad para inducir al citocromo P450 a elevar la velocidad de su síntesis o a reducir, como en el caso del CCl_4 , su velocidad de degradación cuando se administra en forma repetida. La inducción tiene como resultado una aceleración del metabolismo y por lo general una disminución de la acción farmacológica del inductor y de los fármacos que se administran junto con él. Sin embargo, en el caso de los fármacos que se transforman por el metabolismo a intermediarios reactivos, la inducción enzimática puede exacerbar la toxicidad tisular mediada por fármacos. (Katzung, 1986). El CCl_4 es un sustrato del citocromo P450, el cual lo convierte en radicales $\text{CCl}_3\cdot$, los cuáles generan radicales $\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$ al reaccionar con oxígeno molecular. Debido a que los radicales $\text{CCl}_3\cdot$ reaccionan con las membranas e inducen peroxidación de lípidos, se ha propuesto que la principal causa de daño hepático por éste tóxico es el daño en las membranas por la cadena de reacciones de radicales libres y probablemente el evento inicial sea el daño a la membrana mitocondrial (Varela-Moreiras, et al., 1995).

6.1. Sustancias químicas

El CCl_4 utilizado fue de la compañía Merck México (Merck 1.02222.2500). El IFC-305, se preparó en el laboratorio de acuerdo a la patente UNAM 207422 y se obtuvo como un sólido blanco con las siguientes propiedades: masa molar de

400.34 g/mol, punto de fusión de 285°C, soluble en agua. (La preparación de las soluciones utilizadas en cada ensayo se enlista en el Apéndice I).

6.2. Tratamiento de animales e inducción de cirrosis con CCl₄

Se indujo cirrosis a ratas Wistar macho de 100-110 g a través del tratamiento crónico con CCl₄. Se les administró a los animales una solución de CCl₄ (CCl₄:aceite vegetal 1:6) por vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 0.4 g/kg de peso, tres veces por semana durante 10 semanas. Las ratas cirróticas se dividieron en cinco grupos (Figura 17) para evaluar el efecto del IFC-305. Los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico y se recuperó el hígado, se fraccionó y fue congelado en nitrógeno líquido y preservado a -70°C. Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las guías institucionales de uso y manejo de animales de laboratorio.

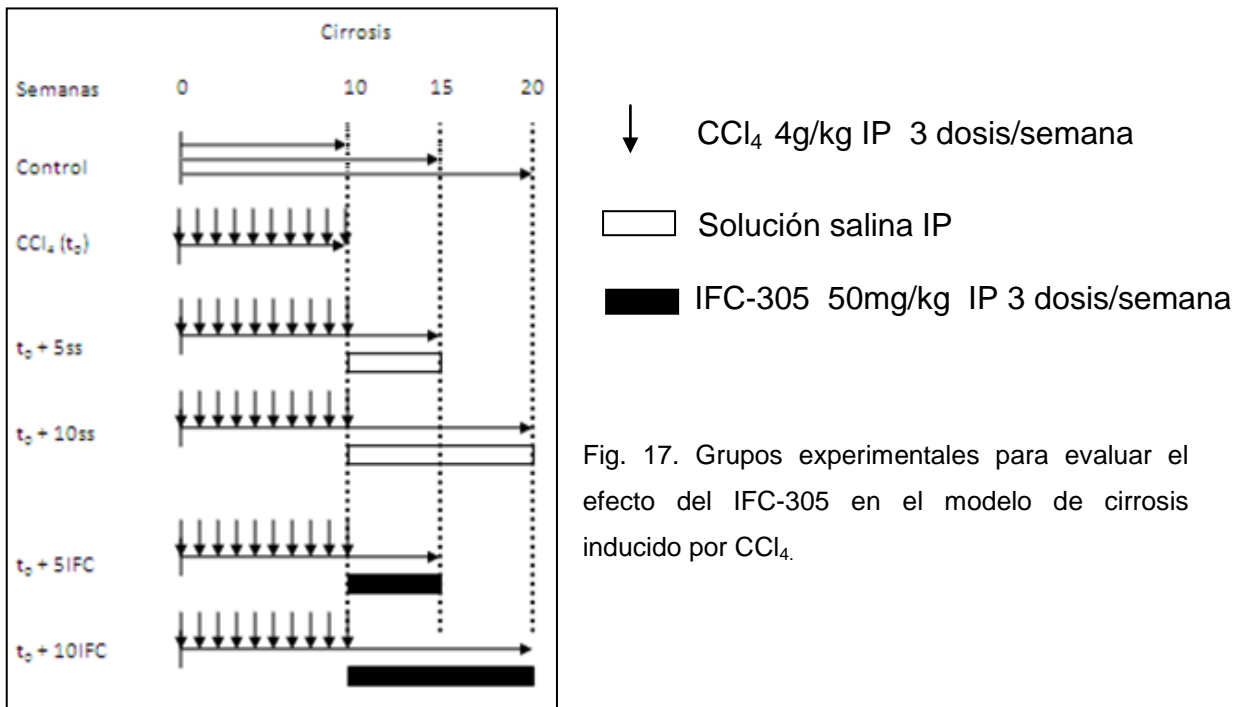


Fig. 17. Grupos experimentales para evaluar el efecto del IFC-305 en el modelo de cirrosis inducido por CCl₄.

6.3. Extracción de ADN genómico

Objetivo: Obtener ADN genómico suficiente, con una calidad y pureza adecuadas para realizar la evaluación de la metilación global en los estados del modelo de cirrosis inducida con CCl₄.

El ADN puede ser extraído de muchos tipos de materiales biológicos (sangre, tejido, hueso, diente, líquido amniótico, etc.), en este caso se utilizó hígado de rata del modelo de cirrosis estudiado; el éxito del análisis molecular depende del adecuado aislamiento en términos de cantidad, calidad y pureza; es necesario separar el ADN del resto de los componentes celulares así como del material no biológico que pueda estar presente. Los protocolos de extracción buscan, en general, eliminar o diluir potentes inhibidores de reacciones de amplificación (grupos hemo, ADNasas, ARNasas, cristales, etc.) que eviten o dificulten análisis posteriores. Idealmente los procesos de aislamiento deben ser rápidos y fáciles de realizar, garantizando la obtención de material genético y sacrificando el rendimiento (Fonseca, et al., 2010).

El proceso general de aislamiento involucra tres pasos: primero, la lisis de las membranas celulares; segundo, la degradación de las proteínas; tercero, la extracción de ADN y finalmente su precipitación y recuperación (Fonseca, et al., 2010).

El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de reparación de ADN genómico a partir de tejido de mamífero con Fenol-Cloroformo-Isoamílico (Strauss, 2001). Se pesaron 200 mg de hígado de ratas cirróticas de los diferentes grupos experimentales (Figura 17) y se homogenizaron en 750 µL de PBS 1x en un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón estéril previamente enfriados a 4°C por 30 min. El homogenado se dividió en 2 volúmenes de 375 µL, cada uno de los cuales se llevó a un volumen de 1 mL con amortiguador de digestión en tubo Eppendorf® y se incubaron de 12-18h a 50°C en agitación. Se adicionó a cada tubo 5 µL de RNasa 10 mg/mL y se incubaron por 3 h a 37°C. El contenido de

cada tubo se dividió en volúmenes de 500µL y se añadió a cada uno un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) (Invitrogen™ 15593-049), los tubos se colocaron en vortex por 30 s y se centrifugaron a 14000rpm por 20min a 4°C. El sobrenadante de cada tubo se transfirió a un nuevo Eppendorf® y se le agregaron 50 µL de acetato de amonio 3 M pH 5.3 y 1 mL de etanol absoluto a -20°C y se mezcló. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% a -20°C. Se centrifugó de 2-5 min a 14000 rpm a 4°C y se resuspendió el botón en 50 µL de agua milli Q®. Se cuantificó el ADN genómico en Nanodrop® y se realizó una electroforesis con 5 µg de cada muestra en un gel de agarosa al 0.8% para verificar la integridad del ADN genómico.

6.4. Evaluación de la metilación global del ADN genómico

6.4.1. Evaluación cualitativa de la metilación de ADN genómico con enzimas de restricción

Objetivo: Determinar de manera cualitativa las diferencias en el patrón de metilación de ADN genómico a lo largo del modelo de cirrosis estudiado, utilizando enzimas metilosensibles.

La digestión del ADN por la endonucleasa *HpaII* no ocurre si un grupo 5-metilo se encuentra en el residuo C interno de su secuencia de reconocimiento CCGG. *MspI*, un isoesquizómero de *HpaII*, digiere al ADN independientemente de la presencia del grupo metilo en la posición antes mencionada. El utilizar ambas enzimas, hace posible el estudio de la metilación del ADN en los sitios de reconocimiento de las endonucleasas en muestras de ADN de organismos superiores (Waalwijk y Flavell, 1978).

Tabla 5. Enzimas de restricción utilizadas en la determinación cualitativa de la metilación global de ADN genómico

Enzima de Restricción	Datos
<i>MspI</i>	New England Biolabs® Inc. R0106L
<i>HpaII</i>	New England Biolabs® Inc. R0171M

Se realizaron digestiones genómicas con 20 µg de ADN genómico de muestras de hígado de ratas del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ (Figura 17) con 100 U de enzimas *MspI* y *HpaII*. Se incubaron a 37°C durante toda la noche. Se agregaron 11 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 300 µL de etanol absoluto a cada tubo y se dejaron precipitando toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4°C y se lavó el botón con 500 µL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente en las condiciones mencionadas y se resuspendió el botón en 15 µL de agua milli Q®. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se compararon los resultados de los controles contra los tratamientos con CCl₄ e IFC-305. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb *plus DNA ladder* (Invitrogen™ 859925)

6.4.2. Evaluación cuantitativa de la metilación global de ADN genómico con el *Kit Imprint Methylated DNA Quantification*

Objetivo: Cuantificar los niveles de metilación global de ADN genómico en los diferentes estados del modelo de cirrosis inducida con CCl₄, utilizando un kit basado en el ensayo de ELISA que utiliza un anticuerpo anti- 5-metilcitosina.

El ensayo en el que se basa este *kit* es la prueba de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), cuyo principio es el siguiente: Para detectar el antígeno, en éste caso la 5-metilcitosina, el anticuerpo purificado específico para el antígeno se enlaza químicamente a una enzima. Las muestras que se van a probar se colocan en recipientes de plástico a los cuales se unen de manera inespecífica; los sitios de unión residuales sobre el plástico se bloquean al añadir proteínas que no son

de interés para el análisis. A continuación se añade el anticuerpo marcado a los recipientes en condiciones a las cuales se evita unión inespecífica, de modo que solo la unión al antígeno de interés haga que el anticuerpo marcado se retenga sobre la superficie. El anticuerpo marcado no unido se elimina de todos los recipientes por medio de lavado, y el anticuerpo unido se detecta por medio de una reacción colorimétrica dependiente de enzima. Este análisis permite que las placas de plástico se lean en espectrofotómetros multicanal lo que acelera el análisis (Murphy, et al., 2008). En algunos casos, como en el ensayo utilizado para la determinación cuantitativa de los niveles de metilación en el ADN genómico, la enzima se une a un anticuerpo secundario, que reconocerá el anticuerpo unido al antígeno de interés.

Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante del kit (Sigma® MDQ1), realizando una curva estándar con 0, 25, 50 75 y 100ng de ADN metilado para posteriormente interpolar las absorbancias obtenidas en las muestras del modelo de cirrosis inducida con CCl₄. Se analizaron 100 ng de ADN.

Procedimiento

- **Unión del ADN al pozo**

1. Se agregaron a cada pozo 100 µg de ADN diluido en solución de unión a ADN. Se aseguró de que la solución cubriera el fondo del pozo inclinando la placa de un lado a otro. La solución de unión a ADN (sin ADN) se utilizaró como blanco.
2. Se cubrió e incubó a 37°C por 60 min.
3. Se agregaron 150 µL de solución de bloqueo directamente a cada pozo.
4. Se cubrió e incubó a 37°C por 30 min.
5. Se removió el ADN y la solución de bloqueo de cada pozo.
6. Se lavó tres veces con 150 µL de amortiguador de lavado 1x.

- **Captura de ADN metilado**

7. Se diluyó el anticuerpo de captura 1:1000 en amortiguador de lavado 1x.
8. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo de captura diluido a cada pozo.
9. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente por 60 min.
10. Se remover el anticuerpo de captura diluido del pozo.
11. Se lavó cuatro veces con 150 μ L de amortiguador de lavado 1x.
12. Se diluyó el anticuerpo de detección 1:1000 en amortiguador de lavado 1x.
13. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo de detección diluido a cada pozo.
14. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente por 30 min.
15. Se removió el anticuerpo de detección del pozo.
16. Se lavó cinco veces con 150 μ L de amortiguador de lavado 1x.

- **Detección**

17. Se agregaron 100 μ L de solución reveladora a cada pozo.
18. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente alejado de la luz por 1-10 min. Se monitoreó la reacción por el cambio de color. La solución viró a azul.
19. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de 96 pozos.
20. Se calcularon los niveles de metilación global relativa.

6.5. Estudio de las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor de *Pparg*

Objetivo: Determinar las modificaciones post-traduccionales de histonas, asociadas a cromatina transcripcionalmente activa o inactiva, presentes en el promotor del gen *Pparg* a lo largo del modelo de cirrosis estudiado.

La especificidad de secuencia en la unión de las proteínas al DNA es esencial para la correcta expresión de genes. En el caso de los eucariotas, los cromosomas están organizados en la cromatina, cuya unidad fundamental, el nucleosoma, contiene ADN enrollado alrededor de las histonas. La modificación post-traduccional de las histonas a menudo dicta qué proteínas se unen y en dónde. La importancia de las interacciones proteína-ADN ha llevado al desarrollo de diversas tecnologías que facilitan el aislamiento de regiones específicas de la cromatina, de modo que el ADN y sus proteínas asociadas pueden ser analizadas conjuntamente. El método más utilizado es la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), que consiste en tratar, en este caso el tejido, con una sustancia como el formaldehído, que hace que las proteínas y el ADN se unan entre sí (entrecruzamiento). De éste modo, las proteínas que están unidas al ADN durante el aislamiento de cromatina permanecen unidas a lo largo de los tratamientos sucesivos. El siguiente paso consiste en romper la cromatina en trozos pequeños. Para separar el fragmento que contiene el complejo proteína/ADN del resto, se aísla con un anticuerpo que reaccione específicamente con la proteína de interés de modo que se forme un inmunoprecipitado que pueda ser purificado. Entonces, proteína y ADN se pueden analizar separadamente después de que la interconexión sea revertida (Griffiths, et al., 2008). El ADN unido por la proteína se puede amplificar en muchas copias a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y analizar en un gel de agarosa.

Se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) de muestras de tejido de ratas cirróticas y de tejido de ratas a las que se administró solución salina o IFC-305 durante 5 o 10 semanas posteriores a la inducción de cirrosis; las abundancias relativas se determinaron por PCR, evaluando zonas cerradas y abiertas del promotor del gen *Pparg*. El ensayo ChIP se realizó con 400mg de tejido hepático de los diferentes estados del modelo de cirrosis, que fueron tratados de acuerdo al protocolo de Farhham (Farnham, 2006) con modificaciones del Dr. Carlos Guerrero Hernández en cuanto a los tiempos y número de pulsos de sonicación, cantidad de anticuerpo y tiempos de incubación (Comunicación

personal). Los anticuerpos utilizados para este ensayo así como los oligonucleótidos para la PCR se enlistan en las tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en el ensayo ChIP

Anticuerpo	Marca y catálogo
Antipollo-HRP	Abcam® AB6877
Antitrimetil histona H3 (Lys 4)*	Millipore® 92590
Antihistona H4 hiperacetilada (penta)	Millipore® 06946
Antifosfo (Ser 10) acetil (Lys 14)	Millipore® 07081
Antitrimetil histona H3 (Lys 9)**	Millipore® 051242
Anti-histona H4 (K20 trimetilada)	Abcam® AB9053
Anti-histona H4 (K27 trimetilada)	Abcam® AB6002

*Utilizado en los ensayos donde se analizaron las muestras de 5 semanas después del estado cirrótico. **Utilizado en los ensayos donde se analizaron las muestras de 10 semanas después de la inducción de cirrosis.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la PCR de la zona P del promotor de *Pparg* (Mann, et al., 2010)

Sentido	5'-ttccaagtcctttccacac-3'
Antisentido	5'-gagaggcatggtctctctgg-3

NOTA: El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 230pb

6.6. Determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado

Objetivo: Identificar los niveles de expresión de proteínas que participan en el proceso fibrogénico en los diferentes estados del modelo de inducción de cirrosis con CCl₄.

Las proteínas usualmente poseen cargas netas negativas o positivas, dependiendo de la mezcla de aminoácidos cargados que contengan. Si un campo eléctrico se aplica a una solución con moléculas de proteínas, éstas migrarán en una proporción que depende de su carga neta y de su tamaño. La aplicación más utilizada y que se basa en ésta propiedad es la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS). Se utiliza como matriz inerte un gel de poliacrilamida de poro muy pequeño a través del cual las proteínas migrarán. Las proteínas se colocan en una solución con un detergente que les confiere cargas negativas, el dodecil sulfato de sodio (SDS), éste detergente se une a las regiones

hidrofóbicas de las proteínas provocando la linealización de las cadenas polipeptídicas; las proteínas son liberadas de sus asociaciones con otras proteínas o lípidos y permanecen solubles en la solución con detergente. Adicionalmente se añade un agente reductor como el β -mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro en las proteínas para que todos los polipéptidos que conforman proteínas de varias subunidades puedan analizarse independientemente (Alberts, et al., 2008).

- **Obtención de proteínas totales**

Se prepararon, de forma manual, homogenados con 100 mg de tejido de los diferentes estados del modelo de cirrosis inducida con CCl_4 (Figura 17), utilizando 1 mL de PBS 1x con inhibidores de proteasas en tubos de vidrio con homogenizador de teflón. Una vez desintegrado el tejido, se transfirió a tubos Eppendorf® de 1.5 mL, nuevos y estériles, y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugó a 14000 rpm y 4°C durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf® y se sometió nuevamente al proceso de centrifugación y se recuperó el sobrenadante en un tercer Eppendorf®. Estas muestras se almacenaron a -70°C en alícuotas de 300 μL .

- **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas, uno de los métodos colorimétricos es el método de Bradford, el cual se basa en la unión de un colorante, *Coomassie Blue G-250*, a las proteínas. El colorante en solución ácida, existe en dos formas químicas, una azul y otra naranja, las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible 1-1.5 μg , simple, rápido, barato, y pocas sustancias interfieren en la determinación, entre las que se encuentran detergentes y soluciones básicas (Fernández y Galván, 2001)

Se siguió el protocolo del ensayo estándar en placa de ELISA proporcionado por el fabricante del reactivo *Quick Start Bradford 1x Dye Reagent* (BioRad® 500-0205), para lo cual se pesaron con exactitud 2 mg de albúmina sérica bovina Fracción V (USB Corporation 10857) y se llevaron a 1 mL con PBS 1x con inhibidores de proteasas y se prepararon dos curvas estándar de proteína de la siguiente manera:

Tabla 8. Curva de proteína para el ensayo estándar en microplaca [BioRad® 500-0205]

No. Tubo	Volumen del Estándar [μL]	Fuente del estándar	Volumen de diluyente** (μL)	[Proteína] (μL/mL)
1	20	Stock 2mg/mL	0	2000
2	30	Stock 2mg/mL	10	1500
3	20	Stock 2mg/mL	20	1000
4	20	Tubo 2	20	750
5	20	Tubo 3	20	500
6	20	Tubo 5	20	250
7	20	Tubo 6	20	125
8 (Blanco*)	-	-	20	0

*El Blanco utilizado fue agua MilliQ® estéril. **El diluyente fue PBS 1x con inhibidores de proteasas
 NOTA: El fabricante refiere que la linealidad de esta curva se encuentra entre las concentraciones 125-1000 μg/mL

A continuación se describe el procedimiento utilizado.

1. Se sacó la solución *1x Dye Reagent* (BioRad® 500-0205) de su temperatura de almacenamiento (4°C) y se dejó a temperatura ambiente hasta que alcanzó el equilibrio térmico. Se mezcló el frasco para homogenizar el contenido antes de ser utilizado.
2. Se agregaron con micropipeta 5 μL de cada estándar y muestra problema en pozos independientes de la microplaca. Se agregaron 250 μL de *1x Dye Reagent* (BioRad® 500-0205) a cada pozo.
3. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Nota: Las muestras no deben ser incubadas por más de 1 h a temperatura ambiente.
4. Se leyó la absorbancia de la curva y las muestras a una longitud de onda de 595 nm.

5. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras problema, interpolando en la curva estándar.

- **Western Blot**

Para identificar una proteína específica después de la separación en SDS-PAGE se realiza la exposición de las proteínas presentes en el gel a un anticuerpo específico con una enzima fácil de detectar (Alberts, et al., 2008). Tras la electroforesis, el gel se pone en contacto con una hoja de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PDVF) y las proteínas se transfieren al papel mediante una corriente eléctrica. Las proteínas quedan unidas irreversiblemente a la hoja, con lo que las reacciones antígeno anticuerpo pueden observarse después de tratar la hoja con un anticuerpo específico para la proteína de interés (antígeno) (Mathews, et al., 2006). En seguida se agrega un anticuerpo secundario que tiene unida una enzima y que reconocerá al complejo antígeno-anticuerpo. La detección se realiza en una placa fotográfica sensible a la reacción de quimioluminiscencia que se produce al agregar el sustrato de la enzima unida al anticuerpo secundario (Mathews, et al., 2006).

Se prepararon geles de poliacrilamida-SDS al 12% así como 5 veces el volumen equivalente a la muestra con 30 µg de proteína mezclada con el amortiguador de muestra (adicionando el volumen de amortiguador de muestra para tener una concentración final 1x de dicha solución). Las muestras se colocaron a 100°C durante 5 min y posteriormente en hielo por el mismo periodo de tiempo. Se cargaron los 30µg de proteína en cada pozo del gel, así como 4 µL de marcador de peso molecular *Dual color* (BioRad 161-0374EDU). La electroforesis se realizó con amortiguador de corrida a 100 V durante aproximadamente 2 h 20 min.

Las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon®-P (Millipore IPVH00010) previamente activadas en metanol. Se utilizó amortiguador de transferencia con metanol, sin SDS y se transfirió a 100 V durante 1 h.

Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon a temperatura ambiente y en agitación con leche descremada (Difco™ 232100) al 5% disuelta en TTBS 1x durante 1 h.

La tabla 9 describe los anticuerpos primarios utilizados, así como las condiciones de incubación:

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión de proteínas anti-fibrogénicas y profibrogénicas.

Anticuerpo	Origen	Marca y número de catálogo	Condiciones de incubación
PPAR-γ	IgG Conejo Policlonal	Santa Cruz Biotechnology sc-7196	1:2000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
Colágena tipo I	IgG Cabra Policlonal	Santa Cruz Biotechnology sc-25974	1:2000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
Desmina	IgG Cabra Policlonal	Santa Cruz Biotechnology sc-7556	1:2000 Leche 5%, 4°C en agitación toda la noche
GAPDH	IgG Ratón Monoclonal	Millipore™ MAB374	1:2000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación 2 h

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se sometieron a 4 lavados de 5 min en agitación con TTBS 1x para eliminar el anticuerpo que no se unió a su antígeno blanco. En seguida se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes como lo describe la tabla 10.

Tabla 10. Anticuerpos secundarios utilizados para la determinación de la expresión de proteínas anti-fibrogénicas y profibrogénicas.

Anticuerpo	Origen	Marca	Condiciones de incubación
Anti-conejo IgG-HRP	Cabra	Santa Cruz®	1:10000 Leche 5%, temperatura ambiente en agitación 2h
Anti-ratón IgG-HRP	Cabra	Santa Cruz®	1:10000 Leche 1%, temperatura ambiente en agitación 2h
Anti-cabra IgG-HRP	Burro	Santa Cruz®	Leche 5%, temperatura ambiente en agitación 2h

Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se sometieron a lavados con TTBS 1x como ya se describió.

Para revelar se utilizó el sustrato *West Femto* (Thermo Scientific 34095), solución de revelado y fijador, así como películas fotográficas (Kodak 190 0943, 190 1875 y 604 0331).

Para remover los anticuerpos y volver a explorar la membrana (con otros anticuerpos) se lavó la membrana a temperatura ambiente y en agitación dos veces durante 15min con amortiguador de *stripping*, dos veces durante 10min con PBS 1x y una vez durante 5min con TTBS 1x seguido por el bloqueo de la membrana con leche descremada (Difco™ 232100) al 5% en TTBS 1x durante 1h.

6.7. Análisis estadístico

Todos los valores fueron expresados como el promedio \pm DEM de tres o cuatro experimentos independientes (indicado en cada pie de gráfico). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de *t student* pareada. Las diferencias con un valor de *p* por debajo de 0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

7. RESULTADOS

Como ya se mencionó en la introducción, recientemente se ha reportado que al unirse la proteína PPAR- γ en la región flanqueante 5' de $\alpha 1(I)$ protocolágena a -133pb ejerce un efecto inhibitorio en la expresión de colágena I, el cual esta mediado por la habilidad de PPAR- γ para suprimir la unión de NF- κ B y su transactivación facilitada vía la inhibición de la proteína p300 (Yavrom, Chen et al. 2005). Es por esto que en se evaluó el efecto del IFC-305 sobre las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del gen *Pparg* así como en los niveles de expresión de las proteínas PPAR- γ y colágena I en los diferentes estados del modelo de cirrosis estudiado.

Con el fin de establecer un posible mecanismo epigenético del hepatoprotector IFC-305 a lo largo de la vía de transmisión de la información genética (ADN \rightarrow ARNm \rightarrow proteína), se realizó la evaluación de la metilación global del ADN genómico, la determinación de las modificaciones post-traduccionales de histonas sobre el promotor del gen *Pparg* y el estudio los niveles de expresión de proteínas de ECM así como de la proteína PPAR- γ en un modelo de experimental de cirrosis; se trató a un grupo de ratas de acuerdo al modelo descrito en la figura 17 y se obtuvo el material biológico necesario para los ensayos de extracción de ADNg, determinación cualitativa y cuantitativa de la metilación global de ADNg, ChIP y *Western blot*.


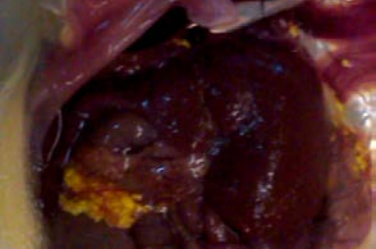

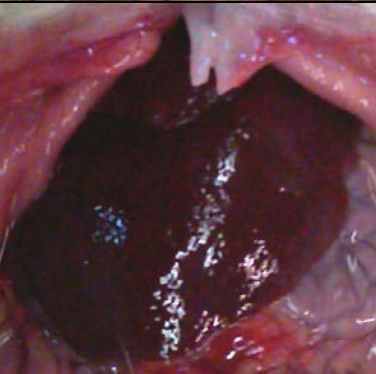
7.1. Obtención de Material Biológico

Una vez administrados los animales con IFC-305 o solución salina durante 5 o 10 semanas después de la inducción de cirrosis con CCl₄ fueron sacrificados y se disectaron para obtener el hígado.

La siguiente tabla describe las características fenotípicas de los hígados de las ratas con los diferentes tratamientos del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ y el



gráfico 1 muestra el tamaño de los hígados a lo largo de dicho modelo, los porcentajes fueron calculados dividiendo la masa del hígado [g] entre la masa total de la rata [g].

Tabla 11. Características fenotípicas del hígado de rata de los diferentes estados del modelo de cirrosis inducida con CCl₄

Tratamiento	Descripción	Imagen
Control	<p><u>Masa rata:</u> 388.67g <u>Masa hígado:</u> 15.54g Tamaño hígado: 4.00% ± 0.68 Color hígado: pardo rojizo, brillante Textura hígado: lisa</p>	
CCl ₄ (to)	<p><u>Masa rata:</u> 417.00g <u>Masa hígado:</u> 24.03g Tamaño hígado: 5.77% ± 0.32 Color hígado: pardo oscuro Textura hígado: granular +++ Con depósitos de bilirrubina</p>	
to + 5ss	<p><u>Masa rata:</u> 364.50g <u>Masa hígado:</u> 15.61g Tamaño hígado: 4.32% ± 0.70 Color hígado: pardo oscuro Textura hígado: granular ++</p>	
to + 5IFC	<p><u>Masa rata:</u> 343.00g <u>Masa hígado:</u> 13.80g Tamaño hígado: 4.03% ± 0.38 Color hígado: Pardo oscuro Textura hígado: granular +</p>	

Continúa tabla 11

Continúa tabla 11

Tratamiento	Descripción	Imagen
to + 10ss	<p><u>Masa rata:</u> 410.90g <u>Masa hígado:</u> 17.02g Tamaño hígado: 4.14% ± 0.27 Color hígado: Pardo claro Textura hígado: granular +</p>	
to + 10IFC	<p><u>Masa rata:</u> 407.00g <u>Masa hígado:</u> 17.35g Tamaño hígado: 4.27% ± 0.29 Color hígado: Pardo oscuro Textura hígado: lisa</p>	

Las líneas sobre la masa indican que el valor es el promedio. Las cruces (+) son directamente proporcionales a la magnitud observada. Cada imagen es representativa del tratamiento (n=3) correspondiente.

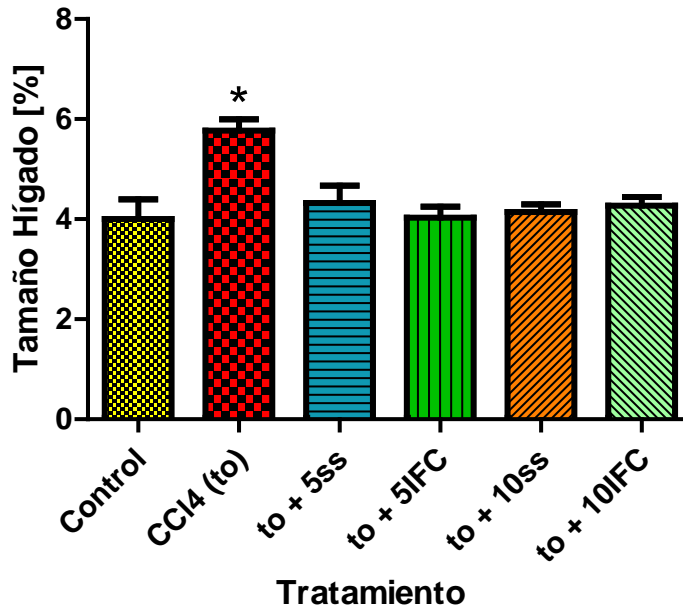


Gráfico 1: Tamaño del hígado de las ratas con los diferentes tratamientos del modelo de cirrosis inducida con CCl₄. Los porcentajes fueron calculados dividiendo la masa del hígado [g] entre la masa total de la rata [g] y están expresados como el valor promedio ± DEM de 3 ratas/grupo. *P<0.05 comparado contra el control. NOTA: los datos de masa para trazar el gráfico fueron proporcionados por la M. en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca

7.2. Extracción de ADN genómico

Se estandarizó la técnica de extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo de Strauss, 2001, lo que permitió obtener muestras de ADN con una integridad adecuada, pureza elevada con una relación 260/280nm superior a 1.8 (Gráfico 2), así como una concentración de ADN en un orden de magnitud entre 1800-4800ng/μL (Gráfico 3).

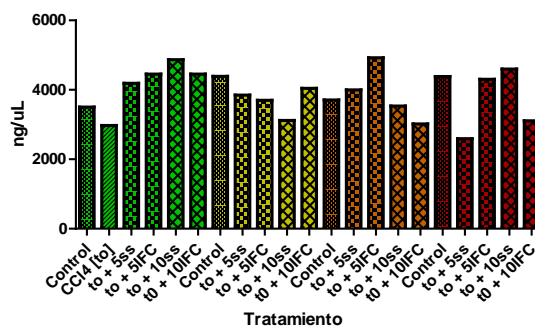
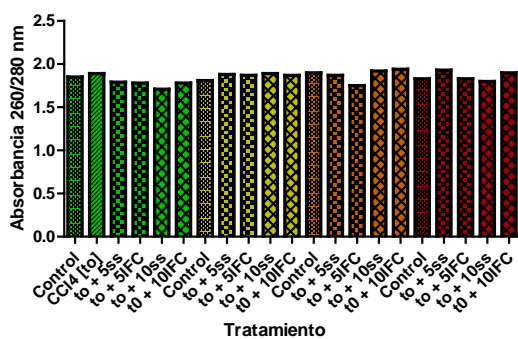


Gráfico 2 (izquierda) Pureza del ADN genómico. Gráfico 3 (derecha) Concentración de ADN genómico. Se muestran 4 grupos de muestras representativas del modelo de cirrosis. Estos parámetros fueron determinados espectrofotométricamente en Nanodrop®

La integridad del ADN genómico se verificó cargando 5μg de cada muestra extraída en un gel de agarosa al 0.8%. Como se observa en la figura 18, la mayor parte del ADN genómico se encuentra por arriba de las 12kb, lo que indica que no se encuentra degradado.

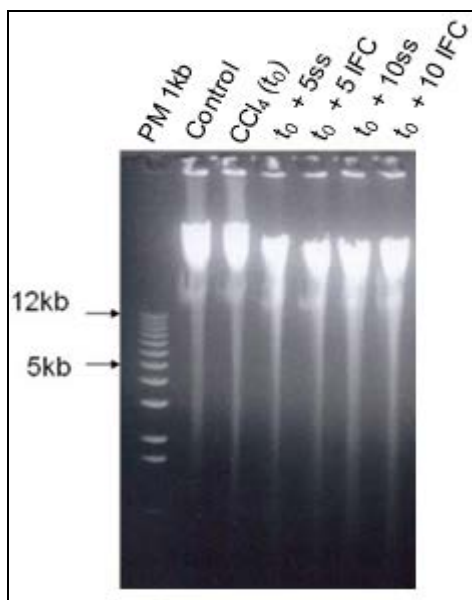


Fig. 18. Integridad del ADN genómico. La figura muestra un gel de agarosa al 0.8% representativo donde se cargaron 5µg de ADN genómico de cada estado del modelo de cirrosis. PM: marcador de peso molecular 1kb plus ADN ladder (Invitrogen™ 859925)

7.3. Evaluación de la metilación global del ADN genómico

7.3.1. Evaluación cualitativa de la metilación del ADN genómico con enzimas de restricción

En el ensayo se utilizaron dos enzimas de digestión: *HpaII* y *MspI* que son isoesquizómeros, las cuales reconocen la misma secuencia de ADN (5'... CCGG... 3'). Al comparar las muestras de ADN genómico antes de la restricción enzimática (Figura 18) con las muestras digeridas con *MspI* (Figura 19 y 20) se observa que el ADN genómico de las muestras analizadas es sensible al corte por dicha enzima generando un patrón de bandas alto, corroborando que *MspI* es capaz de reconocer sitios de corte dentro del ADN genómico independientemente de la metilación; esta enzima fue utilizada como control de digestión de ADN genómico. La enzima *HpaII* nos permitió poner en evidencia los cambios en el grado de metilación del ADN genómico con los diferentes tratamientos del modelo de cirrosis inducida con CCl₄. En este punto es

importante mencionar que los resultados de éste ensayo únicamente contemplan a las citosinas metiladas de los dinucleótidos CpG que se encuentran en el contexto de la secuencia de reconocimiento de las enzimas, es decir, que las CpGs metiladas que se encuentren en secuencias flanqueadas por bases nitrogenadas diferentes al sitio de corte no serán detectadas por este ensayo.

El ADN genómico (ADNg) del hígado control se encuentra metilado lo cual es evidente por la cantidad que de bandas de ADN que se observa por arriba de las 12 kb en la muestra digerida con *HpaII* (Figura 19 y 20: Control); por su parte, en el tejido cirrótico (Figura 19: CCl₄ (to)) fue sujeto a una mayor digestión de ADNg por *HpaII*, lo que indica una disminución en el grado de metilación, este efecto es similar al de la muestra tratada con solución salina durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis (Figura 19 y 20: to + 5ss). En el hígado de la rata cirrótica tratada con el hepatoprotector IFC-305 durante 5 semanas (Figura 19 y 20: to + 5IFC) se produce una reducción menor en la intensidad de la banda de ADN por arriba de los 12 kb indicativo de una recuperación en el grado de metilación del ADNg si se compara contra el tratamiento con solución salina durante el mismo periodo de tiempo (Figura 19 y 20: to + 5ss). En cuanto a los tratamientos de 10 semanas posteriores al estado cirrótico, con solución salina (Figura 19 y 20: to + 10ss) es posible ver que hay una recuperación del grado de metilación de ADNg ya que hubo una menor digestión de éste por la enzima *HpaII*, sin embargo en el caso de la administración de IFC-305 se observa una mayor proporción de ADNg metilado en comparación con su homólogo de solución salina.

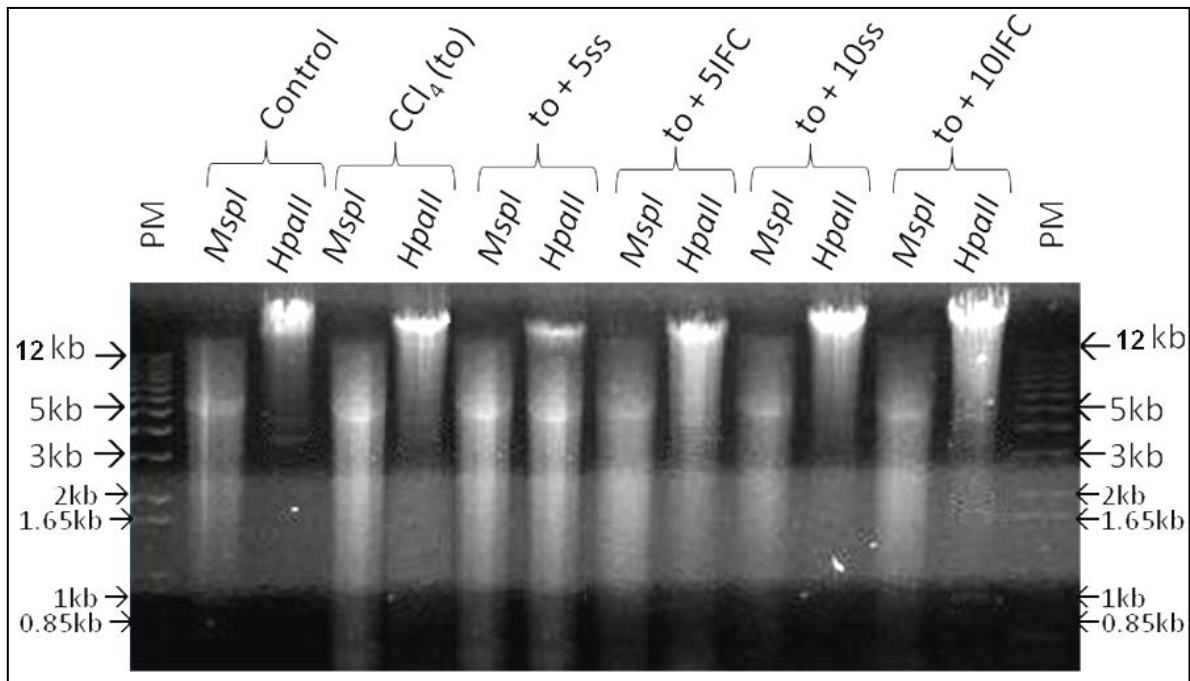


Fig. 19. ADNs genómicos del modelo de Cirrosis inducida con CCl_4 digeridos con las enzimas *MspI* y *HpaII*. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8% con 20 μg de ADN g por pozo y se utilizó el marcador de peso molecular 1kb plus Invitrogen®. La imagen muestra un gel representativo de la digestión enzimática (n=3 ratas/grupo).

Por otra parte, analizando el número e intensidad de las bandas producidas por las enzimas de restricción (Figura 20) encontramos que las muestras digeridas con la enzima *HpaII*, produce 2 bandas entre 3000-5000 pb que se encontraron en todos los estados del modelo de cirrosis inducido con CCl_4 y dos grupos de tres y dos bandas entre 1650-2000 pb y 850-1000 pb respectivamente en el ADN g correspondiente al hígado de rata cirrótica tratada con IFC-305 por 10 semanas.

La tabla 12 resume las modificaciones que sugerimos ocurren a través del análisis de las digestiones enzimáticas en los niveles de metilación de ADN g durante la cirrosis inducida con CCl_4 , así como el efecto del IFC-305 en dicho nivel epigenético. Los resultados sugieren que el nivel de metilación podría ser similar entre el tejido cirrótico tratado con IFC durante 10 semanas y el control, aunque no el mismo ya que aparecen nuevos productos de restricción.

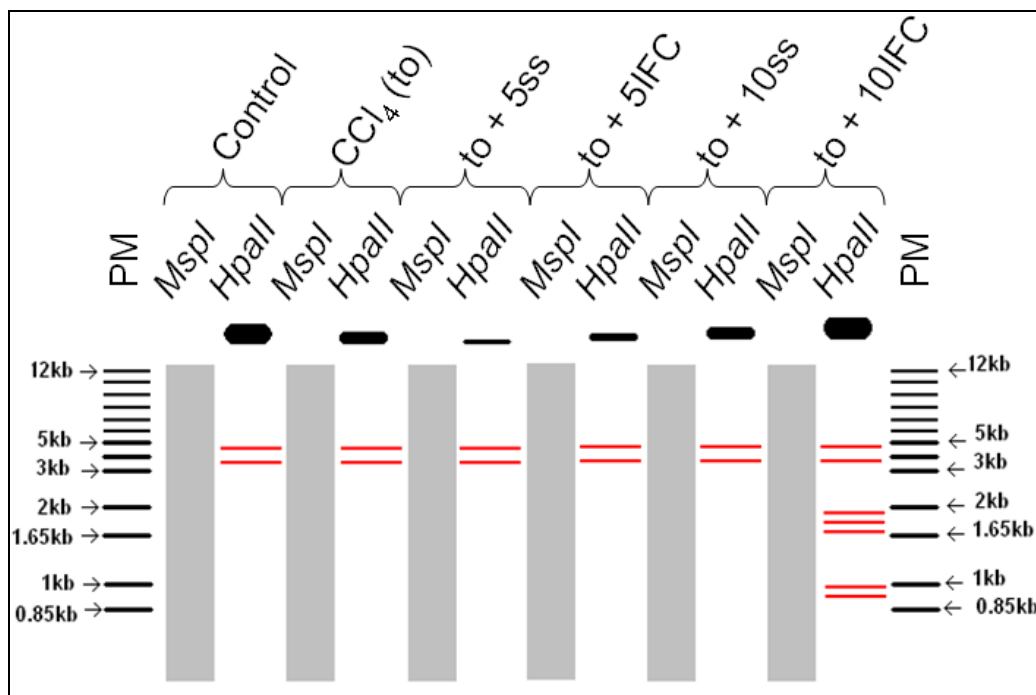


Fig. 20. Representación esquemática de ADN genómico del modelo de cirrosis inducida con CCl_4 digeridos con las enzimas *MspI* y *HpaII*. Se realizó la representación a partir del gel que se encuentra en la figura 19. Las bandas negras en los carriles digeridos con la enzima *HpaII* representan el ADN genómico metilado; Las barras grises representan la digestión del ADN genómico con la enzima *MspI*; Las bandas rojas representan el patrón de bandas encontrado en las muestras digeridas con la enzima *HpaII* al observar el gel directamente al transiluminador.

Tabla 12. Evaluación de la Metilación de ADN genómico con las endonucleasas *MspI* y *HpaII*.

Tratamiento	Intensidad de la banda de ADN genómico digerido con <i>HpaII</i> * por arriba de 12 kb	Patrón de bandas en digestión con la endonucleasa <i>HpaII</i> **		
		Peso Molecular [kb]		
		3.0-5.0	1.6-2.0	0.8-1.0
Control	++++	++		
CCl_4 (to)	++	++		
to + 5ss	+	++		
to + 5IFC	+++	++		
to + 10ss	+++	++		
to + 10IFC	++++	++	+++	++

*Las cruces son directamente proporcionales al ADN genómico no digerido con la endonucleasa *HpaII*, a mayor número de cruces, menor accesibilidad al corte por esta enzima (mayor heterocromatinización). ** Las cruces indican el número de bandas observadas en muestras digeridas con la enzima *HpaII*.

7.3.2. Evaluación cuantitativa de la metilación global del ADN genómico con con el *Kit Imprint Methylated DNA Quantification*

Se verificó la integridad del ADNg antes de realizar el ensayo de detección de la metilación del ADNg (Figura 21). Como se observa, la mayor parte del ADN genómico se encuentra por arriba de las 12kb, lo que indica que su integridad es adecuada.

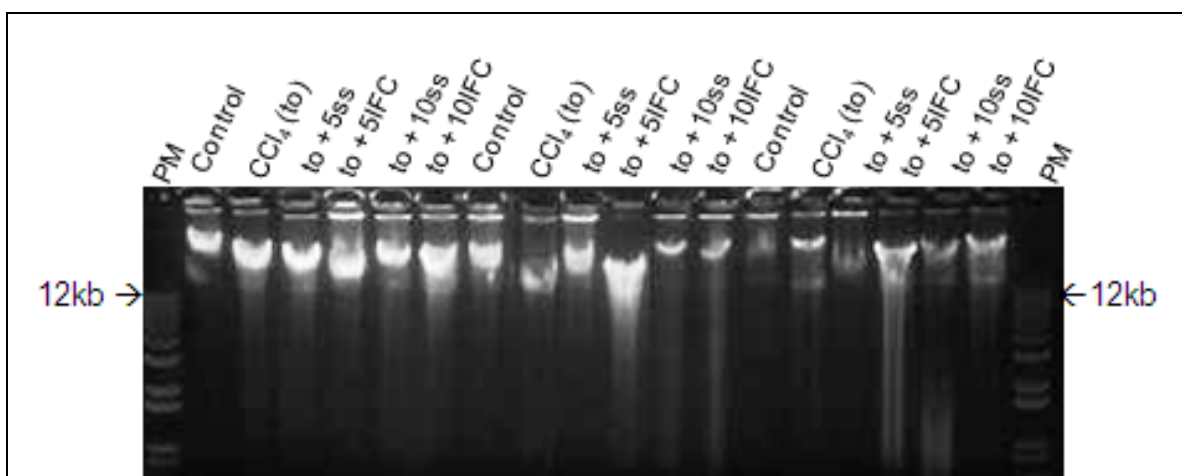


Figura 21. Integridad de las muestras de ADN genómico utilizadas para el ensayo de cuantificación de la metilación global. La figura muestra un gel de agarosa al 0.8% donde se cargaron 5 μ g de ADN genómico. PM: marcador de peso molecular 1kb plus ADN ladder (InvitrogenTM 859925)

Se realizó una curva de ADN metilado, a partir del estándar metilado que proporciona el kit, se obtuvo una pendiente de 0.0105 ng⁻¹, una ordenada al origen de 0.0423 y un coeficiente de correlación de 0.9782. (Gráfico 4).

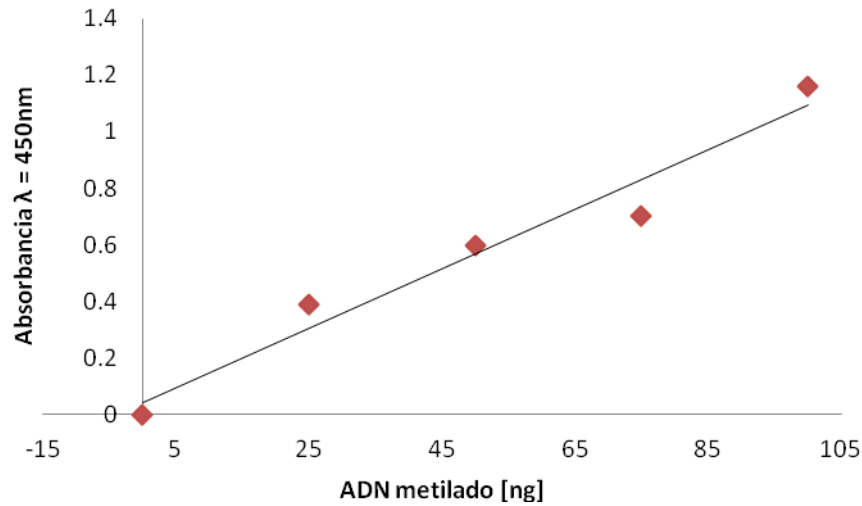


Gráfico 4: Curva estándar de ADN metilado usando el *Kit Imprint Methylated DNA Quantification*.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que los tratamientos con IFC-305 tanto en 5 como en 10 semanas posteriores a la inducción de cirrosis provocan un aumento global en la cantidad de ADNg metilado (Gráfico 5).

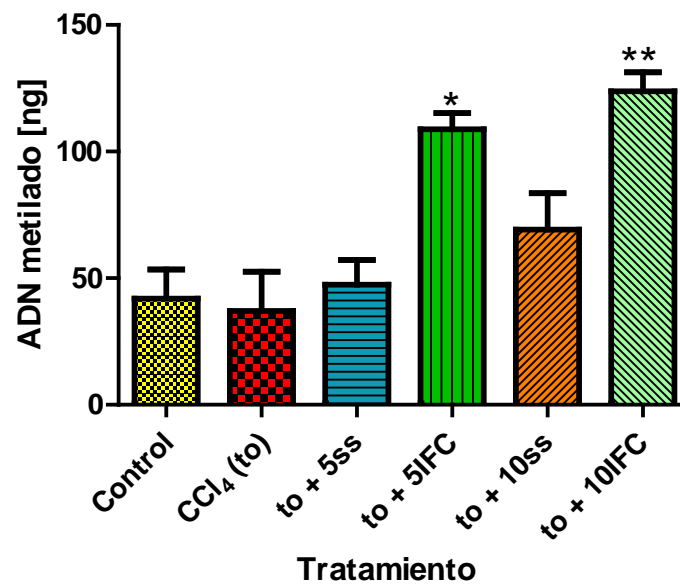


Gráfico 5. Cuantificación de la metilación global de ADN genómico en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄. Se muestra el promedio de los datos \pm DEM de 3 ratas/grupo. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra los grupos Control, CCl₄ y to + 5ss. **Diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se compara con los grupos Control, CCl₄ y to + 10ss.

7.4. Estudio de las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor del gen *Pparg*

Varios grupos de investigación alrededor del mundo se encuentran estudiando la regulación a nivel molecular del gen *Pparg* en el proceso de daño hepático. Uno de estos grupos es el de Mann y colaboradores (Mann, et al., 2010), quienes estudiaron nueve zonas en el gen de *Pparg* (Figura 22) a través de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), caracterizando marcas epigenéticas de represión presentes durante el proceso de activación de células estelares hepáticas a miofibroblastos.

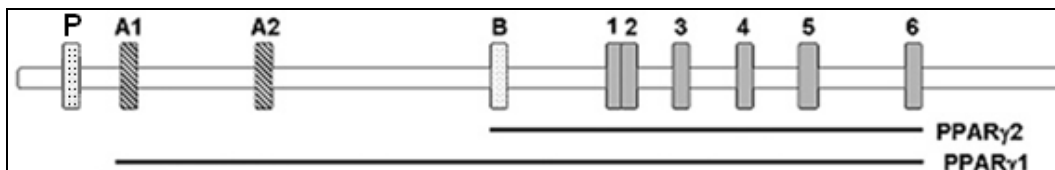


Fig. 22. Estructura del gen *Pparg*: Está compuesta por 9 exones en total, Los exones A1 y A2 se encuentran únicamente en PPAR- γ 1, mientras que el exón B se encuentra únicamente en el transcrito de PPAR- γ 2 (Modificado de Mann, et al., 2010).

Un control para éste ensayo es que los fragmentos de cromatina después de la sonicación el tejido, se encuentren entre 500-1000 pb, por lo que se verificó que los fragmentos cumplieran con esta especificación cargando 30 uL del volumen del sonicado en un gel de agarosa al 1% (Figura 23).

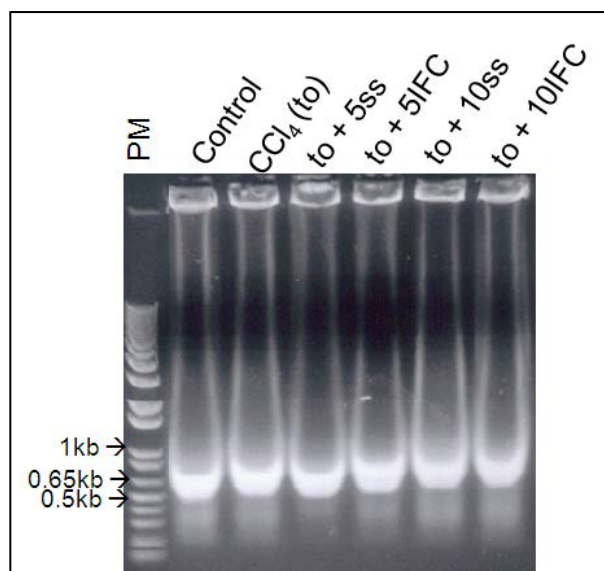


Fig. 23. Fragmentos de cromatina obtenidos después de sonicar. La figura muestra un gel de agarosa al 1% representativo donde se cargaron 30uL de cromatina.

Tomando en cuenta los datos reportados por el grupo de Mann sobre posibles modificaciones epigenéticas en el gen de *Pparg*, se decidió estudiar la zona P (230pb) reportada por dicho grupo (Figura 23) en nuestro modelo para evaluar el efecto antifibrogénico del IFC-305 *in vivo*; se realizó el ensayo de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), que evalúa la presencia de modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a una secuencia de ADN (en este caso al promotor de *Pparg*) en los diferentes estados del modelo de cirrosis estudiado.

Se utilizaron anticuerpos que reconocen la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4Me3), hiperacetilación de la histona H4 (H4 hiperAc) y fosforilación de la serina 10 y acetilación de la lisina 14 de la histona H3 (H3K14AcS10P), marcas asociadas a promotores activos y a una cromatina laxa. Por otra parte se utilizaron anticuerpos que reconocen la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9Me3), la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20Me3) y la

trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Me3) que corresponden a marcas en las histonas asociadas con una estructura de cromatina cerrada. Los *inputs* de cada estado (controles positivos: cromatina total a la que no se sometió al proceso de inmunoprecipitación) se cuantificaron en nanodrop® y se cargó el volumen equivalente a 5 µg de ADN de los controles positivos y 5 µL de las muestras problema para determinar de manera cualitativa la presencia o ausencia de cada marca en las inmunoprecipitaciones. Los controles negativos fueron cromatina a la que no se le agregó anticuerpo y se sometió al proceso de inmunoprecipitación (sin Ac) y cromatina a la que se trató con un anticuerpo no relacionado, antipollo-HRP (Ac NR) durante el proceso de ChIP.

Los resultados obtenidos hasta el momento de los ensayos ChIP, han demostrado que las marcas epigenéticas presentes en el promotor de *Pparg* en el tejido control (Figura 24A) son: tres de activación (H3K4Me3, H4 hiperAc, H3K14AcS10P) y uno de represión (H3K27Me3), por su parte en los tejidos cirróticos (Figura 24B) las marcas epigenéticas son de represión (H4K20Me3 y H3K27Me3). En los tratamientos durante 5 semanas posteriores a la inducción de cirrosis, los tejidos de ratas tratadas con solución salina (Figura 24C) mostraron las mismas marcas epigenéticas que las encontradas en los tejidos cirróticos, es decir, marcas asociadas a la represión del gen *Pparg*; por otra parte, se observaron marcas epigenéticas de activación (H3K4Me3 y H4 hiperAc) en los tejidos de ratas tratadas con el hepatoprotector IFC-305 (Figura 24D), mientras que las marcas de represión observadas tanto en cirrosis como en to + 5ss no se encuentran presentes.

En cuanto a la administración durante 10 semanas después del estado cirrótico, se encontró la marca epigenéticas de activación H4 hiperAc sobre el promotor del gen *Pparg* en el tratamiento con solución salina (Figura 24E) mientras que con el hepatoprotector IFC-305 (Figura 24F) se observaron tres de represión (H3K9Me3, H4K20Me3 y H3K27Me3) y una de activación (H4 hiperAc) sobre el promotor del gen estudiado.

Es importante mencionar que la marca epigenética de represión H3K9Me3, analizada en los tratamientos de 10 semanas después de la administración de CCl₄ no estuvo presente en la muestra control a diferencia de la muestra de CCl₄ que si presentó dicha marca (datos no mostrados) y que la marca de activación H3K4Me3 no se analizó en los estados de 10 semanas después de la inducción de cirrosis.

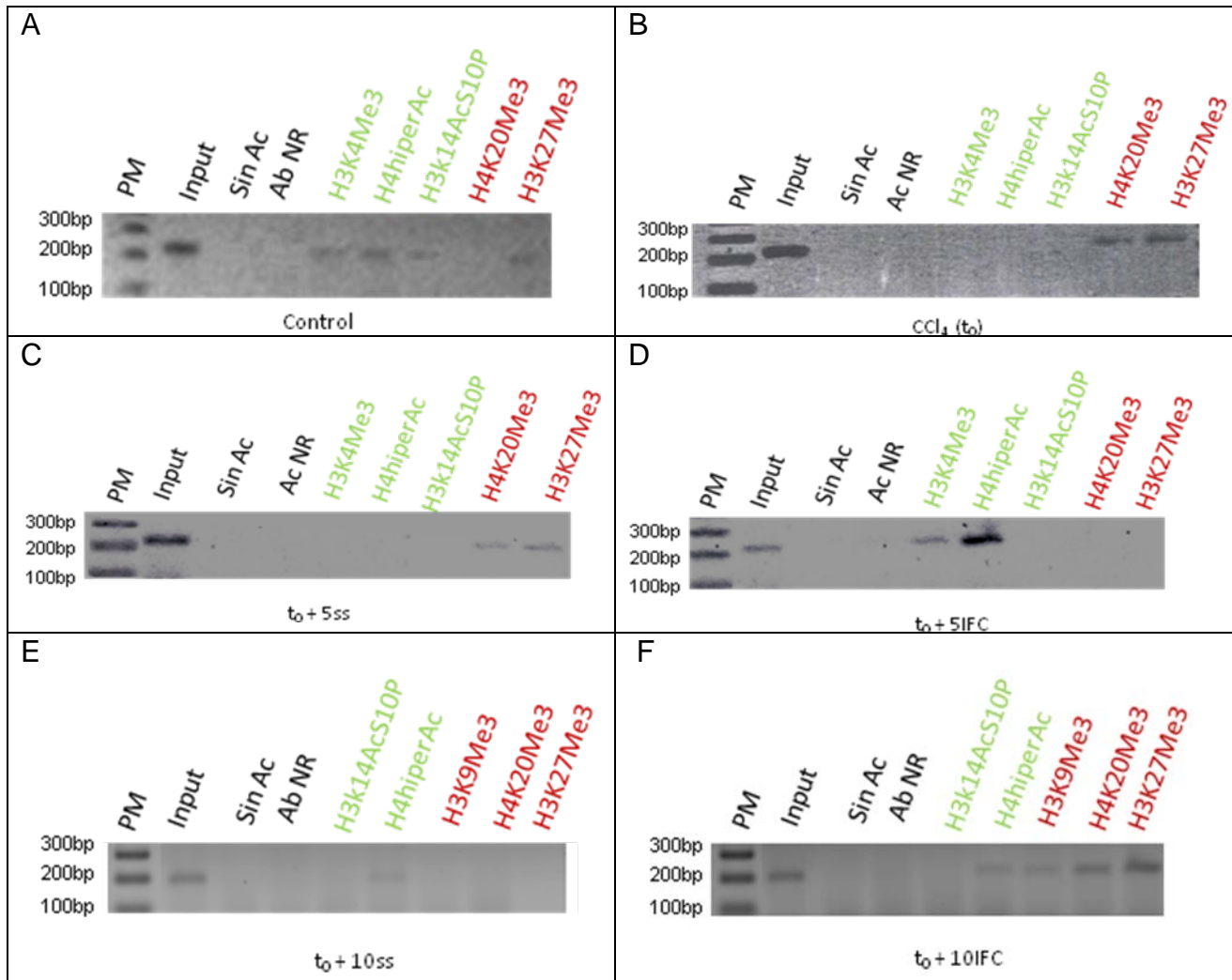


Figura 24. Modificaciones post-traduccionales de histonas sobre el promotor de *Pparg* en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄. La figura muestra geles de agarosa al 2% representativos de los productos de PCR del ADN obtenido del ensayo ChIP de los diferentes estados del modelo de cirrosis estudiado (n=3 ratas/grupo). Para la PCR del control positivo se utilizó el volumen equivalente a 100ng de ADN y de las ChIPs se utilizaron 5µL. En el gel de agarosa se cargaron los 25µL obtenidos del ensayo de PCR. Las marcas epigenéticas de activación están señaladas con verde mientras que las de represión se muestran en rojo.

7.5. Determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado

Se realizó una curva estándar de proteína, la cual obtuvo una pendiente de 0.0007mL/ μ g, una ordenada al origen de 0.4202 y un coeficiente de correlación de 0.9924 (Gráfico 6).

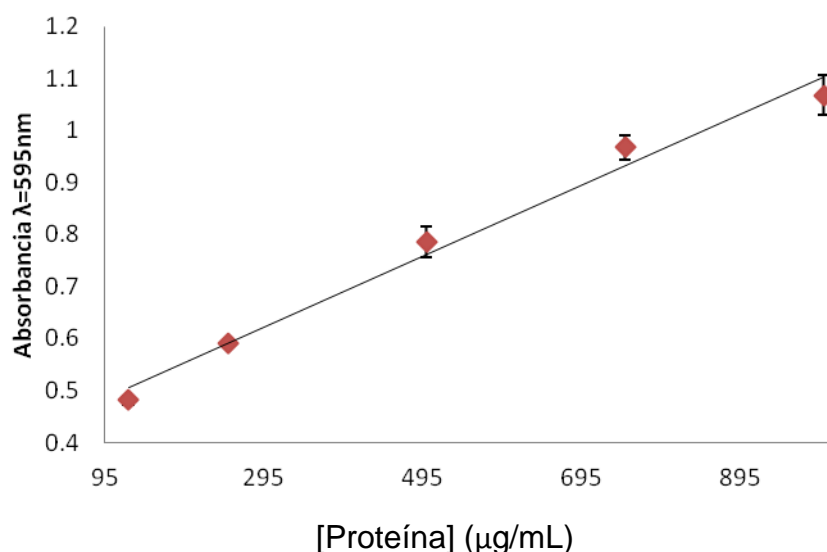


Gráfico 6. Curva estándar de proteína. Se muestra el promedio de dos curvas \pm DEM

Tomando en cuenta que los tejidos de los que se obtuvieron proteínas totales habían pasado algunos procesos de congelación y descongelación, se decidió verificar que las proteínas estuvieran en buen estado; por lo que se realizó la separación de las proteínas mediante geles de PAGE-SDS y su posterior tinción con azul de Coomassie (Figura 25). En la figura se aprecian un número similar de proteínas en cada uno de los carriles que nos indica que no hubo una degradación diferencial por parte de unos tejidos en relación a otros.

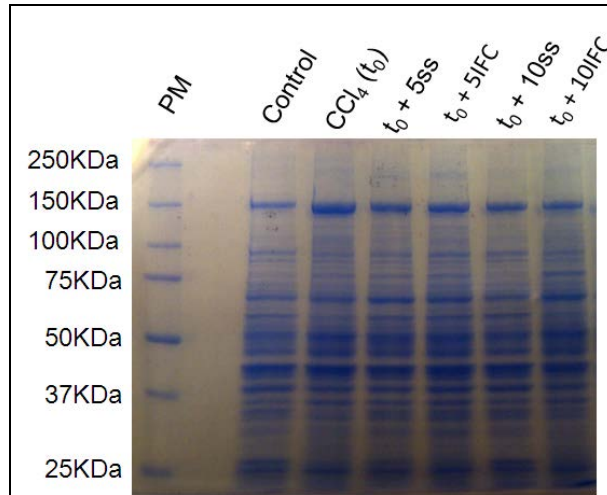


Fig. 25. Detección de las proteínas totales en gel de PAGE-SDS. La figura muestra un gel de poliacrilamida-SDS al 12% representativo, el cual se tiñó con azul de Coomassie. Se utilizaron 4 μ L del marcador de peso molecular Dual color (BioRad 161-0374EDU) y 30 μ g de proteínas totales.

Los resultados obtenidos al evaluar la expresión de proteínas en los diferentes estados del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ fueron los siguientes (Figura 26).

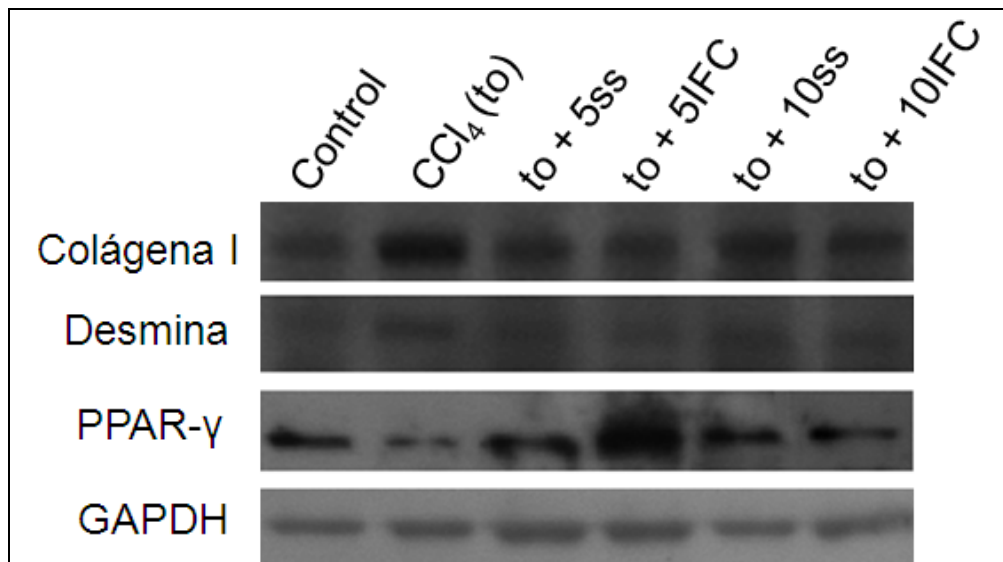


Fig. 26. Expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico en el hígado cirrótico. Se muestran *western blots* representativos de los estados del modelo de cirrosis inducida con CCl₄.

Pero para un mejor análisis de éstos datos se obtuvieron las densitometrías, por lo que se muestra el perfil densitométrico de colágena I, desmina y PPAR- γ en los gráficos 7, 8 y 9.

La proteína Colágena I (Gráfico 7) se encuentra incrementada durante el proceso cirrótico 50% con respecto al control y la proteína continúa incrementada en el tratamiento con solución salina durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis (to + 5ss); Por el contrario, al tratar con el hepatoprotector IFC-305 durante éste mismo periodo de tiempo (to + 5IFC) se observa una disminución de la expresión de ésta proteína de alrededor de 50% con respecto al estado cirrótico y de 25% comparándolo con el control. En cuanto a los tratamientos durante 10 semanas posteriores a la administración con CCl₄, el tejido adquirió un fenotipo similar al control en el caso de la administración con solución salina (to + 10ss) mientras que al tratar con IFC-305 esta proteína esta disminuida comparando contra el estado cirrótico.

La segunda proteína profibrogénica analizada fue desmina (Gráfico 8), la cual no mostró diferencias significativas en cirrosis ni en el tratamiento con solución salina durante 5 semanas después del estado cirrótico comparadas contra el tejido control, sin embargo se observa una tendencia al aumento en la cantidad de proteína; mientras que al tratar durante 5 semanas con IFC-305 después de la inducción de cirrosis se observa una disminución de alrededor de 30% con respecto al tejido sano (control). En los tratamientos de 10 semanas después de la administración de CCl₄ contrasta el incremento de 200% con respecto al control mientras que con IFC-305 la expresión de ésta proteína se mantiene en el mismo nivel que en to + 5IFC.

Por otra parte, se estudió la proteína PPAR- γ (Gráfico 9), la cual muestra una tendencia a la disminución de su expresión en el tratamiento con CCl₄ durante 10 semanas comparada con el tejido control; en la administración durante 5 semanas después de la inducción de la cirrosis, se observa una recuperación en la cantidad de ésta proteína al tratar con solución salina, mientras que con IFC-305 hay una

sobreexpresión de PPAR- γ . En los tratamientos durante 10 semanas después del estado cirrótico, es posible observar que la solución salina tiene un efecto semejante a su homólogo de 5 semanas mientras que con IFC-305 se observa una disminución del 50% comparado con el grupo control.

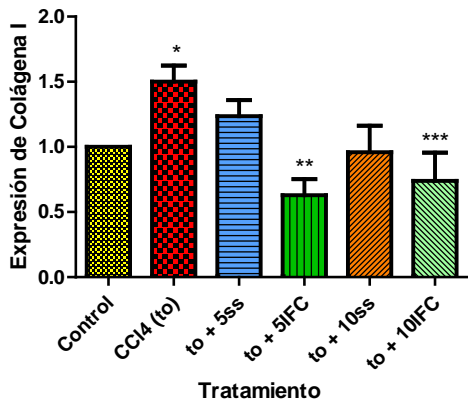


Gráfico 7. Efecto del IFC-305 sobre la expresión de la proteína Colágena I en el hígado cirrótico. Se muestra el análisis densitométrico promedio de 4 ratas/grupo \pm DEM. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo Control; ** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra los grupos Control, CCl₄ y to + 5ss; *** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo CCl₄.

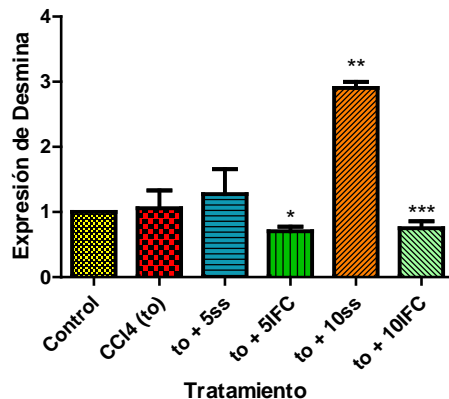


Gráfico 8. Efecto del IFC-305 sobre la expresión de la proteína Desmina en el hígado cirrótico. Se muestra el análisis densitométrico promedio de 3 ratas/grupo \pm DEM. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo Control; ** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra los grupos Control y CCl₄; *** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo to + 10ss.

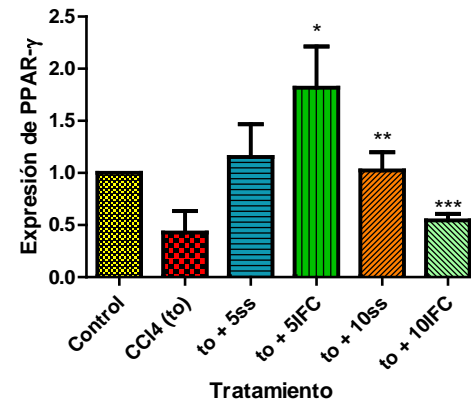


Gráfico 9. Efecto del IFC-305 sobre la expresión de la proteína PPAR- γ en el hígado cirrótico. Se muestra el análisis densitométrico promedio de 4 ratas/grupo \pm DEM. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo CCl₄ y to + 5ss; ** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo CCl₄; *** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra los grupos Control y to + 10ss.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La habilidad de la célula para mantener un alto grado de orden en un universo caótico depende de la información genética que se expresa, mantiene, replica y ocasionalmente mejora a través del proceso genético básico (Figura 27); el ADN en el genoma no dirige directamente la síntesis de proteínas por si mismo, utiliza un intermediario de ARN. Cuando la célula necesita una proteína en específico, una secuencia de nucleótidos de una porción apropiada de la gigantesca molécula de ADN en un cromosoma es copiada primero a ARN (un proceso llamado transcripción) (Figura 27), son estas copias de ARN las que son utilizadas como molde para dirigir la síntesis de proteínas (proceso llamado traducción) (Figura 27); con éste proceso se producen y mantienen las proteínas de la célula (Alberts, et al., 2008).

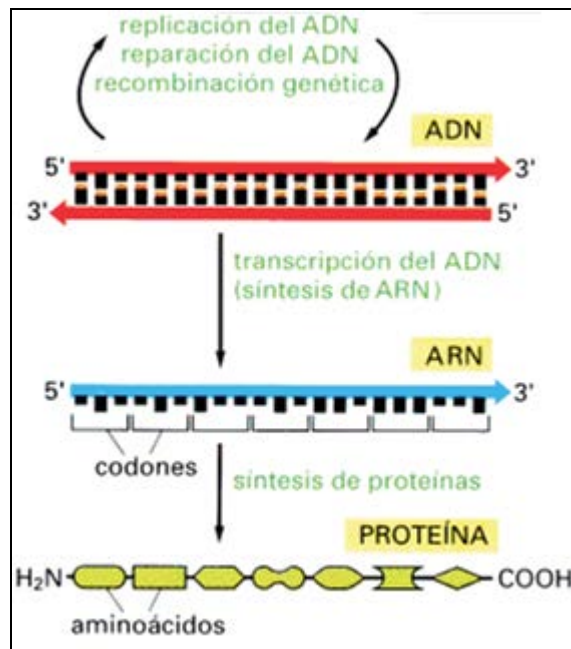


Fig. 27. Vía de la síntesis de proteína desde el ADN. “El Dogma central de la Biología Molecular”
(Tomado de Alberts, et al., 2008)

Sin embargo es importante considerar que existen mecanismos epigenéticos que inducen cambios en la cromatina en respuesta a estímulos endógenos y externos,

y de este modo regulan el acceso y/o progresión de la maquinaria transcripcional necesario para “leer” el molde de ADN; todos estos involucrados tanto en la activación y represión transcripcional; dichos mecanismos incluyen modificaciones post-traduccionales de histonas, regiones blanco de pequeños ARNs no codificantes e incluso el propio ADN puede ser modificado covalentemente en los eucariotes superiores a través de la metilación de los residuos de citosinas usualmente, aunque no siempre, en los dinucleótidos CpG (Allis, et al., 2007)

Los eventos epigenéticos que regulan la expresión genética han surgido claramente como un mecanismo fundamental en el desarrollo biológico y en la patogénesis. Naturalmente con el desarrollo del conocimiento con respecto a la patogénesis, es deseable que se desarrolle una nueva era de agentes terapéuticos que sean efectivos para los pacientes; con la ventaja de ser potencialmente preventivos o incluso reversibles (Hamilton, 2011).

Un ejemplo de un fármaco cuyo mecanismo de acción ocurre a nivel epigenético es la Decitabina (dezocitidina, Aza dC, 2'-desoxi-5-azacytidina, DacogenTM), que es un derivado farmoquímico de desoxicitidina y citarabina con una potente actividad antileucémica. Este antimetabolito, es capaz de inducir la activación genética y la diferenciación celular *in vivo* a través de la hipometilación del ADN. La Decitabina se ha sometido a diversos estudios de fase II, probando su actividad en tumores sólidos así como en diversos tipos de leucemia. El fármaco ha demostrado tener una eficacia limitada contra los tumores sólidos, sin embargo exhibe una gran actividad para el tratamiento de enfermedades malignas hematológicas. (Drugs R D 2003).

En esta investigación se estableció que el tratamiento con IFC-305 en ratas cirróticas provoca modificaciones a nivel epigenético y se realizó un recorrido a lo largo del camino que sigue a información genética desde el ADN hasta la síntesis de proteínas para relacionar dicho efecto con la reversión de la fibrosis debida a este tratamiento.

Se contaba con evidencia, a nivel de ARNm, de que éste fármaco normaliza la expresión genética de poco más de 400 genes desregulados durante el proceso cirrótico; y de que a nivel bioquímico el tratamiento con IFC-305 reduce significativamente la bilirrubina y la actividad de transaminasas en suero, incrementa significativamente el nivel de albúmina sérica en ratas cirróticas (Pérez-Carreón, et al., 2010) además de evitar que las HSCs se activen para desdiferenciarse a miofibroblastos (Velasco-Loyden, et al., 2010).

El primer acercamiento que se realizó para saber si la administración de éste compuesto en un modelo de cirrosis inducida con CCl_4 tenía efecto a nivel epigenético, fue la evaluación del estado de metilación de ADN genómico con las enzimas de digestión *MspI* y *HpaII*.

En este ensayo se encontró que durante el proceso cirrótico las citosinas metiladas que están en el contexto de la secuencia de reconocimiento de los isoequívocos disminuyen (hipometilación de ADN) por lo que hay una mayor digestión de ADNg (Figura 19: CCl_4 (to)); esto mismo puede explicarse debido a una reducción en la cantidad de heterocromatina durante la enfermedad, lo que facilita la accesibilidad de la enzima *HpaII* con el consecuente reconocimiento y corte de su secuencia blanco, este resultado es consistente con lo descrito por Mato y colaboradores (Varela-Moreiras, et al., 1995) quienes demostraron que la administración de CCl_4 a ratas induce una hipometilación del ADN genómico. En la literatura se ha propuesto que la hipometilación contribuye a la carcinogénesis a través del favorecimiento de la recombinación mitótica, provocando deleciones, translocaciones y rearrreglos cromosómicos, lo cual se conoce colectivamente como inestabilidad genómica. La desmetilación del ADN también se asocia con la activación de proto-oncogenes, como c-Jun, c-Myc y c-Ha-Ras y que en general la hipometilación incrementa con la progresión del tumor (Hamilton, 2011). Considerando entonces que en nuestro modelo de cirrosis existe una potencial inestabilidad cromosómica, puede entenderse que a esta patología se le considere

un estado preneoplásico ya que el 80% de los cánceres hepatocelulares (CHC) se originan en una cirrosis (Forner, et al. 2006). En cuanto al tratamiento con IFC-305 en este ensayo se observó en las muestras digeridas con *HpaII* que al administrar el fármaco durante 5 y 10 semanas después de suspendida la administración de CCl₄ (Figura 19: to + 5IFC y to + 10IFC), hay una recuperación de los niveles de la metilación del ADN_g por lo que es posible decir que disminuye la inestabilidad cromosómica; además en la muestra de la rata cirrótica tratada con IFC durante 10 semanas (Figura 20: to + 10IFC) se observaron dos grupos de bandas que no se encontraban en el resto de los estados del modelo estudiado y que pueden atribuirse a la pérdida de la metilación de estas zonas del ADN lo que posiblemente provoque la expresión de varios genes que participan en la recuperación del tejido.

Para validar las observaciones encontradas en el ensayo cualitativo con enzimas de restricción, se empleó un *kit* que permite cuantificar el nivel de metilación global del ADN genómico. En el estado cirrótico se observó una tendencia a la disminución del grado de metilación global del ADN genómico, sin embargo esta disminución no fue significativa con respecto al control (Gráfico 5: CCl₄ (to)). Esto puede atribuirse a que, a diferencia del ensayo con enzimas, este experimento evalúa la totalidad de citosinas metiladas y no solo las que se encuentran en la secuencia blanco de corte. En el tratamiento a ratas cirróticas con solución salina durante 5 y 10 semanas se observa pese a que el nivel de metilación del ADN es similar al control (Gráfico 5: to + 5ss y to + 10ss), no es suficiente para que se recuperen los niveles de los marcadores de daño hepático (Tabla 3), e incluso permanece el fenotipo cirrótico en el tejido (Tabla 10: to + 5ss y to + 10ss respectivamente).

A diferencia de la solución salina, el tratamiento con el hepatoprotector IFC-305 a ratas a las que se les indujo cirrosis provocó un incremento de cerca del 50% en la cantidad del ADN metilado con respecto al tejido control (Gráfico 5: to + 5IFC y to + 10IFC). En estudios previos del laboratorio (Chagoya de Sánchez, et al.,

1991) se demostró que es posible que la adenosina juegue un papel importante en la modulación de las metilaciones dependientes de SAM así como la modulación de la actividad de la hidrolasa de S-adenosilhomocisteína (SAHH) en la ruta hidrolítica o sintética promoviendo el flujo metabólico de las reacciones de transmetilación o la inhibición a través de la acumulación de SAH. Por otra parte, el grupo de Francesco Feo (Garcea, et al., 1989) demostró que el tratamiento con SAM a ratas preneoplásicas con nódulos hepáticos causa una modulación de la proporción SAM/SAH provocando la modificación de la metilación de ADN y por tanto de la expresión genética. Con ambas observaciones es posible indicar que el incremento en la metilación del ADN al administrar IFC-305 es atribuible a la modificación de la proporción de SAM/SAH, la cual tiene a su vez una repercusión directa en la expresión genética. Por otra parte, se observa la recuperación fenotípica del tejido al administrar el hepatoprotector durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis (Tabla 10: to + 10IFC) y que la mayoría de los marcadores de daño hepático alcanzan niveles muy similares al control desde las 5 semanas de tratamiento (Tabla 13: to + 5IFC y to + 10IFC). Por lo que podemos decir que el IFC-305 provoca cambios epigenéticos en el ADN a nivel global.

Dado que el IFC-305 es capaz de regular cambios epigenéticos, los cuales pueden estar involucrados en la normalización de la expresión de 414 genes (Pérez-Carreón, et al., 2010), nos dimos a la tarea de seleccionar aquellos genes que tuvieran un papel en el desarrollo de la fibrosis. Se decidió estudiar las modificaciones post-traduccionales de histonas mediante ensayos tipo ChIP del promotor *Pparg*, por la importancia que tiene al ser una proteína involucrada en regular la expresión del gen *Col1a1* (Yavrom, et al., 2005); además de que su nivel de expresión de ARNm se recupera con la administración del fármaco (Figura 15) (Pérez-Carreón, et al., 2010).

La expresión del gen *Pparg* es regulada por complejos remodeladores de la cromatina; los cuales incluyen coactivadores como acetiltransferasas de histonas

(principalmente p300/CBP) y corepresores transcripcionales como desacetilasas de histonas (principalmente HDAC3) (Lehrke y Lazar, 2005).

Existen dos isoformas de PPAR- γ que son reguladas por un promotor de uso diferencial y *splicing* ($\gamma 1$ y $\gamma 2$) y se encuentran en adipocitos. PPAR- $\gamma 2$ presenta un extremo N-terminal con 30 aminoácidos adicionales y es específico de adipocitos, mientras que PPAR- $\gamma 1$ es relativamente abundante en macrófagos, epitelio del colon y el endotelio. El hígado y el músculo expresan PPAR- $\gamma 1$, aunque en niveles menores que las células y tejidos antes mencionados, sin embargo, se sugiere que la expresión de PPAR- $\gamma 1$ tiene una función relevante en éstos últimos tejidos cuando se depleta de manera tejida específica el gen (Lehrke and Lazar 2005). Lo anterior concuerda con lo encontrado en el ensayo de ChIP para el tejido control, donde se observó principalmente la presencia de marcas epigenéticas de activación (H3K4Me3, H4 hiperAc, H3K14AcS10P) en la zona del promotor analizada, lo que nos hablaría de que el gen *Pparg* se expresa en el tejido hepático sano (Figura 24A).

En el tejido cirrótico (Figura 24B) así como en el que se le administró solución salina durante 5 semanas posteriores a la inducción de cirrosis (Figura 24C) se encontraron marcas epigenéticas de represión (H4K20Me3, H3K27Me3 y H3K9Me3), lo que hablaría de la pérdida de la expresión del gen *Pparg* en el tejido hepático durante el desarrollo de la cirrosis. En la literatura se ha reportado que el silenciamiento trascricional de receptor gama activado por proliferadores peroxisomales es un paso necesario para la conversión de HSCs a miofibroblastos (Mann, Chu et al. 2010) que son las principales células responsables de la producción y formación de fibrosis, que se manifiesta como una deposición progresiva de ECM (Mann and Mann 2008).

Por el contrario, la administración del hepatoprotector IFC-305 durante 5 semanas después del estado cirrótico (Figura 24D) provoca el enriquecimiento de marcas epigenéticas de activación (H3K4Me3 y H4 hiperAc) en el promotor de *Pparg*,

mismas que están asociadas a una estructura de cromatina abierta, mientras que no están presentes las marcas asociadas a una estructura de cromatina transcripcionalmente reprimida observadas en cirrosis con lo que es posible establecer que la administración del fármaco conlleva a la progresión de la maquinaria transcripcional necesaria para la expresión del gen en estudio.

En lo que respecta a los tratamientos de 10 semanas, se observa que al administrar solución salina (Figura 24E) únicamente está presente una marca epigenética de activación (H4 hiperAc) misma que se encuentra muy enriquecida en to + 5IFC, lo que nos lleva a pensar que una vez suspendido el agente que genera daño hepático, en este caso el CCl₄, el tejido es capaz de iniciar un proceso de reversión, mismo que se ve acelerado con la administración del hepatoprotector.

Contrastante con los resultados obtenidos en el modelo a las 5 semanas después de la inducción de la cirrosis, en la muestra to + 10IFC (Figura 24F) se observó un enriquecimiento de marcas epigenéticas asociadas a cromatina cerrada (H3K9Me3, H4K20Me3 y H3K27Me3) así como la conservación de la marca enriquecida en to + 5IFC y conservada en to + 10ss (H4 hiperAc), lo cual es consistente con el nivel de expresión de ARNm encontrado para este tratamiento, mismo que es muy similar al del tejido control (Figura 15). Es posible que en este estado del modelo estudiado, el fármaco active otros mecanismos, que podrían estar asociados a las zonas del ADNg desmetiladas observadas en el ensayo con enzimas de restricción (Figura 20: *HpaII* to + 10IFC), para detener la sobreactivación del promotor de *Pparg*, ya que se ha recuperado parcialmente la homeostasis en el tejido (Tabla 3 y Tabla 11).

Una vez evaluados los efectos que este compuesto derivado de adenosina provoca a nivel epigenético en el hígado completo, tanto en la metilación del propio ADN como en las modificaciones post-traduccionales de histonas sobre el promotor del gen clave en la activación de HSCs, y teniendo en cuenta los

cambios en los niveles de transcrito de los genes *Pparg* y *Col1a1*, se estudió la expresión a nivel de proteína de ambos genes en homogenados de hígado del modelo de inducción de cirrosis con CCl_4 .

En el tejido hepático sano, las HSCs son quiescentes y almacenan lípidos y retinoides en el espacio perisinusoidal. En respuesta al daño, las HSCs desarrollan cambios dramáticos de fenotipo culminando en miofibroblastos transdiferenciados. Las células pierden el almacén de lípidos y vitamina A y adoptan un fenotipo proinflamatorio y profibrogénico asociado con la expresión elevada de componentes de ECM, y una secreción abundante de colágenas fibrilares (colágena I y III) (Tsukamoto, et al., 2011) así como de filamentos intermediarios, como α -SMA y desmina (Pérez-Carreón, et al., 2010).

En el caso de las proteínas profibrogénicas evaluadas, se observó que, como era de esperarse, durante la cirrosis (Gráfico 7: CCl_4 (to)) hay una sobreexpresión de Colágena I misma que se ve reducida por debajo de los niveles basales al administrar el hepatoprotector por 5 o 10 semanas (Gráfico 7: to + 5IFC y to + 10IFC respectivamente). En lo que respecta a desmina, presentó una tendencia similar a colágena I, aunque su máximo nivel de expresión se observó a las 10 semanas después de suspendida la administración de CCl_4 (Gráfico 8: to + 10ss), sin embargo el efecto inhibitor en la síntesis de esta proteína con la administración del hepatoprotector es evidente (Gráfico 8 to + 5IFC y to + 10IFC).

En el caso de la proteína PPAR- γ , se observó una excelente correlación con lo observado tanto en el ensayo de ChIP así como en el reporte de la expresión de ARNm. Hay una tendencia a la disminución de la expresión de ésta proteína durante la cirrosis (Gráfico 9: CCl_4 (to)) lo que concuerda con las marcas asociadas a una estructura de cromatina cerrada y de represión transcripcional (Figura 24: CCl_4 (to)) con la disminución de ARNm observadas en éste mismo estado (Figura 15: CCl_4 (to)); mientras que el tratamiento a ratas cirróticas con IFC-305 provoca la sobreexpresión de esta proteína si se administra durante 5

semanas (Gráfico 9: to + 5IFC), efecto que puede atribuirse al enriquecimiento observado de marcas asociadas a cromatina transcripcionalmente activa (Figura 24D) lo que conlleva al incremento reportado en los niveles de transcrito (Figura 15: to + 5IFC). Por su parte, se encontró una disminución de este receptor nuclear en la muestra de tejido proveniente de la administración del hepatoprotector durante 10 semanas a ratas cirróticas (Gráfico 9: to + 10IFC) lo que coincide con las marcas epigenéticas de represión encontradas en este estado (Figura 24F) así como en la disminución de ARNm en el mismo (Figura 15: to + 10IFC).

Finalmente, si se comparan los niveles de expresión de las proteínas PPAR- γ y Colágena I a lo largo del modelo estudiado (Gráfico 9 y 7, respectivamente), se observan efectos antagónicos sobre la expresión de éstas proteínas al administrar el IFC-305, es decir, durante la cirrosis PPAR- γ disminuye mientras que Colágena I está sobreexpresada; por otro lado a las 5 semanas de tratamiento con IFC-305 se observa que el receptor nuclear está sobreexpresado mientras que la proteína profibrogénica ha disminuido y finalmente a las 10 semanas de tratamiento con el hepatoprotector (to + 10IFC), PPAR- γ se encuentra disminuido mientras que Colágena I presenta un nivel de expresión muy similar al control. De acuerdo con lo reportado por Tsukamoto y colaboradores (Yavrom, et al., 2005) PPAR- γ actúa como regulador negativo de la expresión de procolagena $\alpha 1(I)$ y con ello de Colágena I vía la inhibición de la unión facilitada de NF- κ B al DNA a través de p300. La expresión inducida de PPAR- γ puede revertir el fenotipo de HSC activada hacia el fenotipo quiescente, y el tratamiento de éste tipo de células con ligandos naturales o sintéticos inhibe su activación. Es por esto que los ligandos de PPAR- γ como 15-desoxi-prostaglandina J2 (15d-PGJ2) y ciglitazona son considerados como antifibróticos y han sido propuestos como terapia para las enfermedades crónicas del hígado (Guo, et al., 2005). En este punto es importante mencionar que la única metiltransferasa conocida para H3K27 es EZH2 y se ha demostrado que su actividad se requiere para la represión transcripcional de PPAR- γ y que únicamente se expresa en HSCs durante dicho proceso. La metilación de H3K27 (marca observada en el ensayo de CHIP en las muestras de hígado cirrótico provoca el reclutamiento de PRC1 que promueve la condensación de cromatina

(heterocromatinización) además de suprimir la elongación por RNAPol II de transcritos de exones de PPAR- γ que se encuentran río abajo (Mann, et al., 2010); con el dato anterior podría sugerirse que un posible mecanismo por el cual IFC-305 participe en la prevención de la fibrosis y reversión de cirrosis a través de la activación de PPAR- γ sea la inhibición de EZH2, misma que debe ser demostrado experimentalmente.

En resumen, los resultados encontrados en ratas cirróticas indican que los cambios epigenéticos atribuibles al tratamiento con IFC-305 son: 1) a nivel de ADNg, un incremento de la metilación global a las 5 y 10 semanas de administrar el fármaco y 2) en el promotor del gen *Pparg*, el enriquecimiento de marcas de histonas asociadas a una cromatina transcripcionalmente activa a las 5 semanas de tratamiento con el hepatoprotector, mientras que a las 10 semanas se observan marcas de cromatina cerrada. Estas modificaciones epigenéticas de acuerdo a los datos hallados, sugieren tener una repercusión directa en los siguientes pasos de la vía de transmisión de la información genética, al incrementar los niveles de ARNm así como de la proteína del gen *Pparg* a las 5 semanas de tratamiento de ratas con IFC-305. Además, se observó que hay una correlación entre el incremento de PPAR- γ y la disminución de colágena I la principal proteína profibrogénica, por lo que éste efecto se propone como el mecanismo por el cual el IFC-305 ejerce su efecto hepatoprotector, ya que se ha reportado que PPAR- γ ejerce un efecto inhibitorio sobre los niveles basales de colágena I al unirse al promotor de $\alpha 1(I)$ protocolágena (Yavrom, et al., 2005). Finalmente, los niveles de transcrito y proteína del gen *Col1a1* son similares al control, mientras que los productos del gen *Pparg* se encuentran disminuidos a las 10 semanas de la administración de IFC-305. La figura 28 muestra un resumen de los efectos atribuidos al hepatoprotector IFC-305 durante el proceso cirrótico ya descrito es este trabajo.

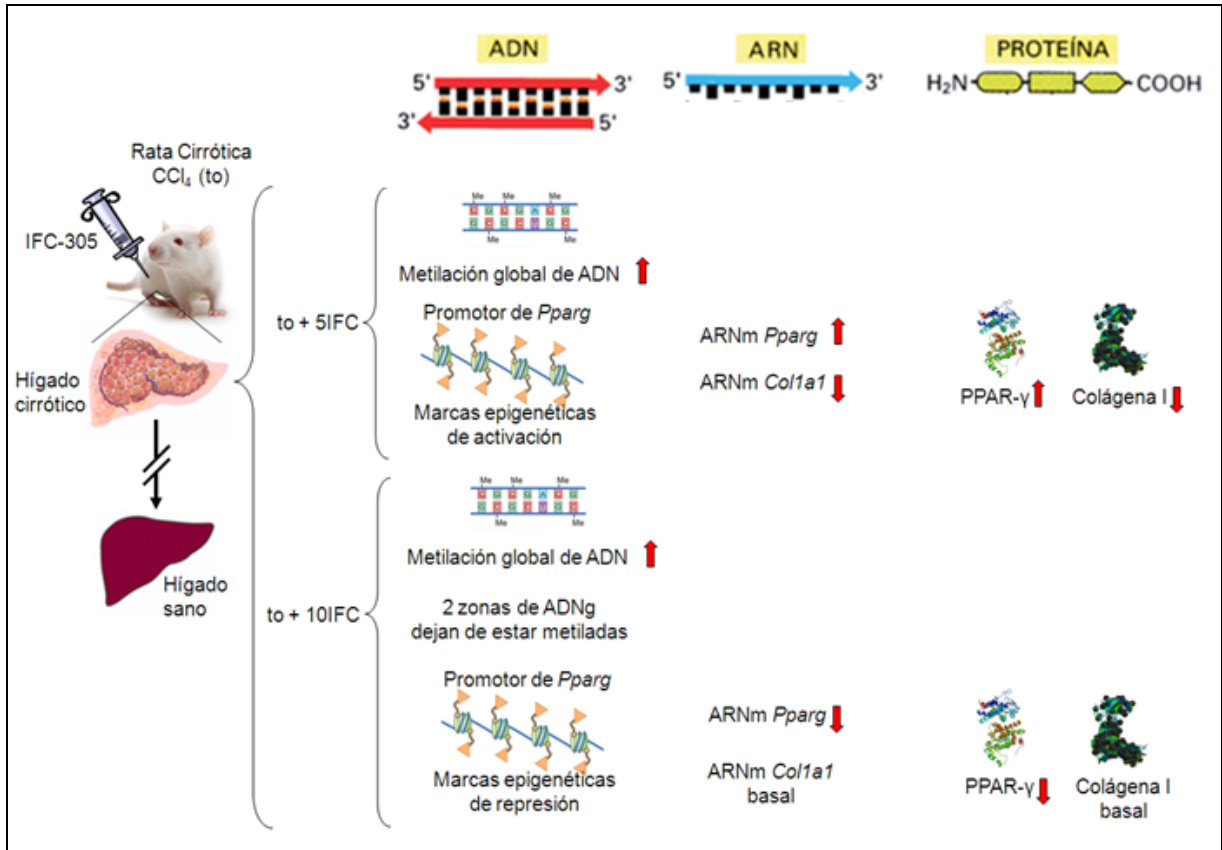


Fig. 28. Modificaciones epigenéticas por el IFC-305 en el hígado cirrótico y su efecto a lo largo del proceso genético básico (ADN→ARNm →proteína) del gen *Pparg*. Se muestra además el efecto del IFC-305 sobre la expresión de colágena I a nivel de proteína y ARNm. Nota: El efecto sobre la expresión a ARNm fue tomado de (Pérez-Carreón, et al., 2010).

9. CONCLUSIONES

1. Durante la inducción de cirrosis a ratas por la administración de CCl₄ a ratas se observó una tendencia a la disminución de la metilación global de ADN genómico.
2. El hepatoprotector IFC-305 aplicado durante 5 y 10 semanas en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄, favorece la metilación global de ADN genómico.
3. La administración de IFC-305 durante 10 semanas posteriores a la inducción de cirrosis, provoca la disminución de la metilación en dos zonas del ADN genómico.
4. En el estado cirrótico el promotor del gen *Pparg* presenta principalmente marcas epigenéticas asociadas a un cromatina cerrada lo que favorece la progresión de la fibrosis.
5. El tratamiento con el hepatoprotector IFC-305 durante 5 semanas reestablece las marcas epigenéticas asociadas a una estructura de cromatina transcripcionalmente activa en el promotor del gen *Pparg* lo cual trae como consecuencia un aumento en su expresión transcripcional y traduccional.
6. Al administrar IFC-305 a ratas cirróticas durante 10 semanas, el promotor de *Pparg* adquiere marcas epigenéticas de represión con la consecuente disminución de transcrito y proteína.
7. Uno de los efectos del hepatoprotector del IFC-305 a las 5 y 10 semanas de tratamiento a ratas cirróticas, es la disminución en la síntesis de las proteínas de EMC: Colágena I y Desmina.
8. Con los resultados anteriores, es posible decir que el hepatoprotector IFC-305 tiene efecto a nivel epigenético modificando la metilación global del ADN así como en la modulación de las modificaciones post-traduccionales presentes en las histonas del promotor de *Pparg*.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar el estado de metilación en el promotor de *Pparg* y *Col1a1* con la técnica de modificación de citosinas no metiladas mediante bisulfito de sodio en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄ para evaluar el efecto del IFC-305.
- Estudiar las modificaciones post-traduccionales de histonas en el promotor de *Col1a1* en los diferentes estados del modelo de cirrosis estudiado para evaluar el efecto del IFC-305.
- Evaluar el papel de la proteína EZH2 en la regulación del gen *Pparg* como posible mecanismo de acción del IFC-305 a través de la determinación de los niveles de expresión de ésta proteína en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄.

11. REFERENCIAS

(2003). Decitabine: 2'-deoxy-5-azacytidine, Aza dC, DAC, dezocitidine, NSC 127716. *Drugs in R&D* 4, 352-358.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberths, K., and Watson, J.D. (2008). *Molecular Biology of The Cell*, 5° edición (USA: Garland Publishing, Inc.).

Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., and Caparros, M.-L. (2007). *Epigenetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Arenas-Huertero, F., and Recillas-Targa, F. (2002). [Chromatin epigenetic modifications in cancer generation]. *Gaceta medica de Mexico* 138, 547-555.

Bhutani, N., Burns, D.M., and Blau, H.M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866-872.

Chagoya-de-Sánchez, V., Suárez, J.A., and Hernández-Muñoz, R. (2005). Investigación y desarrollo de un fármaco para el tratamiento de la cirrosis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8, 106-114.

Chagoya-de Sanchez, V., Suarez-Cuenca, J.A., and Hernandez-Munoz, R. (2007). Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis. *Gaceta medica de Mexico* 143, 44-50.

Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Sanchez, L., Vidrio, S., Yanez, L., and Suarez, J. (1991). Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation. *The International journal of biochemistry* 23, 1439-1443.

Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Yanez, L., Vidrio, S., and Diaz-Munoz, M. (1995). Possible mechanism of adenosine protection in carbon

tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *Journal of biochemical toxicology* 10, 41-50.

Drucker, R. (2005). *Fisiología Médica* (México: Manual Moderno).

Dufour, J.F., and Clavien, P.A. (2010). *Signaling Pathways in Liver Diseases*, 2° edición (Springer).

Farnham, P. (2006). *Farnham Lab Chromatin Immunoprecipitation (ChIPs) Protocol for Tissues (2006 Revision)*. Consultado Lunes 22 de noviembre, 2010, en <<http://gc.ucdavis.edu/farnham/protocols/tissues.html>>

Fauci, A., Kasper, D., Longo, D., Braunwald, E., Hauser, S., Jameson, L., and Loscalzo, J. (2009). *Harrison Principios de Medicina Interna*, 17° edición (China).

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.

Fernández, E., and Galván, A. (2001). *Métodos para la Cuantificación de Proteínas*. Consultado Domingo 25 de marzo, 2012, en <<http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>>

Fonseca, D., Mateus, H., and Contreras, N. (2010). *Practicas de Laboratorio de Biologia Molecular: Su Aplicacion en Genetica Basica* (Colombia: Universidad del Rosario).

Forner, A., Hessheimer, A.J., Isabel Real, M., and Bruix, J. (2006). Treatment of hepatocellular carcinoma. *Critical reviews in oncology/hematology* 60, 89-98.

Fullgrabe, J., Kavanagh, E., and Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene* 30, 3391-3403.

Garcea, R., Daino, L., Pascale, R., Simile, M.M., Puddu, M., Ruggiu, M.E., Seddaiu, M.A., Satta, G., Sequenza, M.J., and Feo, F. (1989). Protooncogene methylation and expression in regenerating liver and preneoplastic liver nodules induced in the rat by diethylnitrosamine: effect of variations of S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio. *Carcinogenesis* 10, 1183-1192.

Garcia-Sainz, J.A., Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1980). Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism. *Biochemical pharmacology* 29, 1709-1714.

Garcia-Sainz, J.A., Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., and de Sanchez, V.C. (1979). Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. *Biochemical pharmacology* 28, 1409-1413.

Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., and Carroll, S.B. (2008). *Genética*, Novena edn (España: Mc Graw Hill).

Guo, Y.T., Leng, X.S., Li, T., Peng, J.R., Song, S.H., Xiong, L.F., and Qin, Z.Z. (2005). Effect of ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on the biological characters of hepatic stellate cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 11, 4735-4739.

Ham, A.W., and Cormack, D.H. (1985). *Tratado de Histología*, 8° edición (México: Iberoamericana).

Hamilton, J.P. (2011). Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* 29, 130-135.

Hellemans, K., Michalik, L., Dittie, A., Knorr, A., Rombouts, K., De Jong, J., Heirman, C., Quartier, E., Schuit, F., Wahli, W., *et al.* (2003). Peroxisome

proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 124, 184-201.

Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Diaz Munoz, M., Adolfo, J., Garcia-Sainz, J.A., and Chagoya de Sanchez, V. (1984). Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical pharmacology* 33, 2599-2604.

Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., Garcia-Sainz, J.A., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1978). On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Archives of biochemistry and biophysics* 190, 155-162.

Herrerías, J.M. (1996). *Tratado de Hepatología* (España: Universidad de Sevilla).

INEGI Principales causas de mortalidad por residencia habitual, sexo y grupo de edad del fallecido. Consultado Domingo 27 de noviembre 2011, en <<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/proyectos/continuas/vitales/BD/talbulados/PC.asp?s=est&c=11817>>

Katzung, B. (1986). *Farmacología Básica y Clínica*, 2° edn (México: El Manual Moderno).

Kharbanda, K.K. (2007). Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 13, 4947-4954.

Lehrke, M., and Lazar, M.A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell* 123, 993-999.

Mandrekar, P. (2011). Epigenetic regulation in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 17, 2456-2464.

Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.

Mann, D.A., and Mann, J. (2008). Epigenetic regulation of hepatic stellate cell activation. *Journal of gastroenterology and hepatology* 23 *Suppl 1*, S108-111.

Mann, J., Chu, D.C., Maxwell, A., Oakley, F., Zhu, N.L., Tsukamoto, H., and Mann, D.A. (2010). MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology* 138, 705-714, 714 e701-704.

Mathews, C.K., Holde, K.E.v., and Ahern, K.G. (2006). *Bioquímica* (España: Pearson Addison Wesley).

Medina, J. (2011). *Medicina Ocupacional. Gases y Disolventes*. Consultado Domingo 25 de marzo, 2012, en <<http://es.scribd.com/doc/57239677/37/Tetracloruro-de-Carbono>>

Murphy, K., Travers, P., and Walpor, M. (2008). *Inmunología de Janeway*, Séptima edn (México: Mc Graw Hill).

Nelson, D., and Cox, M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (USA: Freeman and Company).

Olefsky, J.M. (2001). Nuclear receptor minireview series. *The Journal of biological chemistry* 276, 36863-36864.

Pérez-Cabeza-de-Vaca, R. (2012). Efecto del hepatoprotector IFC-305 en las células de Kupffer en el modelo experimental de cirrosis inducida por CCl₄. In *Biología Celular* (México, Universidad Nacional Autónoma de México).

Perez-Carreón, J.I., Martínez-Pérez, L., Loredó, M.L., Yáñez-Maldonado, L., Velasco-Loyden, G., Vidrio-Gómez, S., Ramírez-Salcedo, J., Hernández-Luis, F., Velázquez-Martínez, I., Suárez-Cuenca, J.A., *et al.* (2010). An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a

pre-established CCl₄-induced rat cirrhosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 287-296.

Recillas, F. (2002). Regulación epigenética y cáncer, la metilación del ADN y la remodelación de la cromatina. In *Gaceta Biomédicas* (México, Universidad Nacional Autónoma de México), pp. 9-11.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Vol 3, Second edn (USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Strauss, W.M. (2001). Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.] *Chapter 2, Unit 2*.

Thompson, K.J., McKillop, I.H., and Schrum, L.W. (2011). Targeting collagen expression in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 17, 2473-2481.

Tsukamoto, H., Zhu, N.L., Asahina, K., Mann, D.A., and Mann, J. (2011). Epigenetic cell fate regulation of hepatic stellate cells. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 41, 675-682.

Turner, B.M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nature cell biology* 9, 2-6.

Varela-Moreiras, G., Alonso-Aperte, E., Rubio, M., Gasso, M., Deulofeu, R., Alvarez, L., Caballeria, J., Rodes, J., and Mato, J.M. (1995). Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect of S-adenosylmethionine treatment. *Hepatology* 22, 1310-1315.

Velasco-Loyden, G., Perez-Carreón, J.I., Agüero, J.F., Romero, P.C., Vidrio-Gómez, S., Martínez-Pérez, L., Yáñez-Maldonado, L., Hernández-Munoz, R., Macías-Silva, M., and de Sánchez, V.C. (2010). Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochemical pharmacology* 80, 1690-1699.

Waalwijk, C., and Flavell, R.A. (1978). MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. *Nucleic acids research* 5, 3231-3236.

Yavrom, S., Chen, L., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R.A., and Tsukamoto, H. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses proximal alpha1(I) collagen promoter via inhibition of p300-facilitated NF- κ B binding to DNA in hepatic stellate cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 40650-40659.

APENDICE 1: Preparación de soluciones

- Protocolo Interno del Laboratorio 305 Sur, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Tratamiento de animales	
CCl ₄	Tetracloruro de carbono (Merck 1.02222.2500) en aceite vegetal comestible (aceite 1-2-3® Fábrica de Jabón La Corona®) 1:6
IFC-305	Disolver 1g de IFC-305 en 50mL de solución salina
Solución salina	NaCl solución inyectable al 0.9% (PISA®)

- (Sambrook, et al., 1989)

Extracción de ADN genómico	
PBS 1x	Disolver 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na ₂ HPO ₄ en 800mL de H ₂ O destilada estéril. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Llevar a 1L con H ₂ O destilada estéril. Elaborar alícuotas y esterilizar en autoclave de ciclo humedo por 20min a 15lb/sq. In. Almacenar a temperatura ambiente.
Amortiguador de digestión	100mM NaCl, 10mM EDTA pH 8, 0.5% SDS, 0.1mg/mL proteinasa K
Amortiguador de muestra	Xilen cianol 0.25% Glicerol al 30% en agua
EDTA 0.5M pH 8	Agregar 186.1g de ácido etilendiamintetraacético sal disódica dihidratada en 800mL de H ₂ O desionizada. Para solubilizar, utilizar de forma vigorosa un agitador magnético. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH (~20g de lentejas de NaOH). Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.
TAE 50x	Para 250mL Tris-base 60.5g Ácido acético glacial 14.27mL EDTA 0.5M pH 8 25.0mL H ₂ O destilada cbp 250mL
Bromuro de etidio 10mg/mL	Agregar 1g de bromuro de etidio a 100mL de H ₂ O desionizada. Solubilizar utilizando vigorosamente un agitador magnético por varias horas para asegurar que el colorante se haya disuelto. Envolver el contenedor en papel aluminio o transferir la solución a frasco ámbar y almacenar a temperatura ambiente.
Gel de agarosa 0.8%	Agregar 0.32g de agarosa en 40mL de TAE 1x. Calentar para favorecer la solubilidad. Si el volumen se ha evaporado completar a 40mL con agua desionizada. Agregar 1µL de Bromuro de etidio 10mg/mL por cada 10mL de solución para gel de agarosa.

Evaluación Cuantitativa de la Metilación Global de ADN Genómico con el Kit <i>Imprint Methylated DNA Quantification</i>	
Amortiguador de lavado 1x	Para el kit de 96 reacciones, agregar 22mL de Amortiguador de lavado 10x a 198mL de agua, reactivo para Biología Molecular. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 6 meses.
Diluciones de ADN	Diluir la muestra o el control de ADN en la solución de unión a ADN. Cada pozo puede unir un máximo de 200ng de ADN

<i>Continúa</i> Evaluación Cuantitativa de la Metilación Global de ADN Genómico con el Kit <i>Imprint Methylated DNA Quantification</i>	
Amortiguador de lavado 1x	Para el kit de 96 reacciones, agregar 22mL de Amortiguador de lavado 10x a 198mL de agua, reactivo para Biología Molecular. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 6 meses.
Diluciones de ADN	Diluir la muestra o el control de ADN en la solución de unión a ADN. Cada pozo puede unir un máximo de 200ng de ADN

Determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado	
Acilamida 30%	Disolver 29g de acilamida y 1g de N,N'-methilenbisaclilamida en un volumen total de 60mL de H ₂ O. Calentar la solución a 37°C para disolver las sustancias. Ajustar el volumen a 100mL con H ₂ O. Esterilizar la solución por filtración a través de un filtro Nalgene (de 0.45µm de poro). Verificar que el pH de la solución sea menor o igual a 7.0. Almacenar la solución en frasco ambar a temperatura ambiente.
Gel separador de Poliacilamida al 12%	Para 2 geles de 1.5mm (20mL) H ₂ O desionizada 6.6mL Mezcla de acilamida 30% 8.0mL Tris 1.5M (pH 8.8) 5.0mL SDS 10% 0.2mL Persulfato de amonio 10% 0.2mL TEMED 0.008mL
Gel concentrador de Poliacilamida 5%	Para 2 geles de 1.5mm (6mL) H ₂ O desionizada 4.1mL Mezcla de acilamida 30% 1.0mL Tris 1.5M (pH 6.8) 0.75mL SDS 10% 0.06mL Persulfato de amonio 10% 0.06mL TEMED 0.006mL
PBS 1x + Inhibidores de proteasas	Disolver 1 tableta de Complete (Roche 11 697 498 001) en 50mL de PBS 1x
Amortiguador de muestra 4x	Para 10mL Tris-HCl 1mol/L pH 6.8 2.0mL 2-mercaptoetanol 1.6mL SDS 10% 4.0mL Azul de bromofenol 0.02g Glicerol 2.0mL H ₂ O destilada estéril cbp 10mL
Amortiguador de corrida 10x	Glicina 144g Tris-base 30g SDS 10% 100mL H ₂ O destilada estéril cbp 1000mL
Amortiguador de transferencia	Para 1L Glicina 2.9g Tris base 5.8g Metanol 200mL H ₂ O desionizada cbp 1L

Continúa Determinación de la expresión de algunas proteínas involucradas en el proceso fibrogénico del hígado		
TBS 10x	Para 1L Tris-HCl pH 7.5 NaCl H ₂ O desionizada	200mL 292g cbp 1L
TTBS 1x	Para 500mL TBS 10x Tween 20 H ₂ O desionizada	50mL 250μL cbp 500mL
Amortiguador de <i>stripping</i> con bajo pH	Para 500mL Glicina SDS Tween 20 H ₂ O desionizada	7.5g 0.5g 5mL cbp 500mL