



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**SENESCENCIA CELULAR EN UN MODELO
DE FIBROSIS EXPERIMENTAL:**

Determinación de Longitud de Telómero y
Actividad de Telomerasa

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

Sofía Magdalena Murga Garrido



DIRECTOR DE TESIS:

**Dra. María del Carmen García de León
Méndez
2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del Alumno

Murga
Garrido
Sofía Magdalena
55 44 93 11
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305580728

2. Datos del Tutor

Doctora
García de León
Méndez
María del Carmen

3. Datos del Sinodal 1

Doctora
Frías
Vázquez
Sara

5. Datos del Sinodal 3

Doctora
Segal
Kischinevzky
Claudia Andrea

4. Datos del Sinodal 2

M. en C.
Molina
Alvarez
Bertha

6. Datos de Sinodal 4

M. en C.
González
Canto
Augusto
José

7. Datos del Trabajo Escrito

SENESCENCIA CELULAR EN UN MODELO DE FIBROSIS EXPERIMENTAL: Determinación de Longitud de Telómero y Actividad de Telomerasa
93 pags.
2012

ÍNDICE

ÍNDICE de Figuras, Tablas, Gráficas e Imágenes	3
Resumen	4
Introducción	6
Hígado, descripción breve	6
Fibrosis y sus mecanismos	8
Ciclo celular	16
Telómeros, Telomerasa y Senescencia	17
Senescencia replicativa	20
Antecedentes	26
Justificación	28
Hipótesis	28
Objetivo	28
Objetivos Particulares	29
Metodología	29
Animales	29
Modelo Experimental	29
Obtención de muestras	30
Tratamiento del tejido	30
Extracción de DNA	30
Determinación de la longitud del Telómero	32
Determinación de la presencia de Telomerasa	35
Pruebas estadísticas	37
Monitoreo del Modelo	38
Resultados y Discusión	42
Datos espectrofotómetro	42
Datos Diluciones	43
Longitud del telómero (q-PCR)	43
Presencia de Telomerasa (IHQ)	50
Conclusión	56
Bibliografía	59
Anexos	65
Anexos Introducción	65
Anexos Resultados	76

ÍNDICE de Figuras, Tablas, Gráficas e Imágenes

Figuras

Fig. 1- Funciones principales del hígado.....	6
Fig. 2- Estructura microscópica del lóbulo hepático.....	7
Fig. 3- Comparación del hígado normal y el hígado en presencia de daño hepático.....	10
Fig. 4- Iniciación, perpetuación y respuesta fenotípica de las HSC durante la fibrosis.....	13
Fig. 5- Telomerasa.....	18
Fig. 6- Telómero y proteínas de unión al DNA.....	19
Fig. 7- Micrografía de un telómero.....	20
Fig. 8- Senescencia replicativa inducida por disfunción telomérica.....	23
Fig. 9- Resultados y Discusión, proliferación ductular vs proliferación de células ovas.....	54

Tablas

Tabla 1- Componentes de la MEC.....	8
Tabla 2- Metodología, modelo experimental.....	29
Tabla 3- Metodología, secuencias de oligonucleótidos.....	33
Tabla 4- Metodología, mastermix.....	34
Tabla 5- Metodología, perfiles térmicos.....	35
Tabla 6- Seguimiento del modelo.....	39
Tabla 7.1- Resultados y Discusión, qPCR: promedio de cada grupo control y experimental.....	46
Tabla 7.2- Resultados y Discusión, ANOVA.....	47
Tabla 7.3- Resultados y Discusión, comparación estadística de grupos.....	47

Gráficas

Gráfica 1- Antecedentes, actividad de SA- β -gal.....	27
Gráfica 2- Antecedentes, expresión de los reguladores de ciclo celular.....	27
Gráfica 3- Seguimiento del modelo.....	41
Gráfica 4.1- Resultados y Discusión, qPCR.....	44
Gráfica 4.2- Resultados y Discusión, qPCR: Tm telómero.....	45
Gráfica 4.3- Resultados y Discusión, qPCR: Tm albúmina.....	45
Gráfica 4.4- Resultados y Discusión, longitud telomérica.....	46
Gráfica 4.5- Resultados y Discusión, correlación de longitud.....	48
Gráfica 5.1- Resultados y Discusión, presencia de telomerasa.....	51
Gráfica 5.2- Resultados y Discusión, presencia de telomerasa en nucleólo.....	52
Gráfica 5.3- Resultados y Discusión, presencia de telomerasa en núcleo.....	52

Imágenes

Imagen 1- Resultados y Discusión, geles de integridad de DNA.....	42
Imagen 2- Resultados y Discusión, IHQ.....	50
Imagen 3- Resultados y Discusión, células de la fase V en recuperación.....	53

Resumen

En las enfermedades crónicas del hígado, el daño y la regeneración continuos, aceleran el acortamiento del telómero específicamente en los hepatocitos, quienes eventualmente detienen su crecimiento y se detiene la recuperación. La hipótesis del telómero propone que el daño crónico hepático induce ondas continuas de destrucción y regeneración del órgano, resultando en el acortamiento crítico del telómero que culmina en senescencia replicativa o en la muerte del hepatocito (apoptosis) y finalmente en cirrosis. Se sabe que un intermediario obligado del metabolismo de la tioacetamida (TAA) se une a proteínas, mediado por el citocromo P450, y forma derivados de acetilimidolisina, responsables del efecto tóxico. La TAA causa diferentes tipos de daño: necrosis, regeneración, cirrosis; y es la causa última de transformación maligna.

Estudios previos sugieren (artículo en prensa) que la cirrosis hepática inducida por TAA se asocia con alteraciones en la organización de las proteínas regulatorias del ciclo celular y que la regeneración de los hepatocitos es la responsable de la expresión de estas proteínas en respuesta a la lesión hepática. El objetivo del presente trabajo es determinar, si el acortamiento del telómero se asocia al proceso cirrótico como resultado de la continua regeneración o es un factor mecánico que lleva al desarrollo de cirrosis, y si la presencia de la telomerasa justifica la posible aparición de un proceso neoplásico.

La cirrosis se indujo en ratas Wistar machos de 150-200 g, mediante inyecciones bisemanales via intraperitoneal de solución salina adicionada con TAA (200mg/kg de peso) durante 15 semanas. Los cortes de hígado se prepararon cuatro días posteriores a 8, 15 y 30 inyecciones y a los 30 y 180 días después del cese del tratamiento (grupos 1-5, respectivamente). Se usó el DNA de hígado para determinar el acortamiento telomérico mediante qPCR. La telomerasa se localizó por medio de inmunohistoquímica indirecta en cortes de tejido hepático embebido en parafina. El método de prueba de igualdad de medias poblacionales ANOVA se usó junto con la prueba de comparación Bonferroni para la comparación de resultados de la medición de longitud telomérica. Para medir el grado de

significancia de los resultados de presencia de telomerasa se usó la prueba de correlación Mann-Whitney.

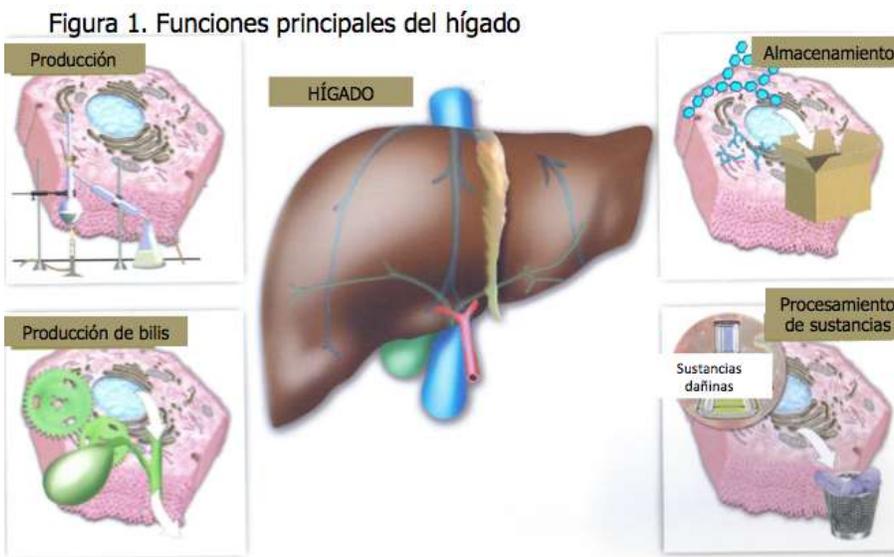
En las 2 primeras etapas (grupos 1-2) los animales presentaron fibrosis hepática, el grupo 3 desarrolló cirrosis con nódulos regenerativos y agregación de ductos biliares hiperplásicos en áreas fibróticas. La determinación del acortamiento telomérico mediante qPCR mostró un decremento gradual a partir de la segunda fase y una ligera recuperación en el tamaño del telómero en las últimas dos fases del modelo experimental. Este efecto se esperaba debido a que el hígado mostró nódulos de regeneración, con posible presencia de células displásicas (grupos 4-5). El ensayo inmunohistoquímico para determinación de telomerasa indicó una aparente reactivación de su expresión durante las últimas dos fases, lo que concordó con la recuperación del tamaño del telómero. Estos resultados sugirieron que el mecanismo mediante el cual la senescencia pudo revertirse posiblemente se debió al incremento gradual de la expresión de la telomerasa que conllevó a la recuperación del tamaño del telómero, acompañado del menoscabo en la actividad reguladora de las proteínas p16, p21 y p53.

Introducción

Hígado, descripción breve

El hígado humano es una glándula epitelial doble, con funciones endócrinas y exocrinas (bilis), conformado por un lóbulo derecho mayor que el izquierdo (dependiendo de la especie, el número de lóbulos varía) (Fig. 1). Está formado por parénquima, de índole epitelial derivado de endodermo, y estroma, compuesto de tejido conectivo derivado de mesodermo. Las células del parénquima, se conocen como hepatocitos, separadas por

canalículos biliares. A su vez, éstas suelen anastomosarse en cordones rodeando a los sinusoides hepáticos, vías de paso de sangre (de la vena porta a la central) más anchos que los capilares. Las paredes de estos sinusoides las constituyen células



(Fig.1, extraída de Bayer Health Care)

endoteliales fenestradas. Por otro lado, el estroma se forma por una cápsula de tejido conectivo delgado (de Glisson) en donde se encuentran fibras de colágena dispuestas de manera regular y fibroblastos dispersos (Ham, 1975; 5ºed.).

Entre los hepatocitos y las paredes del sinusoides existe el espacio de Disse, donde se encuentra plasma sanguíneo, células estelares hepáticas (HSC) y microvellosidades procedentes de las células del parénquima. En el revestimiento de los sinusoides existen células delgadas y aplanadas (características de los capilares y con placas cribas) y células de Kupffer (macrófagos). El citoplasma de las células de Kupffer se proyecta en forma de pseudópodos (Fig. 2).

La matriz extracelular (MEC) hepática abarca menos del 3% del área relativa en una sección normal del mismo. Además de la cápsula de Glisson, la MEC está confinada, en el hígado normal, a las zonas porta, paredes sinusoidales y venas centrales.

Para el estudio del hígado se han usado distintas maneras de segmentación anatómica, en el

tejido conectivo se encuentran los espacios porta (vena porta, conducto biliar, arteria hepática y conducto linfático). Otra manera de seccionar al hígado para su estudio es mediante un acino hepático (cuya forma es romboica). Gracias a esta sistematización en secciones se pueden distinguir las partes mejor y peor irrigadas (Rappaport, 1957).

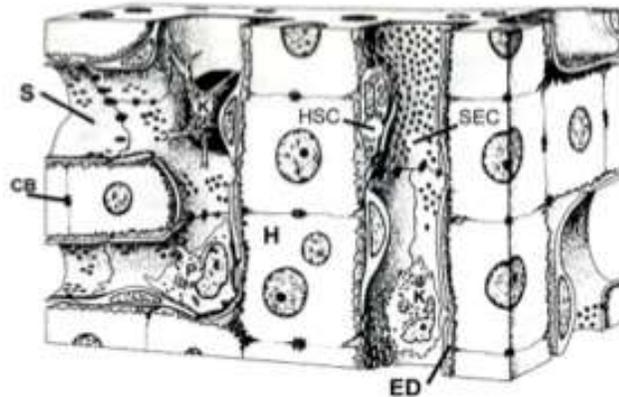


Figura 2. Estructura microscópica del lóbulo hepático. Canalículo biliar (CB), espacio de Disse (ED), células endoteliales sinusoidales (SEC), hepatocitos (H), células estelares hepáticas (HSC), células de Kupffer (K), células pit (P), sinusoides (S). (Kcmiec, 2001)

El hígado es un órgano parenquimatoso (>60% son hepatocitos) que además tiene una alta capacidad de regeneración. Si se extirpa parte del hígado, los hepatocitos presentan mitosis y restablecen las dimensiones normales del órgano. Sin embargo, si la lesión es causada por diferencias nutritivas, sustancias tóxicas circulantes, entre otros, la regeneración se complica ya que todas las estructuras necesarias para el proceso no pueden regenerarse de manera armónica (Ham, 1975). Es decir, si el parénquima del hígado recibe una lesión grave y conlleva la muerte de muchas células, el almacén de tejido reticular y conectivo que sostiene los lobulillos se colapsa (Ham, 1975). En zonas aisladas, en donde han sobrevivido hepatocitos sanos, puede iniciarse la regeneración. En este caso, los nódulos del parénquima recién formado pueden separarse de las conexiones adecuadas con la circulación portal y carecer de la organización adecuada de sinusoides. Por otro lado, los fibroblastos en el almacén semi-colapsado pueden proliferar y formar gran cantidad de tejido conectivo nuevo interferente en las conexiones normales que se habrían de formar entre los nódulos parenquimatosos en regeneración, el sistema de

conductos biliares y en el desarrollo de conexiones adecuadas entre los sinusoides del parénquima en regeneración y los vasos aferentes venosos y arteriales. Aunado a esto, la cantidad de tejido conectivo nuevo impide el crecimiento del hígado en formación, creando presión entre el nódulo creciente (regeneración) y el tejido conectivo proliferante. Debido a que el tejido hepático queda circunscrito, se dificulta la irrigación sanguínea a través del órgano afectado mediante el sinusoides (Ham, 1975) y es entonces cuando se presenta la falla hepática provocada por un proceso cirrótico.

La cirrosis induce un desequilibrio en la proliferación de los hepatocitos. El hígado cirrótico se caracteriza no sólo por la regeneración nodular del parénquima; también por fibrosis, y con frecuencia, hiperplasia hepática. La fibrosis, característica de la cirrosis hepática, contribuye significativamente al deterioro de la función del órgano durante el desarrollo de enfermedades crónicas.

Fibrosis y sus mecanismos

La matriz extracelular (MEC) hepática se compone por lo menos de cinco combinaciones genéticas distintas de colágena, siete clases de proteínas no colagénicas y de un número indeterminado de proteoglicanos y glicosaminoglicanos ¹. La fibrosis está

¹ Tabla 1. Componentes de la MEC:

<p>Colágenas</p> <p>Tipo I Tipo III Tipo IV Tipo V Tipo VI</p>	<p>Glicoproteínas No-colagénicas</p> <p>Fibronectina Laminina Entactina/nidogen Tenascina Trombospondina SPARC Undulina</p>
<p>Proteoglicanos</p> <p>Sindecano asociado a membrana Trombomodulina Betaglicano</p>	<p>Asociadas a matriz extracelular</p> <p>Versicano Biglicano Decorita Fibromodulina Perlecano</p>

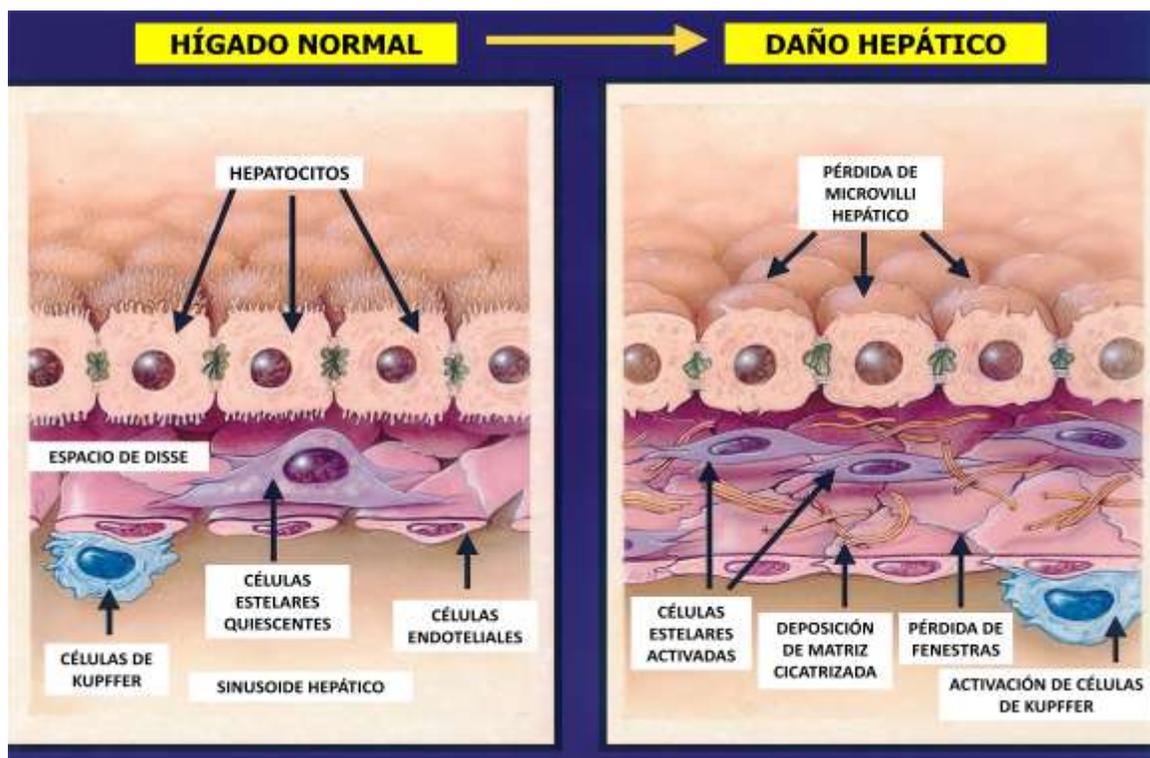
(Rojkind y, Greenwel, 1994)

definida como el depósito de MEC que involucra el desequilibrio en el metabolismo de estas moléculas (colágena, proteoglicanos, glicoproteínas estructurales y ácido hialurónico).

Este proceso promueve el sobre-crecimiento, el endurecimiento y/o cicatrización del tejido y es el resultado de reacciones crónicas inflamatorias inducidas por varios estímulos que incluyen infecciones persistentes, reacciones autoinmunes, respuestas alérgicas, ataques químicos, radiación y daño tisular (Wynn, 2008). Durante la inflamación crónica, la respuesta inmune persiste por varios meses dentro de los cuales el proceso de remodelación y el de reparación del tejido ocurren de manera simultánea. El proceso de reparación incluye la fase de regeneración (las células dañadas se remplazan por nuevas células del mismo tipo, sin dejar evidencia del daño) y la fase de fibroplasia o fibrosis (el tejido conectivo reemplaza al tejido normal parenquimatoso) (Wynn, 2008). Es en ésta última fase cuando el proceso de reparación puede descontrolarse y volverse patológico, ya que el resultado es la deposición de componentes de MEC y con esto el remplazo de tejido normal por tejido cicatrizado (Schuppan, 2001). Algunos factores reguladores importantes durante el proceso fibrogénico son las citocinas (IL-13, IL-21, TGF- β 1), quimiocinas (MCP-1, MIP-1 α), factores angiogénicos (VEGF), factores de crecimiento (PDGF), receptores activados de proliferación de peroxisomas (PPARs), proteínas de fase aguda (SAP), caspasas y componentes del sistema renina/angiotensina/aldosterona (ANG II) (Wynn, 2008).

El daño crónico que conlleva a la fibrosis hepática, ocurre en respuesta a una variedad de ataques. El daño se presenta de meses a años antes de que la cicatriz significativa se acumule. Cabe mencionar que la fibrosis es reversible mientras la cirrosis, la fase final consecuente, generalmente es irreversible. El hígado normal se compone de parénquima que, a su vez, tiene un componente epitelial, hepatocitos, y otro componente endotelial, células endoteliales sinusoidales fenestradas, así como macrófagos (células de Kupffer) y células mesenquimales perivasculares, o células estelares hepáticas (HSC reserva de vitamina A o retinol). Como ya se mencionó anteriormente, el espacio de Disse separa al epitelio (hepatocitos) del endotelio sinusoidal. En el hígado normal, este espacio contiene una matriz parecida a una membrana basal. Esta matriz extracelular subendotelial normal

es esencial para mantener diferenciada la función de todas las células residentes del hígado (Friedman, 2007). A medida en la que el hígado se vuelve fibrótico, se incrementa el contenido total de colágena y de componentes no colagenosos y la MEC cambia de tipo normal de baja densidad al tipo de matriz intersticial contenedora de colágenas formadoras de fibrillas (Fig. 3). Precisamente, las HSC son el principal tipo celular fibrogénico en el hígado. Estas células comprenden el 15% del número total de células hepáticas. Son las principales reservas de retinoides y constituyen un grupo heterogéneo que son similares funcional y anatómicamente pero diferentes en la expresión de filamentos citoesqueléticos, en su contenido de retinol y en su potencial de producción de MEC (Knittel, 1999). Se ha sugerido que estas células estelares tienen su origen en la cresta neural, ya que expresan nestina y proteínas ácido-fibrilares (Niki, 1999). Por otro lado, las células madre de la cresta neural expresan α -actina de músculo liso (α -SMA), marcador de las HSC activadas cuando se diferencian en miofibroblastos (Morrison, 1999).



(Figura 3. Comparación del hígado normal y el hígado en presencia de daño hepático. Friedman, 2000)

En respuesta a cualquier daño, la célula hepática estelar se activa, pasa de ser una célula quiescente a un miofibroblasto proliferante, fibrogénico y contráctil (Friedman, 2000). En una etapa temprana, ocurren cambios rápidos en la expresión de genes y del fenotipo que responsabiliza la respuesta a citocinas y otros estímulos locales. Este es el evento de *iniciación*², asociado con eventos transcripcionales y de inducción inmediata de genes tempranos. Resulta de la estimulación parácrina debida al rápido y disruptivo efecto del daño sobre la homeostasis de las células vecinas y los cambios tempranos en la composición de la MEC (Friedman, 2000). Una segunda etapa, *perpetuación*³, incorpora los eventos celulares que amplifican el fenotipo activado a través del aumento en la expresión de citocinas, resulta de la estimulación autócrina y parácrina así como de la remodelación acelerada de la MEC (Friedman, 2000).

La respuesta fenotípica de células estelares activas incluye proliferación⁴, contractibilidad⁵, fibrogénesis⁶, degradación de matriz⁷, quimiotaxis⁸, pérdida de retinoides⁹, y liberación de citocinas y quimioatracción de células blancas sanguíneas¹⁰.

² En la iniciación la estimulación parácrina y los eventos transcripcionales dan lugar a una cascada de respuestas celulares. Los hepatocitos dañados, las células endoteliales vecinas, las células de Kupffer, aunada al rápido cambio de composición de la MEC provocan el estímulo iniciador de la activación de las HSC. Los hepatocitos y las células de Kupffer son fuentes poderosas de intermediarios de oxígeno reactivo (ROI) (Maher, 1999). Estos, ejercen estímulos parácrinos de las HSC. Su actividad se amplifica por la reducción de antioxidantes. Cabe mencionar que la sobreexpresión de la enzima citocromo P450E1 en HSC genera ROIs y estimula la expresión del gen de colágena I (efecto atenuado por antioxidantes). El daño a las células endoteliales sinusoidales estimula la producción de una variante de fibronectina celular (isoforma EIIIA), que a su vez tiene efecto activador en la HSC. Adicionalmente, las células endoteliales, convierten el factor de crecimiento transformante TGF- β 1 latente en la forma activa fibrogénica a través de la activación de plasmina (Friedman, 1999). Durante esta fase se ha identificado al mensajero de KLF6 (gen dedo de zinc, factor Kruppel-like) inducido rápidamente y transactivador de genes reguladores de la acumulación de MEC (Kim, 1998). Existen más proteínas KLF que regulan la activación de HSC: Sp1 se une a su motivo consenso activado en contra de las células estelares quiescentes, BTEB1 (proteína de unión 1 básica de transcripción elemental) media el incremento de la expresión del gen de colágena.

³En la perpetuación, la actividad parácrina y autócrina de citocinas más la remodelación de la MEC mantienen el fenotipo activado. La perpetuación de la activación de las HSC involucra respuestas fenotípicas mediadas por el incremento de los efectos de las citocinas y la remodelación de la MEC (Friedman, 1999). El incremento de la respuesta de citocinas se debe al incremento de receptores en la membrana y de señalización; particularmente en los receptores de tirosin-cinasas (RTK) que median muchas repuestas de las HSC ante las citocinas. En la remodelación continua de MEC subyacen las respuestas celulares, caracterizando el daño hepático progresivo (Friedman, 2000). La matriz subendotelial de baja densidad se reemplaza progresivamente por una rica en colágena formadora de fibrillas. Este cambio fundamental afecta el comportamiento de los hepatocitos, endotelio sinusoidal y de las HSC. Esta nueva matriz acelera la activación de las células estelares. Estos efectos están mediados a través de la interacción con integrinas (receptores clásicos de MEC, α 1 β 1, α 2 β 1, α v β 1, α 6 β 4) y con RTKs (DDR, receptores con dominio discodin, señalizadores en respuesta colágena fibrilar).

⁴Durante la proliferación, un número elevado de células estelares en el hígado dañado incrementan su proliferación local en respuesta a factores de crecimiento polipeptídicos, muchos de los cuales señalizan a través de RTKs, como el factor de

Durante la recuperación del daño hepático, el número de HSC activadas decrece y a su vez la integridad del tejido se reestablece. En caso de que las HSC sufrieran reversión, el estímulo que podría controlar esta respuesta es la interleucina-10 (IL-10) que regula río abajo la inflamación e incrementa la actividad de la colagenasa intersticial. Esta interleucina

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El receptor activado de PDGF recluta a la molécula señalizadora Ras, seguida de la activación de la vía ERK/proteín cinasa mitogénica-activada. Adicionalmente, la activación de fosfoinositol 3-cinasa es necesaria para la mitogénesis y quimiotaxis por vías independientes de la activación de ERK (Friedman, 2000). La respuesta proliferativa a PDGF requiere de Ca^{2+} extracelular y el incremento de pH intracelular (Pinzani, 1998). Las actividades del intercambio Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ reguladas por PDGF incrementan en las HSC de rata durante la activación de daño mediante CCL_4 (Nakamura, 1998). Esta regulación se encuentra mediada por calcio/calmodulina y por la vía de proteín cinasa dependiente de ciclina (Di Sario, 1999).

⁵La contractibilidad es propiciada por las células estelares activadas y es un mecanismo que subyace el incremento en la resistencia portal durante el daño hepático. El estímulo contractil hacia las HSC es la endotelina-1 (ET-1), derivado autócrino (Friedman, 2000). Este estímulo es activado por la endotelina-conversión enzima-1. ET-1 también regula la proliferación de las HSC. Al menos dos receptores acoplados a proteínas G median el efecto de ET-1. Los receptores A y B de ET-1 se expresan en HSC quiescentes y activadas, su presencia relativa cambia con la activación celular, cada una media respuestas divergentes (Friedman, 2000). El efecto proliferativo de ET-1 en las células quiescentes se correlaciona con el aumento de la actividad Ras/ERK, bloqueada por los antagonistas de ETA. De manera contraria, el efecto inhibitorio de ET-1 en las células activas se encuentra mediado por el receptor ETB vía prostaglandina/cAMP que lleva a la regulación de ERK y de la cinasa (JNK) c-JUN (Friedman, 2000).

⁶Durante la fibrogénesis la MEC producida por las HSC se estimula predominantemente por la citocina TGF- β 1, su papel se encuentra en la perpetuación. La fuente más importante de esta molécula es autócrina (Friedman, 2000), aunque su actividad también es estimulada mediante la proteólisis de TGF- β 1 latente a citocinas activadas por un activador plasminógeno de tipo urocinasa. La liberación y actividad de TGF- β 1 están mediadas por ciertas proteínas de unión intracelulares. La síntesis de colágeno durante la activación (respuesta de las HSC a la lesión) se encuentra mediada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, no todos relacionados con TGF- β 1.

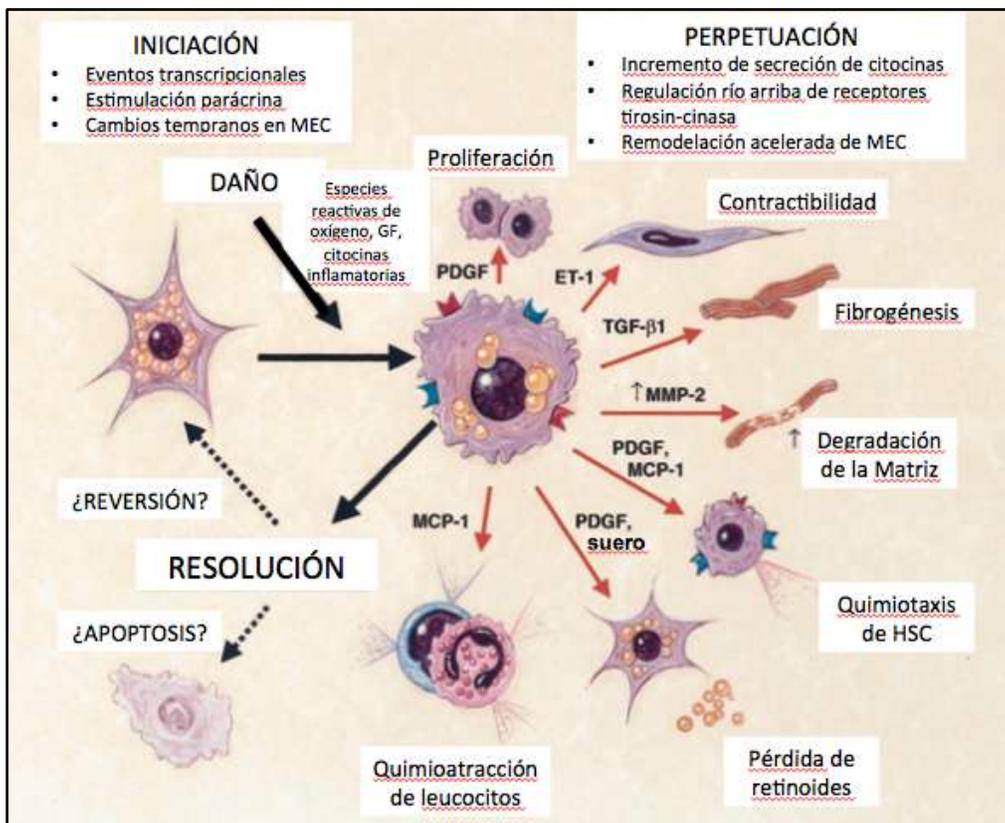
⁷La degradación de la matriz conlleva cambios en la actividad de la proteasa de matriz que resultan en la remodelación de la MEC hepática durante la lesión; ambos, de manera directa e indirecta, aceleran la activación de las HSC. Las células estrelladas hepáticas expresan los componentes clave requeridos para la degradación de la matriz: metaloproteínasa-2 de matriz (MMP-2) y estromelicina/MMP-3 (Arthur, 1995), ambas degradan la MEC normal subendotelial. Cabe mencionar que esta degradación acelera su reemplazo por colágeno formadora de fibrillas que a su vez activan el crecimiento de las HSC y la producción de MMP-2 en un ciclo de retroalimentación positiva. Estos últimos efectos pueden estar mediados por el receptor tirosin-cinasa DDR2 (Olaso, 1999). Mediante la regulación río arriba del inhibidor de tejido de metaloproteínasas 1 y 2 (TIMP-1 y 2) las HSC pueden inhibir la actividad de las colagenasas intersticiales que favorecen la acumulación de cicatriz (Arthur, 1995). La expresión del gen de TIMP-1 requiere un activador proteico presente únicamente en las HSC activadas.

⁸La quimiotaxis de las HSC se caracteriza por la migración directa de las células estrelladas activadas que estimulan su acumulación en las áreas dañadas. Los quimioatrayentes hacia las HSC activadas son PDGF y proteína-1 monocito quimiotáctica (MCP-1). La quimiotaxis requiere activador plasminógeno (para promover la degradación de matriz mientras las células avanzan por la MEC)(Fibbi, 1999). La señalización en respuesta a MCP-1 requiere fosfoinositol-3 cinasa y entrada de calcio.

⁹La pérdida de vitamina A intracelular es una característica de la activación de las HSC. La degradación de algunos retinoides estimulan la activación de TGF- β 1 latente, incrementando su actividad fibrogénica (Friedman, 2000).

¹⁰El incremento de la producción y/o actividad de las citocinas es crítico para la perpetuación de la activación de las HSC. Casi todas las características de la activación se pueden atribuir a citocinas autóctonas (Friedman, 1999). La matriz extracelular en el hígado es una reserva importante de factores de crecimiento (Friedman, 1999). Las células estrelladas pueden amplificar el proceso inflamatorio mediante la liberación de quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos.

se induce durante la activación de las HSC provocando una señal de retroalimentación negativa autócrina para limitar la acumulación de cicatriz. La regresión de las HSC, también, puede ser posible mediante la reconstitución de la MEC subendotelial normal. Otro destino potencial de las HSC activadas es la apoptosis, que se asocia con la reducción en la expresión de TIMP-1 durante la fase de recuperación (Friedman, 2000).



(Figura 4. Iniciación, perpetuación y la respuesta fenotípica de las HSC durante la fibrosis. Friedman, 2000)

En las células estelares la expresión genética y la secreción proteica se regulan de manera célula-específica y también dependen del estado de activación celular. Así los efectos de los mediadores difieren en distintos estados de la activación de la célula y posiblemente se refleja en la ocurrencia de varias vías durante el daño hepático temprano y tardío.

Existen varias teorías acerca del mecanismo de la fibrosis, entre ellas está la que involucra la transición epitelial/endotelial-mesenquimal (EMT/EndMT) (ver [Anexo A](#)).

Existe una gran variedad y cantidad de mediadores y vías por las cuales se desarrolla la fibrosis. Por su complejidad, se necesitan técnicas no invasivas (como marcadores en suero, mejoras técnicas en imágenes, etc.) que puedan cuantificar con frecuencia los cambios que se presentan en el transcurso de la enfermedad. Los factores genéticos son temas de explotación potencial para determinar el riesgo relativo para desarrollar fibrosis. Se estima que cerca del 45% de las muertes en el mundo desarrollado son provocadas por algún tipo de enfermedad crónica fibroproliferativa (Wynn, 2008).

Sin importar la etiología y las manifestaciones clínicas, en las enfermedades crónicas fibrosantes se presentan irritantes persistentes que sustentan la producción de factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, factores angiogénicos y citocinas fibrogénicas que estimulan la deposición de los elementos del tejido conectivo que progresivamente remodelan y destruyen la arquitectura del tejido normal (Wynn, 2007; Tomasek, 2002; Friedman, 2004).

Después de la inflamación del tejido, se observa la respuesta fibrogénica tanto en la cirrosis humana como en la cirrosis animal (Da-Hee, 2001). En todos los casos, el daño continuo llega a un punto en el que se dispara la activación de los macrófagos, los cuales producen citocinas que inducen a las células estelares a producir el depósito de MEC con la consecuente presencia de fibrosis (Wiemann, 2002).

En el mamífero, la fibrosis es inducida por una amplia variedad de hepatotoxinas (como son TAA y CCL₄), independientemente de su etiología, la fibrosis se desarrolla lentamente durante muchos años; la muerte crónica del hepatocito y su renovación son los principales factores predisponentes (Friedman, 1983; Williams, 1998; Alcolado, 1997).

La tioacetamida (TAA) es un reactivo hepatotóxico empleado experimentalmente para la inducción de fibrosis hepática. Se sabe que un intermediario obligado del metabolismo de la droga se une a proteínas y, mediado por el citocromo P450, forma derivados de acetilimidolisina, responsables del efecto tóxico (Hong, 2002).

De acuerdo con la relación dosis-respuesta, la TAA provoca distintos tipos de daño hepático (necrosis, fibrosis, cirrosis) y como consecuencia terminal promueve la transformación maligna. En el hígado de la rata a dosis bajas, puede originar la muerte celular vía apoptosis o necrosis local, así como la entrada al ciclo celular, estimulando la síntesis del DNA y la mitosis, favoreciendo la regeneración del hepatocito y la reparación del tejido (ver [Anexo B](#)), por el contrario una dosis alta de TAA puede causar necrosis masiva (Ledda-Columbano, 1991).

Aunque muchos estudios se han enfocado en tratar de elucidar los mecanismos de la fibrosis, poco se sabe sobre las lesiones moleculares que gobiernan la inducción progresiva de la enfermedad durante su largo período de latencia.

Las explicaciones clásicas proponen que los cambios arquitectónicos del órgano, inducidos por muchos años, por procesos tales como inflamación crónica, la producción de citocinas, y la reorganización de la matriz extracelular, entre otros, llegan a ser irreversibles en algún momento (Friedman, 1983; Williams, 1998; Alcolado, 1997). Otros han propuesto que el recambio celular continuo que ocurre en las enfermedades crónicas del hígado, precipita la senectud como resultado del acortamiento de su telómero (Campisi, 2005). Este último se acorta en cada replicación cromosómica durante el ciclo celular.

Ciclo celular

Con respecto al ámbito celular, los organismos multicelulares están formados principalmente por dos diferentes tipos de células: postmitóticas (son las que no se pueden dividir) y mitóticas (que se dividen). Los tejidos renovables se reparan y reabastecen, generalmente por procesos de proliferación celular. Este proceso es el paso primordial y esencial para el desarrollo del cáncer, ya que incrementa de manera continua la replicación del DNA y con ella la probabilidad de adquisición, fijación y propagación de mutaciones somáticas (Rudolph, 2001).

La proliferación celular inicia con la duplicación del material genético de la célula, seguido de la distribución de éste en dos células hijas. La duplicación de los cromosomas tiene lugar únicamente durante la fase 'S' del ciclo celular, mientras que los demás componentes celulares lo hacen durante G_1 . Durante la fase 'M', los cromosomas replicados se segregan en núcleos individuales, mitosis, y la célula se divide en dos, citocinesis. Las fases 'S' y 'M' se separan por fases Gap, G_1 y G_2 . La progresión del ciclo celular puede ser regulada por señales intra y extracelulares. La organización y control del ciclo han sido altamente conservadas durante la evolución; investigaciones en un amplio rango de sistemas, han llevado a la estandarización del control de ciclo celular eucarionte. Los eventos del ciclo celular se desarrollan de acuerdo a sistemas de control independientes, asegurando de este modo que estos eventos se den en tiempos adecuados, en el orden correcto y una vez por ciclo (ver [Anexo C](#)). La progresión del ciclo se regula precisamente por varios mecanismos inhibidores que producen el arresto del mismo en puntos de revisión específicos cuando los eventos no se completan satisfactoriamente, cuando hay daño en el DNA o cuando las condiciones extracelulares no son favorables (Alberts, 2002). En los animales multicelulares, el tamaño celular, la división y la muerte son controlados cuidadosamente para asegurar que el organismo y sus órganos alcancen y mantengan un tamaño apropiado. Tres clases de señales proteicas extracelulares contribuyen en el control¹¹,

¹¹ Los mitógenos estimulan la tasa de división celular mediante la remoción de frenos moleculares intracelulares que restringen la progresión del ciclo en G_1 . Los factores de crecimiento promueven el incremento en la masa celular, estimulando la síntesis e inhibiendo la degradación de macromoléculas. Los factores de sobrevivencia incrementan el número celular inhibiendo la apoptosis.

algunas tienen efecto en varios procesos. Las señales extracelulares que inhiben la división, el crecimiento celular o inducen a la apoptosis, también contribuyen al control del tamaño del órgano (Alberts, 2002).

Telómeros, Telomerasa y Senescencia

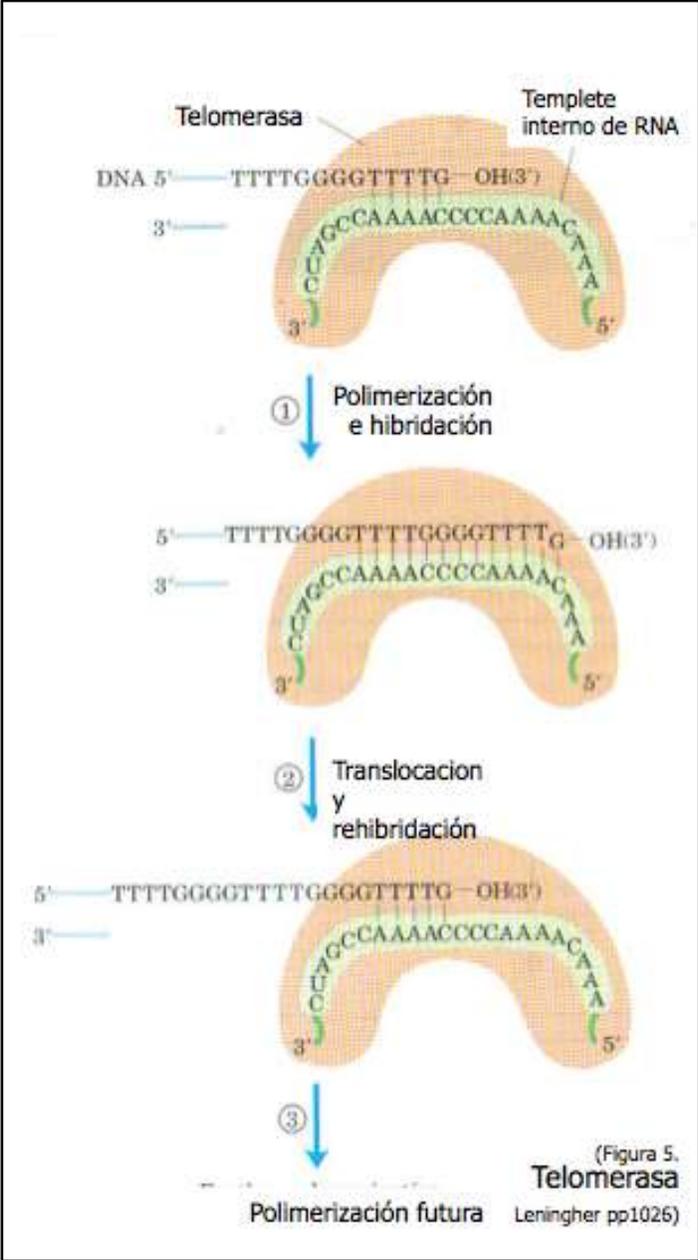
De acuerdo con el mecanismo de replicación de DNA en la fase de síntesis (S), existe un acortamiento continuo en las terminaciones cromosómicas debido a la incapacidad de la maquinaria de replicación para sintetizar la terminación de la hebra 3' ¹². Los extremos de los cromosomas lineales no se replican por medio de DNA polimerasas celulares. La replicación del DNA requiere de templetes e iniciadores o "*primers*", mediante los cuales la polimerasa puede sintetizar los fragmentos de Okazaki y más allá del término de una molécula de DNA lineal no hay templetes disponibles ni primers de RNA, por lo que en cada generación se acortan las hebras en las terminaciones (teloméricas) y requieren de un sistema especial de replicación.

Mientras las bacterias resolvieron el problema de replicación de la hebra rezagada con DNA circular, los eucariontes formaron secuencias nucleotídicas especiales en las terminaciones cromosómicas: los telómeros. Los telómeros son complejos esenciales de proteínas (asociadas a DNA telomérico de doble y una cadena) y DNA que protegen los extremos del cromosoma ante fusiones y degradación; son estructuras nucleoproteicas especializadas situadas en los extremos de los cromosomas de los organismos eucariontes (Blackburn, 1991). Las secuencias teloméricas son similares en diversos organismos como protozoarios,

¹² Durante el proceso de replicación del DNA, la hebra líder (3'-5') se replica de manera continua mediante la polimerasa que avanza en sentido 5'-3'. La hebra rezagada (5'-3') se replica de manera discontinua mediante fragmentos de Okazaki. La polimerasa, para agregar nucleótidos en el proceso de replicación, realiza una reacción de transferencia de grupo fosforil. El nucleófilo es el grupo hidroxilo 3' del nucleótido en la punta 3' de la hebra creciente. El ataque nucleofílico ocurre en el fosforo α del desoxinucleósido 5'-trifosfato entrante. El pirofosfato inorgánico se libera en la reacción. Sólo en la hebra líder se encuentran extremos 3' libres durante la replicación y se posicionan nucleósidos 5'. En la hebra rezagada se sintetiza un *primer* (oligonucleótidos de RNA con terminación 3' libre) mediante una primasa, a cada cierto número de bases, y la DNA polimerasa δ se une al RNA y agrega desoxirribonucleótidos. Una vez que el fragmento de Okazaki se completa, el *primer* de RNA se reemplaza por DNA mediante la DNA polimerasa ϵ ; las puntas de los fragmentos de DNA se unen mediante una DNA ligasa. Esta ligasa cataliza la formación de unión fosfodiéster entre el hidroxilo 3' de la terminación de un fragmento de DNA y el fosfato 5' al final de otro fragmento. (ver imagen [Anexo D](#): figura 25-13 leninger, 4ªed. pp960)

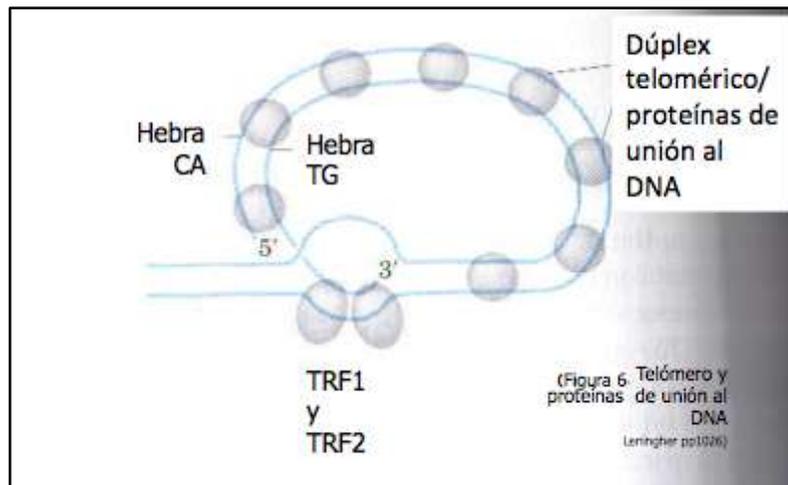
hongos, plantas y mamíferos (Alberts, 2002). Estas secuencias consisten en segmentos cortos repetidos en tándem, ricos en nucleótidos de guanina que permiten que las terminaciones cromosómicas se repliquen eficientemente. La secuencia en humanos es GGGTTA en extensiones de 10 000 nucleótidos. Cabe resaltar que son secuencias de DNA especializado. Las secuencias repetidas, junto con las regiones vecinas, forman estructuras que protegen la terminación y evitan que sean reconocidas como DNA dañado (roto). Los telómeros se asocian a una serie de proteínas que regulan su función como son TRF1, TRF2, TANK2 y TIN2 (Callicott, 2006) (ver [Anexo E](#)). La región adyacente, subtelomérica, es un mosaico de elementos repetidos caracterizados por una gran cantidad de polimorfismos (Gilson, 2007; Rudolph, 2001). En ausencia de mecanismos especiales de manutención del telómero, el cromosoma lineal se acorta progresivamente en cada replicación del DNA, provocando eventualmente senescencia celular o apoptosis (Gillson, 2007). Naturalmente, las células postmitóticas conservan su DNA telomérico; la erosión del telómero está ligada al proceso de división celular.

La telomerasa, es una transcriptasa reversa que recupera el acortamiento telomérico, extendiendo la terminación 3' cromosómica. Ésta transcribe en reversa la región de su RNA telomerasa asociada. La terminación cromosómica,



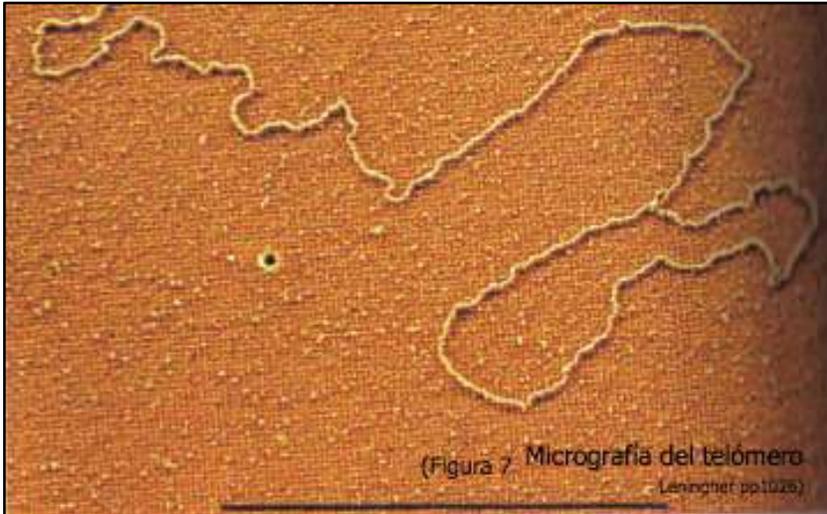
es la responsable de la replicación de la secuencia telomérica. La longitud de los telómeros se mantiene de manera específica en cada especie, mediante las interacciones entre la telomerasa y las proteínas asociadas al telómero (Gilson, 2007; Campisi, 2001; Greider, 1996; Kim, 2003). La telomerasa reconoce la terminación rica en guanina de una secuencia telomérica existente y la prolonga en dirección 5'-3'. Para que esto suceda, la telomerasa tiene un templete de RNA de aproximadamente 150 nucleótidos de las bases complementarias C-A, de tal manera que sirve para sintetizar la hebra T-G del telómero. La telomerasa consiste en una transcriptasa reversa (denotada como Tert) y un componente de RNA (Callicott, 2006; Goytisolo, 2002). La enzima contiene toda la información para mantener la secuencia telomérica característica y así sintetizar *de novo* la secuencia perdida. A diferencia de los retrovirus, la telomerasa sólo copia un pequeño fragmento de RNA (Fig. 5).

La síntesis del telómero requiere la terminación 3' del cromosoma como *primer* y procede en la dirección 5'-3' usual. Cada que termina la síntesis de una copia



del repetido, la enzima se reposiciona para reiniciar la extensión. Después de varias rondas de que la telomerasa produce la extensión de la hebra de DNA parental, la replicación de la terminación de la hebra copia se completa usando éstas extensiones como templete para la síntesis de la hebra complementaria por la molécula DNA polimerasa. Éste mecanismo asegura que el extremo 3' del DNA en cada telómero sea ligeramente más largo que el 5', formando una cola de guanosina (generada por la síntesis de un fragmento de Okazaki incompleto)¹³. Este remanente, con la acción de proteínas especializadas, forma

¹³ La cola-G de la hebra líder y de la rezagada no tienen el mismo tamaño (Gilson, 2007) y se procesan de manera distinta. La hebra rezagada es rica en guanina y se replica con maquinaria que incluye fragmentos de Okazaki, mientras que la hebra líder es rica en citosina y se replica continuamente. Consecuentemente la hebra parental rica en G no se duplica completamente, lo que resulta en el excedente 3' rico en guanina. A su vez, esta cola-G es diferente si



un bucle, bucle-t, que se pliega hacia las hebras de DNA telomérico; para su formación requiere de la cinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1). Esta formación requiere la invasión, en *cis*, de la terminación 3' de la hebra sencilla del telómero dentro

del dúplex de DNA. El bucle se une mediante las proteínas TRF1 y TRF2 (Fig. 6 y 7). La terminación normal cromosómica tiene una estructura única que la protege ante enzimas degradantes y es la que hace la distinción del DNA roto (Campisi, 2001; Griffith, 1999).

Como ya se mencionó, la replicación en eucariontes inicia de manera bidireccional. Es en las terminaciones cromosómicas en donde se espera que el último origen sea el responsable de replicar las secuencias teloméricas (ver [Anexo G](#)).

El tiempo de replicación telomérica varía entre las especies de los mamíferos (ver [Anexo H](#)).

Senescencia replicativa

La senescencia celular es una forma estable de detención del ciclo celular considerada como un mecanismo intrínseco que puede limitar el potencial proliferativo de las células premalignas (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007); puede ser inducida por diferentes tipos de estrés: exógeno o endógeno. La senescencia replicativa es un proceso consecuencia de múltiples rondas de división celular, que provocan el excesivo acortamiento de los telómeros, para limitar la proliferación de las células somáticas normales (Gilson, 2007).

corresponde a la longitud del último *primer* (10-12 nucleótidos) o a una inhibición de síntesis del último fragmento de Okazaki (200 nucleótidos) (ver [Anexo F](#)).

Las células que proliferan indefinidamente tienen mecanismos homeostáticos que mantienen el número de repeticiones en un rango limitado. En las células somáticas humanas, se propone que las secuencias de repetición teloméricas proveen a cada célula un mecanismo calculado que evita la proliferación ilimitada. Las células somáticas nacen con un tamaño determinado de telómero y niveles de telomerasa disminuidos. En cada ciclo de replicación la célula, por ejemplo de la piel, pierde de 50 a 100 nucleótidos de sus telómeros. Después de varias generaciones, las descendientes heredarán cromosomas defectuosos, ya que los extremos no pudieron ser replicados completamente. Consecuentemente, se retirarán del ciclo celular permanentemente y cesarán la división, proceso llamado: senescencia replicativa. Teóricamente este mecanismo provee a la célula de protección ante la proliferación descontrolada de células anormales en tejidos somáticos. La longitud del telómero actúa como un medidor de divisiones celulares que regula el tiempo de vida celular¹⁴ (ver [Anexo I](#)).

Mientras la célula se divide, el telómero se acorta y limita la capacidad proliferativa de la célula; el límite Hayflick es el número de divisiones en el que se alcanza éste estado crítico (Hayflick, 1965; Ishikawa, 2000). Este mismo autor describió la senescencia replicativa como el lapso finito de replicación de un fibroblasto humano en cultivo. Cuando uno o más telómeros alcanzan una longitud crítica, esos cromosomas afectados se desestabilizan y sus terminaciones se tornan propensas a rupturas y fusiones (Callicott, 2006). En condiciones normales, la célula frena la división antes de alcanzar la inestabilidad genómica y entra en estado senescente¹⁵. Conjuntamente con éste proceso senescente, la célula con disfunción telomérica puede morir o alcanzar la inestabilidad genómica, como ya se mencionó. Como resultado ante el intento de reparar la inestabilidad, la célula se predispone a transformación neoplásica (McEachern, 2000). Así, la senescencia y la apoptosis son

¹⁴ No todas las células carentes de telómeros funcionales en un tejido dejan de dividirse, algunas se desestabilizan genéticamente, pero continúan dividiéndose dando lugar a variantes celulares que pueden conducir a cáncer.

¹⁵ Este estado parece ser un factor que contribuye al proceso de envejecimiento (Hodes, 1999; Ishikawa, 2000).

mecanismos supresores de tumores que evitan la sobrevivencia de la célula genómicamente inestable (Campisi, 2001)¹⁶.

Dentro de las causas de estrés se puede encontrar la disfunción telomérica, el daño al DNA, fuertes señales mitogénicas, estrés oxidativo, cromatina rota y por la consecuente expresión de genes alterados acumulados promotores de cáncer¹⁷. Un marcador del proceso senescente es la actividad (a pH 6) de la enzima β -galactosidasa, llamada betagalactosidasa asociada a senescencia, SA- β -gal (Dimri, 1995).

Los tejidos renovables, con células mitóticamente competentes, se reparan y reponen mediante la proliferación celular. Aunado a esto, la replicación del DNA incrementa la probabilidad de adquisición, fijación y propagación de mutaciones somáticas (Campisi, 2005).

Algunas características de las células senescentes son: incremento de tamaño (Hayflick, 1965), expresión de SA- β -gal (Dimri, 1995) y generalmente la expresión de p16^{INK4 α} , p53 o p21 (ver [Anexo J](#)). Además, las células que senescen a causa de señalización persistente de proteínas DDR (respuesta al daño en DNA) forman foci (focos) nucleares¹⁸ (segmentos de DNA con alteraciones en la cromatina que fuerzan el proceso senescente (DNA-SCARS)) y secretan factores de crecimiento, proteasas, citocinas y otros factores con actividades parácrinas y autócrinas (fenotipo secretor asociado a senescencia: SASP). DNA-SCARS incluye telómeros disfuncionales o focos inducidos por disfunción telomérica (Rodier, 2011).

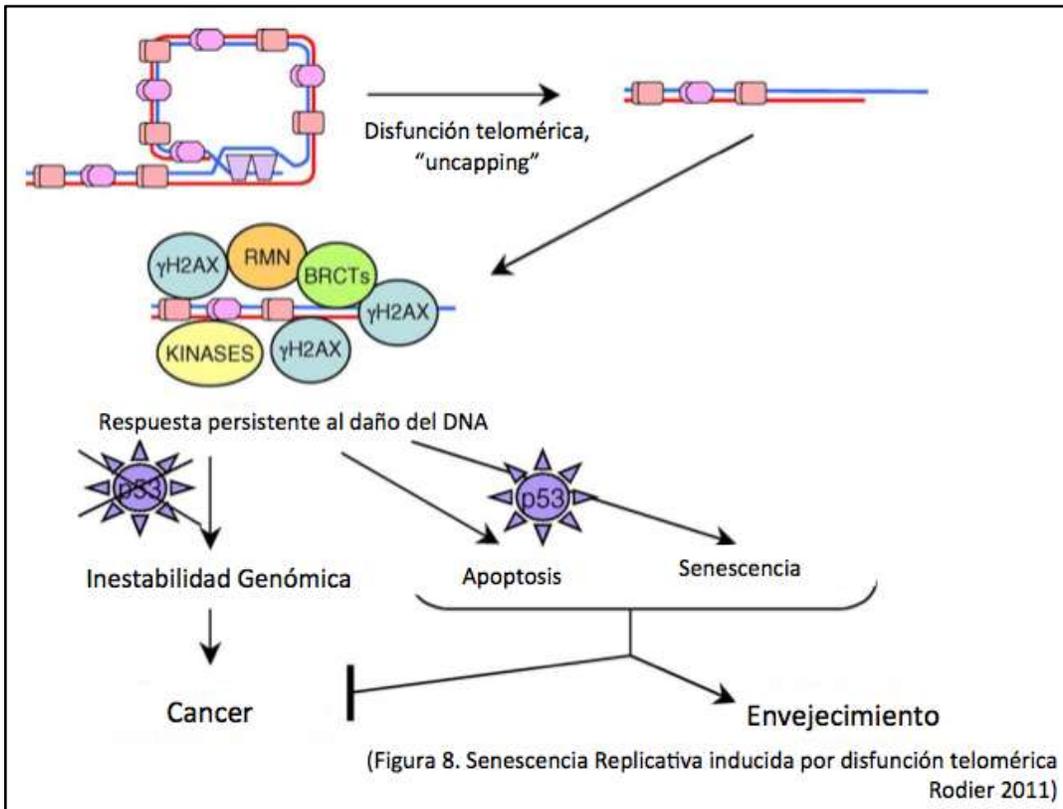
¹⁶ Cabe mencionar que a lo largo de la vida de la célula se acumulan mutaciones que tienen efecto en genes requeridos para el proceso senescente (Campisi, 2001). La muerte celular requiere de la vía funcional de p53, que también está sujeta a mutaciones acumuladas. Así, la vía de manutención y estabilidad telomérica es una alternativa tentativa por reparar la inestabilidad genómica, aunque esto pueda resultar en tumoración.

¹⁷OIS es un oncogén inductor de senescencia ligado a vías cancerígenas como son ARF-p53 y p16^{INK4 α} -RB (Serrano, 1997).

¹⁸ La respuesta senescente resulta en la reorganización de la cromatina (Bandyopadhyay, 2002). Las células senescentes desarrollan foci densos de heterocromatina (como SAHF) que coincide con la represión heterocromática dependiente de pRB de genes que codifican ciclinas y otros reguladores positivos del ciclo celular (Bandyopadhyay, 2002). Muchos de los genes reprimidos son blanco de activación de factores de transcripción E2F (promotores de crecimiento), los cuales se convierten en represores transcripcionales en combinación con pRB.

El resultado de la disfunción del telómero incluye la generación de una señal de daño persistente en el DNA. El destino de las células que experimentan esta señal, la inestabilidad genómica, senescencia, o apoptosis, depende fundamentalmente de p53. Este destino de la célula subsecuentemente influye en los fenotipos de cáncer y el envejecimiento (ver [Anexo K](#)).

Por lo tanto, los telómeros disfuncionales promueven la entrada de las células a los



mecanismos supresores de tumores celulares como la apoptosis o la senescencia (F. Rodier et al). Apoptosis o muerte celular programada, que literalmente elimina las células con

riesgo de transformación neoplásica o por el contrario, senescencia, que implica la detención del crecimiento en respuesta a la disfunción del telómero, ambos procesos son controlados por la proteína supresora de tumores p53, dependiendo en particular del estado del p53 celular(Fig. 8) (ver [Anexo L](#)).

Como ya se mencionó, el mecanismo para reconstituir los telómeros lo constituyen las vías de compensación en las que se adicionan repeticiones teloméricas mediante la actividad de

la enzima llamada telomerasa (Rudolph, 2001), por recombinación o retrotransposición (Gilson, 2007). Sin embargo, otros mecanismos están implicados en la protección del mismo. El primero de ellos se lleva a cabo mediante proteínas asociadas a los telómeros que facilitan la progresión de la horquilla para controlar la formación de la cola-G y recubrir el telómero después de la replicación; el siguiente recae en la activación de los puntos de revisión del DNA dañado durante la replicación del telómero.

En el daño agudo del hígado, las células estelares hepáticas, inicialmente proliferan y secretan componentes de MEC, lo que produce una cicatriz fibrosa. Después de la proliferación, hipotéticamente, algunas células estelares, entran en senescencia (Krizhanovsky, 2008). La respuesta senescente está acompañada por un decremento en la producción de MEC y un incremento en la secreción de MMPs (mediante SASP) que degradan las proteínas de la MEC. La respuesta senescente, entonces, ayuda a resolver la cicatrización fibrogénica (ver [Anexo M](#) y [Anexo N](#)). Cuando las células estelares comprometen su capacidad para entrar en arresto senescente (por deficiencias en p53, p16 y p19ARF) se puede desarrollar fibrosis severa (Rodier, 2011). Algunos componentes de las SASP (IL-6, IL-8, MMPs) pueden promover la reparación tisular, pero también la progresión del cáncer (Rodier, 2011).

El continuo acortamiento del telómero durante cada división celular, limita la vida de las células humanas primarias *in vitro* (Wiemann, 2002). Sigue siendo una cuestión de discusión el conocer cómo afecta el acortamiento del telómero a la fisiología del órgano durante el envejecimiento (Allsopp, 1995) o en enfermedades crónicas que inducen índices elevados de recambio celular (Boulton, 2000; Effros, 2000; Ball, 1998).

La hipótesis del telómero en el hígado cirrótico propone que "la lesión hepática crónica induce ondas continuas de destrucción y regeneración del órgano, dando por resultado el acortamiento crítico del telómero, que alternadamente culmina en senectud replicativa o muerte del hepatocito y en última instancia en la cirrosis" (Williams, 1998).

El acortamiento del telómero limita el número de divisiones de células primarias y puede afectar la capacidad regenerativa de sistemas orgánicos durante el envejecimiento (Wiemann, 2002).

La longitud de los telómeros varía ampliamente, incluso entre las células del mismo tejido¹⁹. La longitud promedio se mide usualmente mediante la técnica Southern blot, para el análisis de fragmentos terminales de restricción (TRF). Pero esta técnica requiere mucho tiempo y cantidades abundantes de DNA. La fluorescencia cuantitativa determinada mediante hibridación *in situ*, de igual manera puede ser usada, sin embargo es técnicamente complicada, costosa y requiere mucho tiempo. Actualmente la técnica más eficiente empleada para determinar el tamaño del telómero se basa en ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real, método en el cual se marcan genotipos de un panel interespecífico de DNA para realizar un análisis de unión preliminar y con esto mapear la secuencia telomérica para determinar su longitud (Allsopp, 1995). Aunque el ensayo para la medición de telómeros en roedores mediante la técnica PCR en tiempo real, había sido problemático debido a la formación de dímeros por los *primers* diseñados para hibridizar con los repetidos teloméricos (Callicott, 2006), ahora existen *primers* que vencen este problema. Por otro lado, la técnica de inmunohistoquímica es la más adecuada para calificar la presencia de la enzima telomerasa.

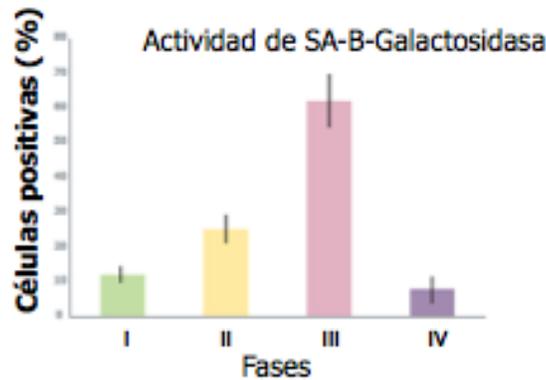
¹⁹ Comparados con los del ratón (*Mus musculus*, >20 kb), los telómeros humanos y de *Mus spretus* son relativamente cortos, y su tamaño varía entre 10 y 15 Kb (Kim, 2003; Callicott, 2006).

Antecedentes

En ensayos realizados previamente en el grupo (artículo en prensa) se empleó un modelo experimental de fibrosis en ratas. Esto con la finalidad de determinar la presencia de células senescentes mediante la determinación de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal), de acuerdo a la técnica de Dimri GP(1995), y determinar la expresión de las proteínas p16, p21 y p53, por inmunohistoquímica. Los resultados indicaron que la fibrosis y regeneración celular, como consecuencia de daño hepático inducido por el hepatotóxico, se asociaba con alteraciones en la organización del ciclo celular. Estas, a su vez, se relacionan con la posible alteración de la función de las proteínas reguladoras del mismo, y con la consecuente aparición de células senescentes, en los estadios iniciales del modelo (Fase I-III). Lo anterior se demostró a través del aumento de la expresión de inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (p16, p21) y de la proteína supresora de tumores (p53), en forma concomitante con el aumento de células senescentes (fases II y III), observándose una disminución de esta expresión (p16, p21 y p53) en forma por demás aparente en la fase IV del modelo (Gráficas 1 y 2). Estos resultados sugirieron que el mecanismo por el cual la senescencia estaría siendo revertida "podría" ser atribuido al aumento paulatino de la expresión de la telomerasa, cuya función es la recuperación del tamaño del telómero. La senescencia aunada a la posible aparición de mutaciones en las proteínas reguladoras del ciclo celular (p16, p21, p53), daría por resultado la pérdida de la regulación de la proliferación celular en el hígado.

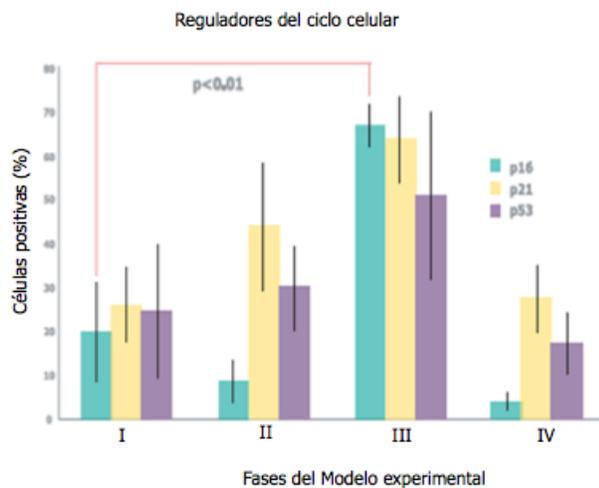
La senescencia celular y la inactivación de las moléculas encargadas de la regulación del ciclo celular en los puntos de control del mismo, se han identificado como elementos potencialmente significativos en la patofisiología de la cirrosis hepática y hepatocarcinogénesis (Plentz, 2007; Wiemann, 2002). La cirrosis provoca por lo tanto, un desequilibrio en la proliferación de los hepatocitos.

Gráfica 1. Antecedentes, actividad de SA-β-gal:



El porcentaje de SA-β-gal en cada uno de los grupos experimentales fue de 12.6%, 30%-25.4%, 62.4% y 7.5%. La tinción positiva se presenta inicialmente (++) a partir de la segunda etapa en la periferia del nódulo y en zonas internas del mismo, aumentando en forma incuestionable en la tercera etapa (++++), y con una drástica disminución de la tinción, a los 30 días posteriores a la suspensión del tratamiento.

Gráfica 2. Antecedentes, expresión de los reguladores del ciclo celular.



La expresión de p16, p21 y p53 fue positiva desde los grupos iniciales. p16 incrementó significativamente ($p < 0.01$) de 15% en el grupo 1 a 70% en el grupo 3, decreciendo después de la suspensión del tratamiento con TAA.

Justificación

Para probar que el acortamiento del telómero tiene un papel mecánico en la cirrosis humana, es necesario demostrar que este proceso es un marcador general de la cirrosis, independientemente de la etiología y de la edad del paciente. Debido a que la composición celular del hígado cambia perceptiblemente en la etapa cirrótica (formación de septos fibróticos e infiltración linfocitaria), un análisis de la longitud del telómero de la célula, resulta en otro paso en la comprensión del papel de su acortamiento en la cirrosis.

En el presente trabajo se propone determinar la longitud del telómero y la presencia de la telomerasa en las células del hígado de animales tratados con TAA (hepatotóxico, inductor de fibrosis/cirrosis) y correlacionar la presencia de la enzima con el aumento de la proliferación observado en las etapas finales del modelo.

Hipótesis

En las enfermedades hepáticas crónicas, el daño continuo y la concomitante regeneración aceleran el acortamiento del telómero, específicamente en los hepatocitos, quienes finalmente se convierten en senescentes y la recuperación se detiene.

Objetivo

Determinar si el acortamiento del telómero participa negativamente en el proceso cirrótico como consecuencia de la regeneración continua, y comprobar si la posible presencia de la telomerasa justifica la presencia del proceso proliferativo en el modelo.

Objetivos Particulares

- a) Establecer el seguimiento del modelo experimental
- b) Determinar por medio de la técnica de PCR en tiempo real, la longitud del telómero en las células de hígado de rata, a lo largo del desarrollo del modelo experimental.
- c) Determinar la presencia de telomerasa en las células del hígado de rata, por medio de inmunohistoquímica, principalmente en las etapas finales del modelo en las que se hace evidente la posible aparición del proceso neoplásico.

Metodología

Animales

Durante el modelo de inducción de cirrosis se emplearon ratas Wistar machos de 150- 200 g de peso alimentadas *ad libitum* con agua y purina. Los animales se manejaron siguiendo los lineamientos marcados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas. Al término del tratamiento, de cada grupo, los animales se sacrificaron por exsanguinación cardíaca, bajo anestesia con éter.

Modelo Experimental

La cirrosis fue inducida de acuerdo a lo establecido previamente (Pérez-Tamayo y cols., 1987; Montfort y cols., 1990). Cada animal fue inyectado vía intraperitoneal (i.p.) con Tioacetamida (TAA), dos veces por semana, como lo indica la tabla siguiente:

Inductor	Ratas Experimentales	Tiempo de Tratamiento
TAA	200 mg por cada kg de peso	15 semanas
Ratas Controles	Sin tratamiento	15 semanas

(Tabla 2. Metodología, modelo experimental)

Obtención de muestras

Se tomaron muestras de tejido hepático de cinco fases que constael modelo experimental. La Fase I se obtuvo a las 4 semanas de iniciado el tratamiento (8 inyecciones); la Fase II, la conforman animales tratados durante 7½ semanas (15 inyecciones); la Fase III corresponde a la última ronda de inyecciones después de las 15 semanas de tratamiento. Los animales de las fases IV y V pertenecen a los grupos sacrificados a los 30 y 180 días posteriores a la suspensión del tratamiento, respectivamente. Cada grupo consta de 5 ejemplares experimentales y 3 controles, ambas variantes sacrificadas 4 días posteriores a la última inyección.

Tratamiento del tejido

Se tomaron fragmentos de hígado fresco de los animales de cada grupo para extracción de DNA y se almacenaron a -80°C en tubos Eppendorf y Falcon. Para los estudios histológicos los fragmentos se fijaron, deshidrataron y se incluyeron en parafina²⁰.

Extracción de DNA

Se extrajo el DNA genómico de 25 mg de hígado de cada animal de cada uno de los grupos en estudio por tratamiento con proteinasa K. Se usó el kit QIAamp DNA Mini (250) de Qiagen (cat. #51306). Las 40 muestras por separado, inicialmente, se equilibraron a temperatura ambiente y se cortó y pesó la cantidad de tejido conveniente. El tejido de cada una, se homogenizó (mediante el uso de tijeras y del licuador Politron) con 80 µl de PBS. El buffer salino de fosfato mantiene el tejido, las células y las proteínas íntegras durante la maceración. Se añadieron 100µl de buffer ATL, a continuación se agregaron 20µl de proteinasa k, enzima que cataliza la ruptura de las proteínas en péptidos pequeños y aminoácidos. Esto se mezcló en vortex y se incubó a 56°C durante 2 horas, 45 minutos.

²⁰Cabe mencionar que con estas muestras, también, se obtuvieron muestras para la extracción del RNA total, empleado para la elaboración de los microarreglos. Se obtuvieron cortes histológicos a partir de éstas muestras, los cuales una vez fijados e incluidos en parafina, se utilizaron para el análisis histopatológico con tinciones de Hematoxilina y Eosina y rojo de Sirio y para el cálculo del contenido de colágena (previo a su tratamiento para inclusión en parafina). Asimismo, se tomó el suero de cada uno de los animales para someterlo a pruebas de funcionamiento hepático, esto para determinar el estado funcional del órgano en cada etapa de inducción, progresión y recuperación, del modelo experimental. Estas mismas muestras servirán para verificar la validación de los posibles genes alterados (RT-PCR en tiempo real y/o ELISA e inmunohistoquímica), obtenidos en el análisis de microarreglos.

Durante ésta incubación, se mezcló con vortex, cada muestra, 3 veces por hora. Al término de la incubación, se centrifugaron las muestras y se añadieron 200µl del buffer AL, una solución de lisis celular que rompe células abiertas y membrana celular. Se mezcló perfectamente en vortex y se incubó, nuevamente a 70°C por 10 minutos. A continuación se centrifugó brevemente, por 15 segundos aprox. a 8 000rpm y se añadieron 200µl de etanol absoluto para precipitar el DNA del material extraído. Se mezcló y se centrifugó una vez más, por 15 segundos a 8 000rpm, para posteriormente vaciar la mezcla obtenida en una columna con una membrana de silicatocon tubo colector, provista en el kit. Ésta columna se centrifugó a 8 000rpm durante 1 minuto, de manera que la mezcla filtrada por la membrana, al término de la centrifugación se desechó y la membrana se reposicionó dentro de un nuevo tubo colector. Entonces, se añadieron 500µl de buffer AW1, solución que lava los contaminantes del DNA pegado a la membrana de la columna, se centrifugó 1 minuto a 8 000rpm y una vez más se desechó el filtrado y se reemplazó el tubo colector. Se añadieron 500µl de buffer AW2, que funciona igual que el buffer anterior, y se centrifugó a 13 200rpm durante 4 minutos. El filtrado se desechó por última vez y se volvió a centrifugar a 13 200rpm durante 1 minuto para eliminar los restos de buffer AW2 y propiciar el secado de la membrana. La columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml y se añadieron 200µl de buffer AE, solución que eluye al DNA de la membrana, permitiendo el almacenamiento estable de la molécula por años en congelación. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 8 000rpm durante 1 minuto dando por resultado la primera elución del tejido. La columna se reposicionó en un nuevo tubo eppendorf de 1.5ml y se añadieron otros 200µl de buffer AE; para esta segunda elución, la incubación a temperatura ambiente fue de 5 minutos, al cabo: se centrifugó a 8 000rpm durante un minuto. Los tubos eppendorf conteniendo la primera y segunda elución resultantes, respectivamente, de cada muestra, se almacenaron a -20°C.

De cada muestra de DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la integridad de la molécula obtenida. El gel se preparó a partir de 60 ml de TBE más 0.6gramos de agarosa calentados por 50 segundos en el microondas aunado a 3µl de bromuro de etidio; la mezcla se vació en una caja. Una vez gelificada, se inyectaron

mezclas de 3 μ l del "loading buffer" más 3 de marcador " λ hind III" y 3 μ l del buffer de carga más 6 μ l de cada muestra de DNA extraído. Los geles se corrieron a 100volts.

Las muestras fueron sujetas a lectura en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Biomate 3) para obtener la concentración de cada una. El factor de dilución (F.D.= volumen diluyente/ volumen muestra) usado fue de 19: 20 μ l de DNA+ 380 μ l Tris-EDTA (TE). La medición del blanco se realizó con 400 μ l de TE. Se usó el programa de "DNA esófago" del espectrofotómetro. Se tomó la lectura de cada muestra, lavando la celda entre cada lectura con 400 μ l de solución 1:3 TE/ H_2O . Los variados datos obtenidos de la concentración de cada muestra se utilizaron para equipararlas todas a una concentración de 16ng/ μ l; se necesitan 10 μ l de cada muestra a ésta concentración para realizar correctamente el protocolo de reacción en cadena de polimerasa de este proyecto, ya que:

$$(concentración_1)(volumen_1) = (concentración_2)(volumen_2); \text{ y}$$

$$C_1 V_1 = 16 \frac{ng}{\mu l} (10 \mu l), \text{ entonces:}$$

$$v_1 = \frac{\left[\left(16 \frac{ng}{\mu l} \right) (10 \mu l) \right]}{c_1 \frac{ng}{\mu l}} = \frac{160}{[c_1]} \mu l$$

Hubieron muestras de ambos tratamientos que fueron sometidas a concentración por centrifugación al vacío en la centrifuga Savan ya que la concentración obtenida originalmente no era adecuada (por ser muy baja). Se tomaron 100 μ l del stock original para ser concentradas a 16ng/ μ l.

Determinación de la longitud del telómero

El método base en el presente proyecto para medir la longitud telomérica es el propuesto por Cawthon, 2009, que aprovecha las ventajas cuantitativas de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) para determinar la longitud relativa de las secuencias repetitivas (TTAGGG) $_n$ en los telómeros. Cawthon (2009) desarrolló una versión

multiplex del ensayo qPCR para medir la longitud telomérica. La estrategia de Cawthon permite coleccionar la señal de dos amplicones de manera separada. En un primer ensayo, Cawthon (2002) mide de manera efectiva y eficiente la longitud telomérica (ver [Anexo O](#)). Más tarde, Cawthon (2009) desarrolla un método de PCR cuantitativa, multiplex. En breve, el DNA genómico extraído a partir de muestras de tejido hepático se utilizó como plantilla de replicación en la q-PCR, utilizando un conjunto de oligonucleótidos capaz de hibridarse con las secuencias teloméricas repetitivas y generar productos de amplificación (amplicones) en número proporcional a la longitud del telómero. El diseño de la reacción de PCR en tiempo real también incluye la amplificación simultánea de un fragmento del gen que codifica para la proteína albúmina, del cual se sabe sólo existen dos copias en cada célula diploide. De esta forma, la relación entre la cantidad de amplicón telomérico (T) y la cantidad de amplicón del gen de albúmina (S) para cada muestra, expresada mediante el cociente T/S, permite comparar la longitud relativa de los telómeros entre las diferentes muestras de tejido. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados (Eurofins MWG Operon) en las q-PCR fueron las reportadas por Cawthon²¹ (2009).

De cada muestra se tomó el volumen inicial requerido dada su concentración de manera que el volumen final (20µl) tuviera una concentración de 16 ng/µl. Cawthon formula que por 25 µl de reacción total debe haber una concentración de DNA de 20 ng/µl, proporcionalmente se obtuvieron las cantidades muestrales. Las muestras de DNA extraído se descongelaron y se sometieron al vórtex y a la centrifuga un par de veces para asegurar su homogenización. En placas de 96 pozos se colocaron, triplicados de 1µl, cada una de todas las extracciones de DNA. A las placas de amplificación de telómero se les agregó, por pozo 19µl de mastermix T y a las de albúmina, 19µl de mastermix S:

²¹ Tabla 3. Metodología, secuencias de oligonucleótidos

Oligo	Secuencia (orientación convencional 5'→3')
telg	ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT
telc	TGTTAGGTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTAACA
albu	CGGCGGCGGGCGGGCGGGCTGGGCGGAAATGCTGCACAGAATCCTTG
albd	GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGAAAAGCATGGTCGCCTGTT

MMix T		MMix S	
TEL C	1.0909 μ l	ALBU	0.564617 μ l
TEL G	1.0392 μ l	ALBD	0.765306 μ l
BETAÍNA	4 μ l	BETAÍNA	4 μ l
DTT (1%)	0.2 μ l	DTT (1%)	0.2 μ l
H₂O	2.66 μ l	H₂O	3.4701 μ l
SYBRG²²	10 μ l	SYBRG	10 μ l

(Tabla 4. Metodología, mastermix)

Las placas fueron selladas, sometidas al vórtex y a la centrifuga otro par de veces. Cada placa fue sujeta al termociclador ABI 7300 System SDS controlado con el software SDS versión 1.2.3 (Applied Biosystems) en un ensayo de cuantificación absoluta de los 96 pozos con 20 μ l de volumen de reacción, cada uno, bajo el perfil térmico correspondiente y temperatura de lectura respectiva.

AMPLIFICACIÓN	P.T. TELÓMERO					
ESTADIO	STAGE 1	STAGE2		STAGE 3		
# REPETICIONES	1	2		32		
TEMPERATURA	95°C	94°C	49°C	94°C	62°C	65°C (lectura)
TIEMPO	10:00 min	0:30 min	0:30 min	0:30 min	0:30 min	0:30 min (lectura)

²²Agente reportero intercalante inespecifico de bases de DNA incorporado a la nueva molécula de DNA generado que al excitarse mediante una fuente luminosa genera fluorescencia detectada por el sistema óptico.

AMPLIFICACIÓN	P.T. ALBÚMINA					
ESTADIO	STAGE 1	STAGE 2			STAGE 3	
# REPETICIONES	1	2			32	
TEMPERATURA	95°C	94°C	49°C	94°C	62°C	74°C (lectura)
TIEMPO	10:00 min	0:30 min	0:30 min	0:30 min	0:30 min	0:30 min (lectura)

(Tabla 5. Metodología, perfiles térmicos)

La cuantificación relativa se realizó mediante el método ΔCt (threshold cycle). $\Delta Ct = Ct_{\text{gen interés (blanco)}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$; el gen de interés es el que nos interesa cuantificar, el gen endógeno es de expresión constitutiva cuyos niveles no cambian en las condiciones experimentales usadas. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra interés (tratamiento)}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$; la muestra interés es el templado en estudio (proviene del organismo bajo las condiciones de estudio), el calibrador es la muestra control. Una vez obtenido este último valor se emplea como exponente de 2, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que refleja la proporción de cambio que existe entre las muestras²³.

Determinación de la presencia de telomerasa

La determinación de la presencia de Telomerasa se realizó a partir de ensayos de inmunohistoquímica²⁴. Los tejidos de hígado del modelo de TAA, embebidos en bloques de parafina, se cortaron con microtomo y se colocaron por duplicado en laminillas de portaobjetos de vidrio.

²³La muestra de referencia o calibrador siempre tendrá valor de 1, ya que se obtiene de restarle su propio valor de Ct, entonces el valor resultante es 0, cualquier número elevado a una potencia de 0 es equivalente a 1.

²⁴Técnica de inmunotinción que permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos específicos marcados directamente o mediante un anticuerpo 2º acoplado a una enzima, en éste caso fosfatasa alcalina. La técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos a unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo 1º ó 2º está acoplados a una enzima capaz de reaccionar con una sustancia que produce coloración al precipitarse. Mediante esta reacción se identifican diversas macromoléculas.

Inicialmente, las laminillas se desparafinaron durante 25 minutos en xileno (deshidratación y disolución de grasa parafina) y fueron sometidas a lavados para rehidratación con alcohol (desplazando al xileno) al 100%, 96%, 70% y 50% durante 5 minutos en cada lavado. Los siguientes 10 minutos estuvieron inmersas en agua doblemente destilada. A continuación, en coplins (porta laminillas de vidrio) con buffer de citrato, a pH 6, permanecieron dentro de una olla exprés por 5 minutos para romper los puentes covalentes formados por el fijador y entonces recuperar las proteínas nativas: recuperación antigénica. Cuando, paulatinamente, la temperatura del contenedor bajó, se enjuagaron los tejidos con H₂O doblemente destilada por 5 minutos. Se les agregó, a los tejidos, HCl al 0.3M por 10 minutos (para bloquear la fosfatasa endógena) para después estar inmersos en TBS 1x por 5 minutos más. Posteriormente se les agregó, a cada uno, 50 µl de la solución bloqueadora 1:10 H₂O_{dd} (Qiagen, universal blocking reagent, cat.# HK085-5K) (bloqueo de cargas en tejido para evitar marcaje inespecífico). Después de 10 minutos se les retiró la solución para ahora agregar 50 µl de suero de oveja (1:100_{TBS/Tween}) por 45 minutos. Inmediatamente después se incubaron en atmósfera húmeda por 2 noches con 50 µl de del anticuerpo primario respectivo (1_{anticuerpo(+)} Msm Ab to telomerase [2C4] ab 5181:100_{TBS/Tween}; 1_{anticuerpo(-)} Negative Control Mouse IgG1 Ref X0931:100_{TBS/Tween}). Al segundo día se les colocó el anticuerpo 2^o (1_{Goat pAB to Ms IgM (AP) iab 5931:250_{TBS 1x/Tween 0.05%}}) adsorbido con polvo de hígado de rata (para bloquear anticuerpos inespecíficos), (mezcla previamente incubada en balancín por 30 minutos y centrifugada por 15 mins a 13,000rpm) se incubaron por una noche más. A las laminillas se les enjuagó el anticuerpo 1^o con TBS_{1x}/Tween_{0.05%} y los tejidos estuvieron inmersos en NaCl_{0.3M}/TBS_{1x}/Tween_{0.05%} por 10 minutos previamente a la colocación del segundo anticuerpo. Al tercer día las laminillas se enjuagaron con TBS_{1x} y se lavaron con Buffer 1 y Buffer 2 por 15 minutos cada uno. Durante los siguientes 10 minutos, los tejidos fueron expuestos a la solución reveladora (1ml Buffer2/20µl NBT/BCIP_(Nitro Blue Tetrazolium, Roche:12761220)/1µl levamizol, inhibidor de fosfatasas menos la alcalina de intestino, utilizada en esta técnica). La reacción se detuvo con H₂O. Se contratiñeron con eosina Y 0.25% (eosina/ac. acético) y se montaron con resina acuosa.

El tejido de las laminillas se observó con el microscopio Nikon microphot-FXA. Se realizó un conteo por laminilla, de 880 células. Se cuantificaron 5 laminillas para cada una de las fases experimentales (una por cada rata con tratamiento de TAA) y 3 para cada grupo control, de cada fase (una por cada rata control). De manera que se cuantificaron aproximadamente 4 400 células para cada fase experimental y 2 640 para cada grupo control. Posteriormente del total de células contadas de cada fase se extrajo el número de células que presentaban reacción positiva, es decir, en donde había presencia de telomerasa.

Pruebas estadísticas

El análisis de varianza, ANOVA, es un método de prueba de igualdad de tres o más medias poblacionales, por medio del análisis de las varianzas muestrales (Triola, 2009, 10ªed). Esta prueba se ajusta al experimento ya que se compararon 10 medias (5 grupos controles y 5 experimentales) en la determinación de longitud telomérica. La prueba estadística se realizó mediante el programa en línea de la página <http://www.physics.csbsju.edu/>.

La prueba de comparación múltiple de Bonferroni utiliza pares de medias (Triola, 2009, 10ªed). En ésta, se hacen ajustes para superar el problema de tener un nivel de significancia que aumente conforme se incrementa el número de pruebas individuales. Esta prueba se usó para comparar los datos de las fases por grupo de la determinación de longitud telomérica. Durante la prueba Bonferroni se realiza una prueba t separada para cada par de muestras pero usando el valor CM (Cuadrados medios del error) para obtener un estimado de la varianza (que es común a todas las poblaciones implicadas). $CM_{(\text{del error})}$ utiliza todos los datos muestrales disponibles ya que $CM_{(\text{del error})} = SC_{(\text{del error})} / (N - k)$; donde Suma de Cuadrados del error = $\sum (n_i - 1) s_i^2$; (n_i = número de valores en el grupo y s_i^2 = varianza de los valores), N es el número total de valores en todas las muestras combinadas (111, en este caso), y k es el número de muestras (10, 5 experimentales y 5 controles). $CM_{(\text{del error})}$ se obtiene al realizar la prueba ANOVA. Se utiliza para calcular el valor

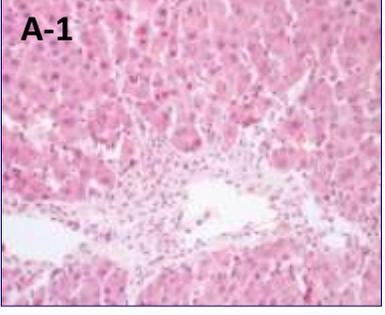
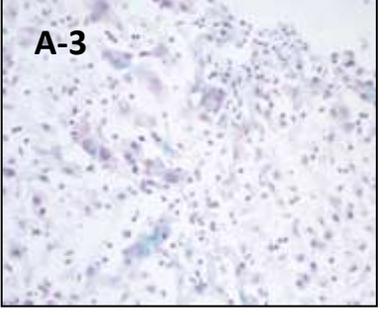
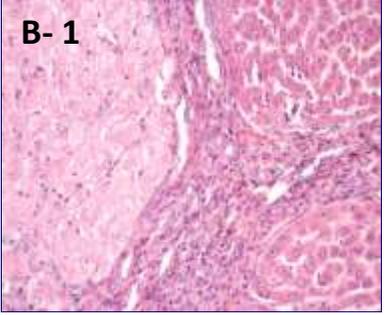
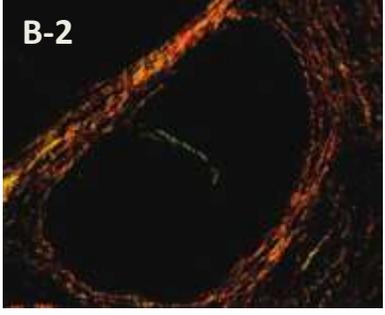
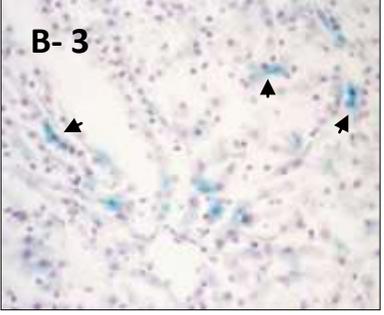
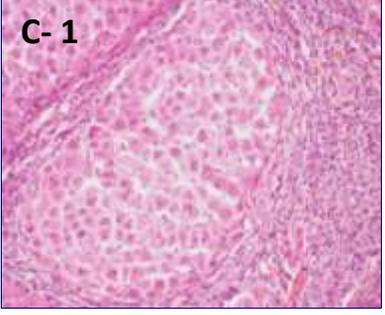
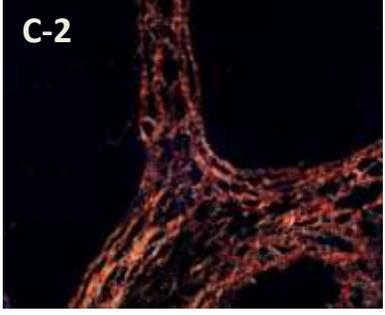
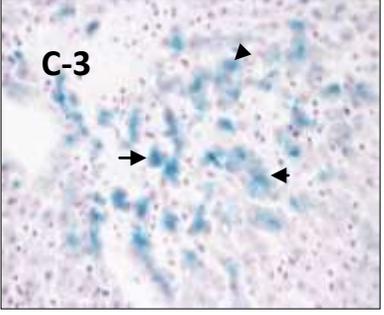
estadístico de la prueba $t: t = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{\sqrt{CM_{(del\ error)} * (\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b})}}$. A continuación se calcula el valor crítico

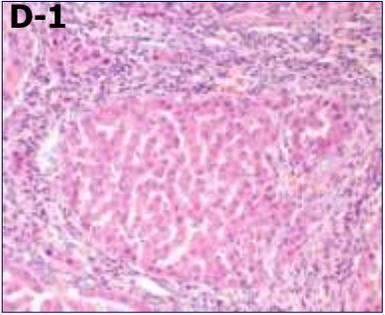
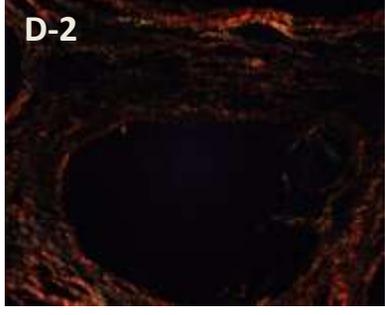
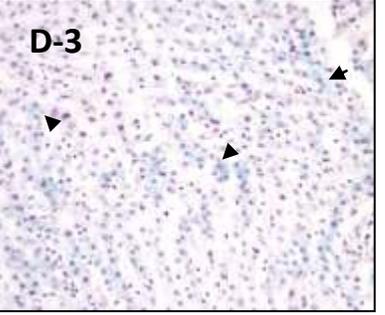
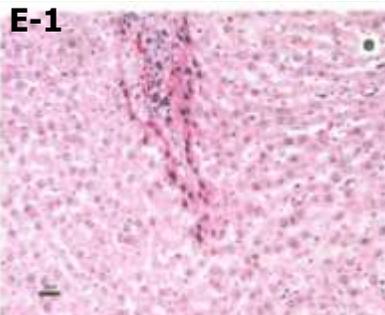
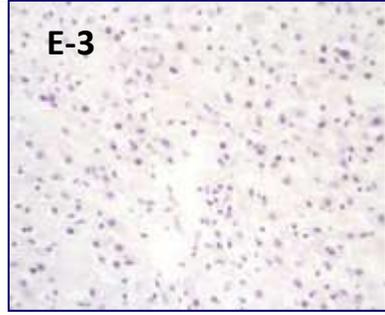
utilizando gl (grados de libertad)= N-k= 101 y un nivel de significancia α ajustado de 0.05/45=0.001111111(45 es el número de pares de muestras diferentes posibles). 0.001111111, nivel de significancia ajustado, se acerca al área de 0.001.

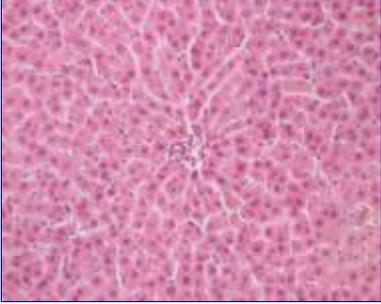
Por último, la prueba de Mann-Whitney es un método no paramétrico que se usa para determinar si hay diferencia entre dos poblaciones, utilizando muestras independientes. Por medio de ésta, se compararon los resultados de presencia de telomerasa. La prueba no requiere que los datos sean de intervalo ni que las poblaciones tengan una distribución normal, el único requisito es que la escala de medición de los datos sea por lo menos ordinal. En lugar de probar las diferencias entre las medias de las dos poblaciones, la prueba determina si las dos poblaciones son idénticas (ésta es la hipótesis nula).

Monitoreo del Modelo

Las siguientes imágenes muestran, en arreglo vertical, cortes teñidos con hematoxilina-eosina de las 5 fases tratadas con TAA y del control, (*Tinción H & E; amplificación 25X*). Se encuentran comparados con las imágenes de la segunda columna, teñidas con Rojo de Sirio y observadas con luz polarizada que muestran el total de colágena en cada grupo. Estas mismas muestran la correlación de cortes paralelos teñidos con H & E en cada etapa. Conforme avanza el modelo, aumenta la desproporción entre las fibras de colágena tipo I (rojo) y tipo III (verde) (*Tinción Rojo de Sirio, observada con luz polarizada. Amplificación 25X*). En la tercera columna se expone la actividad de SA- β -gal durante las diferentes etapas. Como reacción positiva se observa el precipitado azul turquesa en el citoplasma de los hepatocitos (flecha), característico de esta reacción. Desde la primera fase del tratamiento, y su aumento paulatino hasta la finalización del proceso inductor. Se aprecia la caída de la actividad enzimática a los 30 días de suspensión del tóxico (*Contratinción con Hematoxilina. Amplificación 25x*).

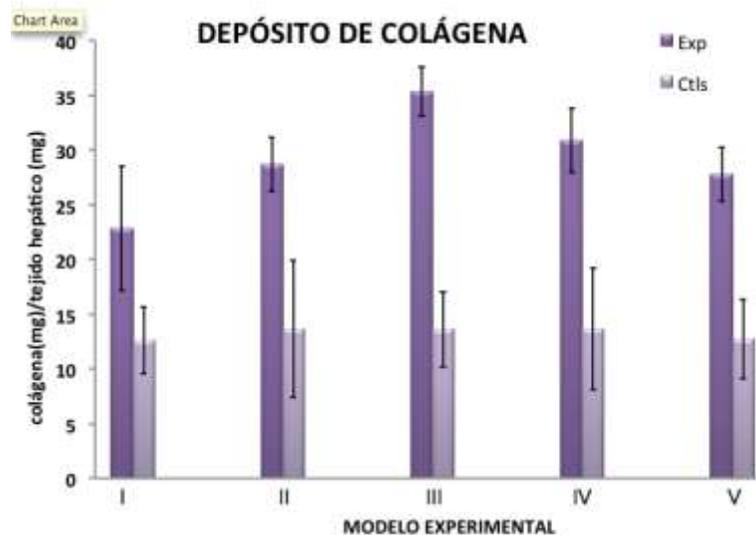
FASE	<i>(Tinción H & E; amplificación 25X)</i>	<i>(Tinción Rojo de Sirio, observada con luz polarizada. Amplificación 25X)</i>	<i>(Contratinción con Hematoxilina. Amplificación 25X)</i>
Fase I			
	<p>A-1) 1ª Etapa: bandas gruesas y delgadas de fibrosis periportal; A-2) 113.5 mg colágena/mg; A-3) porcentaje de SA-β-gal: 12.6%.</p>		
Fase II			
	<p>B-1) 2ª Etapa: tabiques fibróticos que rodean nódulos de regeneración; B-2) 121.5 mg colágena/mg; B-3) porcentaje de SA-β-gal: 30%- 25.4%, actividad localizada en citoplasma de los hepatocitos en nódulos de regeneración y en su periferia así como en las bandas fibróticas. La tinción positiva se presenta a partir de esta etapa en la periferia del nódulo y en zonas internas del mismo.</p>		
Fase III			

	<p>C-1)3a Etapa: zonas de infiltrado linfocitario, inflamación, isquemia y necrosis focal; C-2) etapa con predominio de presencia de fibras de colágena 119.7 mg colágena/mg. C-3) porcentaje de SA-β-gal: 62.4%, actividad localizada en citoplasma de los hepatocitos en nódulos de regeneración y en su periferia así como en las bandas fibróticas. La tinción positiva se presenta en la periferia del nódulo y en zonas internas del mismo, aumentando en forma incuestionable.</p>		
Fase IV	 <p>D-1)</p>	 <p>D-2)</p>	 <p>D-3)</p>
	<p>D-1)4^a Etapa: estado cirrótico. Hiper Cromatismo nuclear, binucleación, citoplasma granular, pálido y algunos hepatocitos anucleares; D-2) 116.4 mg colágena/mg. D-3) porcentaje de células con actividad de SA β-gal: 7.5%, drástica disminución de la tinción, a los 30 días posteriores a la suspensión del tratamiento.</p>		
Fase V	 <p>E-1)</p>	 <p>E-2)</p>	 <p>E-3)</p>
	<p>E-1) 5ta etapa: nódulos de regeneración rodeados con alta proliferación. Se observa enucleación, binucleación, hiper cromatismo nuclear y pérdida de la relación núcleo-cromosoma. E-3) actividad de SA-β-gal nulificada.</p>		

Control		
	Control normal, los grupos controles (-3) tenían una histología hepática normal y no se les detectó actividad de SA-β-gal.	

(tabla 6. Seguimiento del modelo)

Seguimiento del depósito de colágena en el Modelo



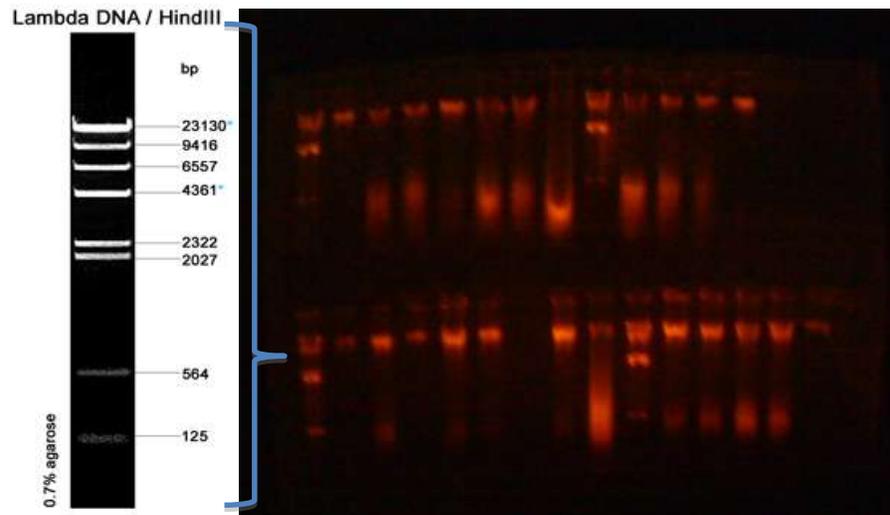
(Gráfica 3, seguimiento del modelo)

La concentración de colágena en animales experimentales va en aumento conforme progresa el desarrollo del modelo. En la fase III es donde se encuentra la mayor cantidad de depósito de colágena correspondiente al grupo con más fibrosis.

El monitoreo del modelo se realiza continuamente en el laboratorio para asegurar la validez del modelo de fibrosis.

Resultados y Discusión

Geles de integridad de DNA



(Imagen 1.1 Resultados y Discusión, geles de integridad de DNA de la fase IV del modelo de fibrosis. La fila superior muestra la primera elución y la fila de abajo muestra la segunda elución.)

La imagen muestra el resultado de la extracción de DNA, en ella aparecen primeras y segundas diluciones (seleccionadas para su uso durante el resto del experimento) de la fase IV (más imágenes en [Anexo P](#)). El marcador λ DNA/HindIII se obtiene a partir de ADN del fago λ digerido con HindIII hasta generar bandas entre 0.125 kb y 23 kb, aptas para ser utilizadas como marcadores de peso molecular en geles de agarosa. Este marcador se compone de 8 fragmentos de ADN individuales purificados (en pares de bases): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125.

Datos espectrofotómetro

La lectura de cada muestra obtenida por el espectrofotómetro de las muestras del modelo de de fibrosis inducida con tioacetamidase encuentran en las tablas del [Anexo P.1](#).

Datos Diluciones

Los datos de la concentración inicial y volumen inicial de cada muestra para obtener una concentración final de 16 ng/ μ l y un volumen de 10 μ l en el modelo TAA se encuentra en las tablas del [Anexo P.2](#).

Longitud del telómero (q-PCR)

La PCR en tiempo real ha conseguido una amplia aceptación debido a su rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y riesgo reducido de contaminación, ya que la generación del amplicón se puede observar conforme la amplificación progresa. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado.

Durante el proceso de amplificación se distinguen tres fases en la cinética de amplificación: geométrica, lineal y estacionaria²⁵. La identificación de éstas fases sirve para demostrar que tan correcto es el método. Durante la fase geométrica se define un punto de intensidad de fluorescencia o umbral²⁶, en el cual todas las muestras puedan ser comparadas entre sí. Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar a este umbral de detección se le conoce como Ct²⁷ (threshold cycle, ciclo de umbral de detección). Este valor es indirectamente proporcional a la cantidad inicial de templado y es el fundamento para calcular la cantidad de DNA. Mientras mayor cantidad de DNA se encuentre en una muestra, menor número de ciclos requerirá para alcanzar el umbral de detección y el valor Ct será menor. Cada muestra alcanza el valor umbral (threshold) en un ciclo diferente. El

²⁵ Fase geométrica: todos los reactivos se encuentran en abundancia, la eficiencia de amplificación es cercana al 100% y el comportamiento de la cinética es de 2^n en donde a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA. $P=T*2^n$ (P: cantidad de product generado a n ciclos, T: cantidad de templado inicial).

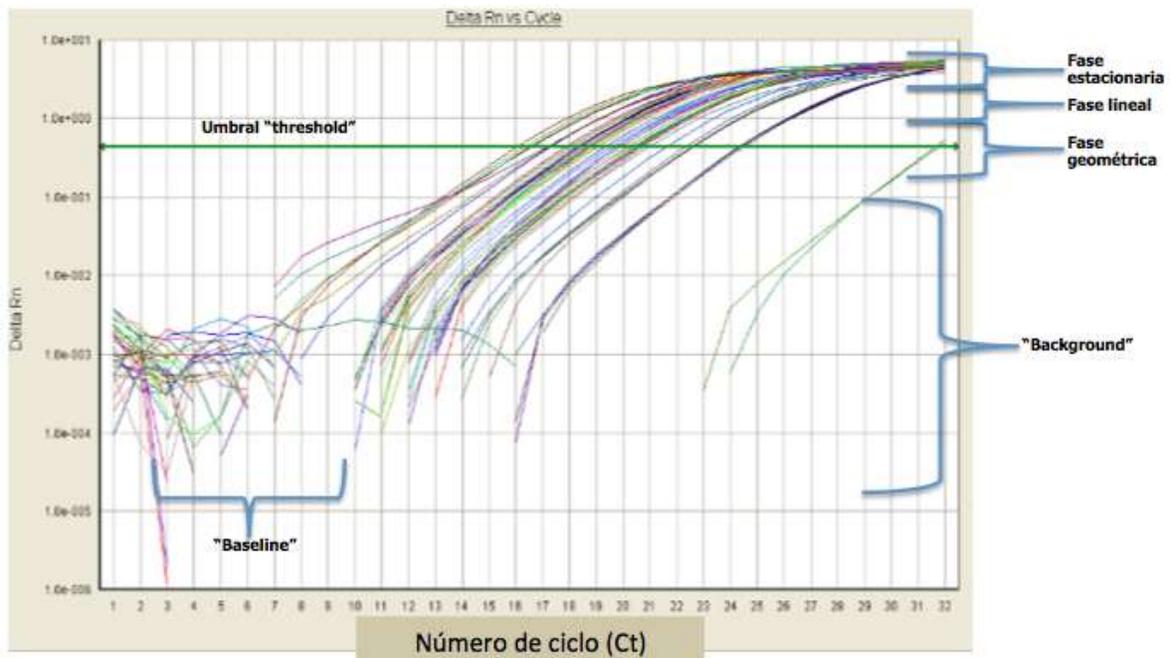
Fase lineal: los *primers*, dNTP's y/o enzima comienzan a ser factores limitantes además de la generación de pirofosfato y decaimiento de la actividad enzimática que afectan la eficiencia de amplificación de manera constante, no es posible llevar a cabo un ensayo cuantitativo en esta parte.

Fase estacionaria: detención de la amplificación, la cantidad de producto obtenida es constante sin importatar cuantos ciclos más se prolongue la reacción.

²⁶El umbral de detección equivale a 10 veces la desviación estandar de la media de emisión de la linea basal. La línea basal (Baseline) se obtiene durante los ciclos iniciales de la PCR en los cuales el cambio de la señal de fluorescencia es mínimo.

²⁷Ct es el número fraccional que indica cuantos ciclos le tomó a cada muestra generar cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección.

software SDS es capaz de calcular de manera automática los valores de Baseline (línea base) y threshold. A continuación se presenta una gráfica resultante de una placa de 96 pozos que contiene las primeras 2 fases.



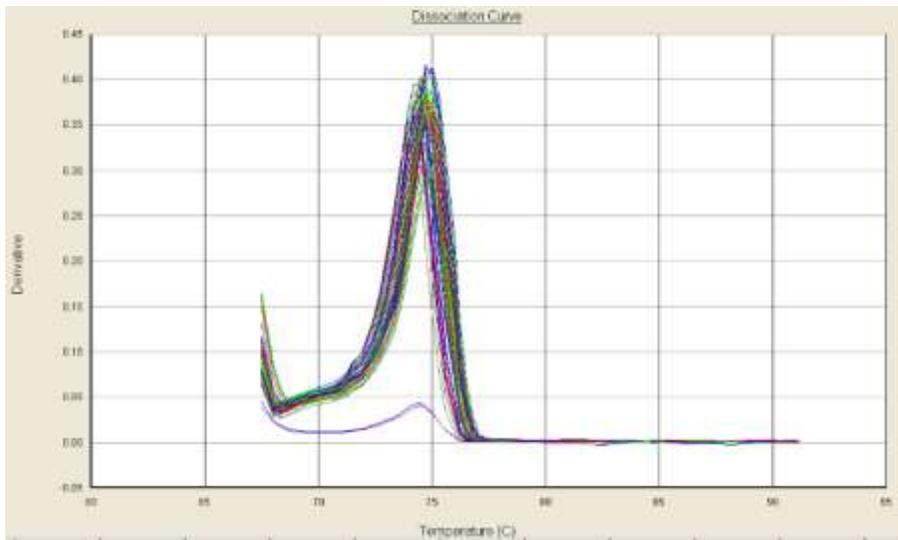
Threshold: 0.4434183

(Gráfica 4.1 Resultados y Discusión: qPCR)

En la gráfica anterior, 4.1, se observan diferentes muestras amplificadas, cada muestra alcanza el valor umbral "threshold" en un ciclo diferente (Ct). Aunque las muestras inicialmente reportan concentraciones distintas, en la fase estacionaria alcanzan la misma cantidad de producto amplificado. Con esta gráfica se corrobora que no se necesitó hacer ajustes de umbral ya que el resultante (Gráfica 4) era el adecuado.

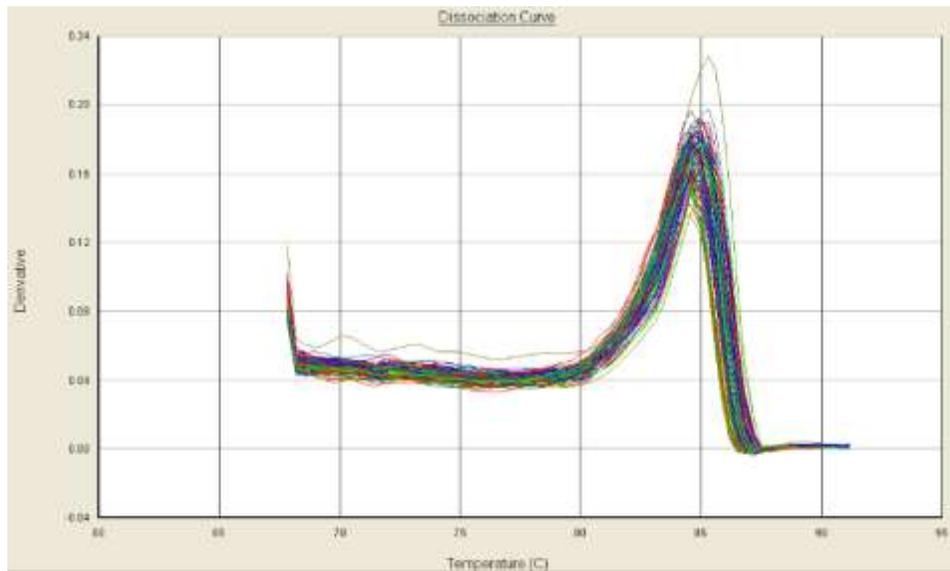
Para validar el uso de SYBR Green, se probó que sólo un producto de amplificación se está generando en la reacción y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular (no a dímeros de iniciadores o productos inespecíficos). Ésto se realizó mediante

un ensayo de disociación²⁸. El pico de la gráfica 4.2 representa la T_m de un producto de PCR específico, detector de telómero.



(Gráfica 4.2 Resultados y Discusión: qPCR)

El pico de la gráfica 4.3 corresponde a la T_m del detector albúmina.



(Gráfica 4.3 Resultados y Discusión: qPCR)

²⁸Validación SYBR Green: la temperatura se incrementa gradualmente hasta 96°C, registrando la intensidad de fluorescencia durante este proceso. Al incrementar la temperatura las cadenas de DNA se desnaturalizan gradualmente disminuyendo la intensidad de fluorescencia registrada. Al llegar a la T_m del amplicón (fragmento de DNA amplificado durante la PCR), la velocidad de disociación se incrementa drásticamente dado que el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado, la curva de disociación presentará un punto de inflexión a esta temperatura. La derivada negativa resulta en un pico que corresponde a la temperatura de desnaturalización del producto de amplificación presente en la reacción. Si durante la reacción se generaron varios productos inespecíficos o dímeros, estos tendrán también un pico de disociación ya que esta temperatura depende del tamaño y contenido de bases de cada producto en particular.

Las 2 gráficas anteriores presentan claramente curvas de disociación que comprueban que sólo un producto de amplificación se está generando en la reacción ya que únicamente se forma un pico por gráfica.

La tabla con los datos resultantes de cada muestra del método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) del tratamiento con TAAse encuentra en el [Anexo P.3](#). La tabla de los datos promediados de cada muestra triplicada se encuentra en el [Anexo P.4](#).

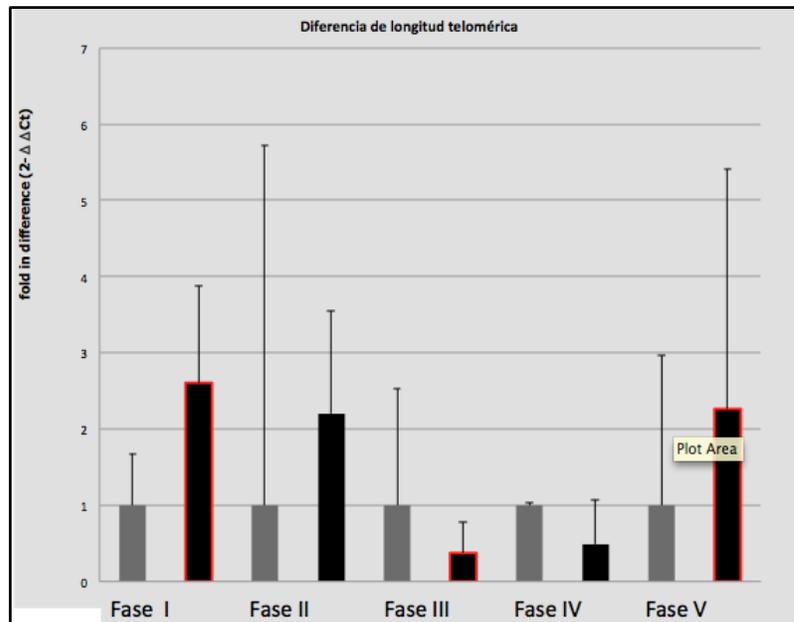
Promedio de cada grupo control y experimental:

muestras por fase TAA	promedio $\Delta\Delta Ct$ por fase	# de veces de diferencia ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	desviación estandar
I:C	3.33333E-08	0.999999977	0.671818812
I	-1.381999967	2.606294239	1.263265004
II:C	-3.33333E-08	1.000000023	4.714287703

II	-1.139333367	2.202792141	1.345386542
III:C	4.44445E-09	0.999999997	1.537241476
III	1.41955556	0.373827457	0.401789164
IV:C	3.33333E-08	0.999999977	0.031044
IV	1.033000033	0.488692872	0.576397748
V:C	3.33333E-07	0.99999999	1.966309854
V	-1.178749667	2.26380496	2.609406096

(Tabla 7.1 Resultados y discusión: qPCR)

La siguiente gráfica, 4.4, muestra la diferencia en longitud telomérica de los 5 grupos, cada fase experimental (5) con sus respectivos controles (5).



(Gráfica 4.4 Resultados y Discusión: longitud telomérica)

Las barras en gris representan a los grupos control, las barras en negro corresponden al grupo experimental de cada fase (las barras delineadas con rojo denotan diferencia significativa). Debido a que los grupos controles son los calibradores en el método $\Delta\Delta C_t$ todos tienden a 1. Los demás grupos experimentales muestran una clara tendencia a disminuir en tamaño telomérico conforme se presenta el cuadro fibrótico. Es claro que el daño y la regeneración continuos, aceleran el acortamiento del telómero de las células en proliferación (se supone: HSC y hepatocitos, principalmente). Asimismo, durante la recuperación, en las últimas dos fases (IV y V) se aprecia un incremento en el tamaño del mismo.

Las medias de los grupos fase, en general, presentan diferencias significativas de acuerdo a la prueba ANOVA²⁹, $P=0.011 < 0.05$, con un nivel de confianza de 95% y 5% de significancia ($\alpha = 0.05$). La probabilidad de obtener medias iguales (H_0 , hipótesis nula) es menor a 0.0001 (siendo que la probabilidad va de 0 a 1). Por otro lado, la media de la fase experimental 1 comparada mediante la prueba t (de Bonferroni) con la media de la fase experimental 3 cae en el rango crítico de $t_{\alpha(0.001)}$ por lo que rechazamos la H_0 (medias iguales), la diferencia es significativa, así como la media de la fase 3 comparada con la de la fase 5 experimental³⁰ (delineadas con rojo). Para ver más datos resultantes de la prueba de análisis de varianzas (ANOVA), consultar el [Anexo P.5](#).

²⁹ Tabla 7.2 Resultados y Discusión: ANOVA

Fuente de variación	SC (suma de cuadrados)	gl (grados de libertad)	CM (cuadrados medios)	F
tratamientos	104.8	9	11.64	4.283
error	274.4	101	2.717	
total	379.2	110		

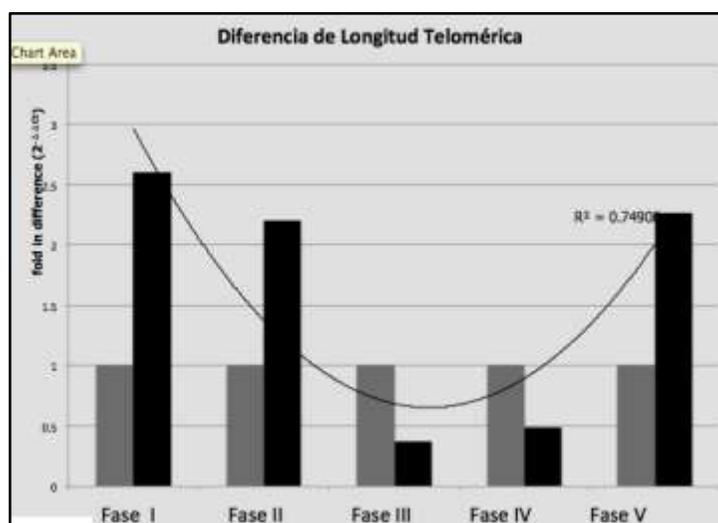
La probabilidad de obtener éste resultado, asumiendo la hipótesis nula (medias iguales), es menor a 0.0001 (siendo que la probabilidad va de 0 a 1).

³⁰ Tabla 7.3 Resultados y Discusión: comparación estadística de grupos

grupos comparados	t	valor t crítico prueba de 2 colas, gl=101, n.s= 0.01	valores que se encuentran en la región crítica ($2.626 \leq x$ ó $x \leq -2.626$)
Ctl I vs Exp. I	-2.609348908	±2.626	
Ctl II vs Exp. II	0.755543229		
Ctl III vs Exp. III	1.471108859		

Los resultados de la gráfica anterior concuerdan con el resultado de los experimentos preliminares. Fue durante la fase 3 cuando los niveles de concentración de colágena (fibrosis), la actividad de la SA-β-gal y la expresión de p16, p21 y p53 (senescencia) aumentan de manera significativa. A su vez, en los cortes histológicos, de las muestras de la fase 3, es donde se aprecia el cuadro más avanzado de la fibrosis. Mientras el cuadro fibrótico avanza, el tamaño telomérico disminuye y en las fases en donde las muestras se restabilizan (según los datos preliminares: IV y V) el tamaño telomérico incrementa.

En la gráfica 4.5 expone la correlación entre los grupos fase y el valor de longitud del telómero promedio.



(Gráfica 4.5 Resultados y Discusión: correlación de longitud)

Esta gráfica muestra la correlación polinomial (R^2)= 0.74908. El 74.9% de las diferencias en longitud se encuentran explicadas mediante la fase del modelo experimental.

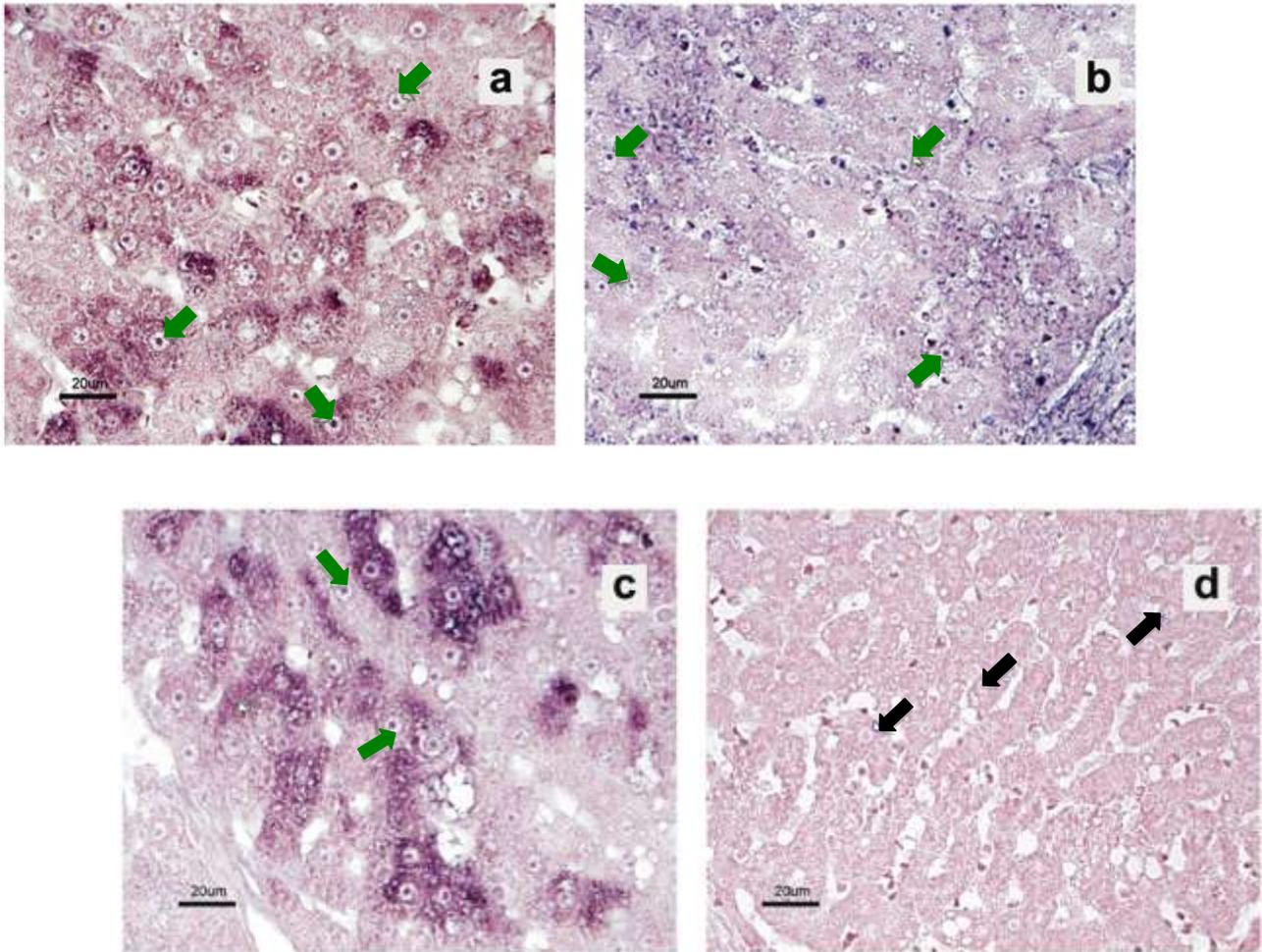
Ctl IV vs Exp. IV	0.691696321		
Ctl V vs Exp. V	-0.850796258		
Exp. I vs Exp.III	-4.176589239		-4.176589239
Exp.III vs Exp.V	-2.961467561		-2.961467561

En las 2 primeras etapas (grupos 1-2) los animales presentaron fibrosis hepática (leve, 12.6% SA- β -gal y 15% presencia de p16, en grupo 1), el grupo 3 desarrolló cirrosis con nódulos regenerativos y agregación de ductos biliares hiperplásicos en áreas fibróticas. La determinación del acortamiento telomérico mediante qPCR mostró un decremento gradual a partir de la segunda fase y una ligera recuperación en el tamaño del telómero en las últimas dos fases del modelo experimental. Este efecto se esperaba debido a que el hígado mostró nódulos de regeneración (grupos 4-5). Parece que el acortamiento del telómero se asocia al proceso cirrótico como resultado de la continua regeneración de las células estelares y de los hepatocitos y asimismo es un factor mecánico que contribuye al desarrollo de cirrosis. Debido a que el parénquima, hepatocitos³¹, ocupa más del 60%, aproximadamente, del hígado, mientras que las HSC sólo alrededor del 15%, y son, los hepatocitos, el grupo celular con mayor proliferación durante la recuperación, el incremento del tamaño telomérico esté dado por éste grupo, sin necesariamente deberse a un proceso displásico. Cabe mencionar que el proceso senescente en las HSC coopera con la recuperación del órgano ya que detiene el depósito de colágena formadora de fibrillas.

³¹ El porcentaje de hepatocitos es directamente proporcional a su importancia celular y es de suma importancia su recuperación. La membrana celular de un hepatocito caracterizada por un sinfín de microvellosidades está en contacto con el espacio de Disse, con otros hepatocitos y con un canalículo biliar. Éstos son responsables de funciones endócrinas como son la síntesis de glucógeno y la secreción de glucosa, la síntesis de proteínas sanguíneas como las albúminas, fibrinógeno y la mayor parte de globulinas y el control de la concentración de lípidos (lipoproteínas) en la sangre; tienen también funciones exocrinas de detoxificación (bilis) por medio de los canalículos biliares y conductos de Hering (Ham, 1975).

Presencia de Telomerasa (IHQ)

Imágenes representativas de la expresión de la telomerasa, mediante la técnica de inmunohistoquímica, en muestras obtenidas de secciones de hígado embebido en parafina. Las imágenes corresponden al grupo fase IV.

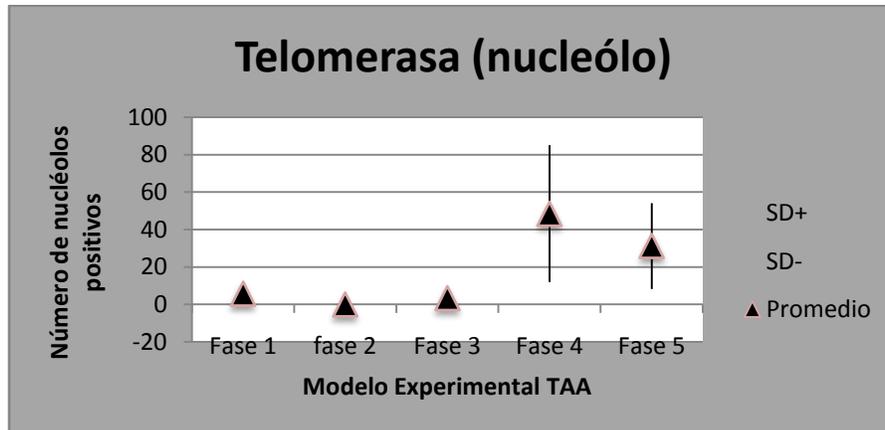


(Grupo de Imágenes 2. Resultados y Discusión: IHQ)

La tinción positiva se observa en los nucleólos de los hepatocitos (flechas verdes de las figuras a, b y c); en la figura d, correspondiente al control negativo, se muestra con flechas la ausencia de reacción positiva en los nucleólos. La reacción se reveló con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, con NBT/BCIP como sustrato; se usó eosina acuosa para contrateñir las muestras.

La tabla con los datos del conteo de células con expresión de telomerasa se encuentran en el [Anexo Q](#). Asimismo, en el [Anexo Q.1](#) se pueden encontrar los datos estadísticos.

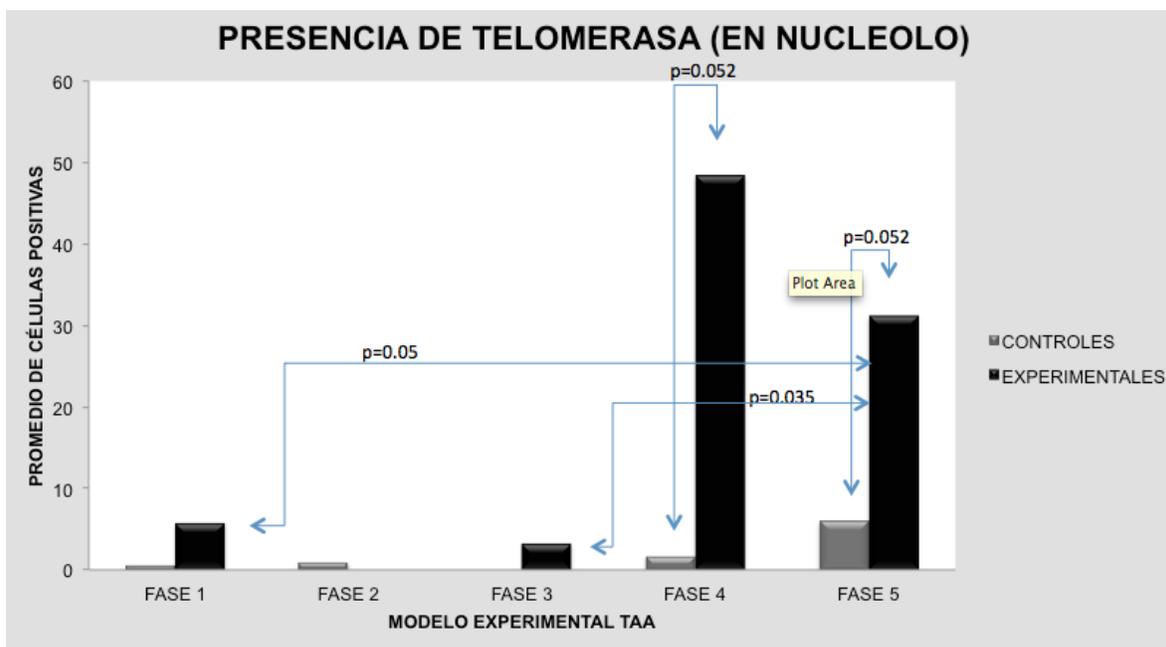
La siguiente gráfica muestra de manera general la cuantificación de presencia de telomerasa en una de las dos principales zonas en donde se encontró, nucleólo.



(Gráfica 5.1 Resultados y Discusión: presencia de telomerasa)

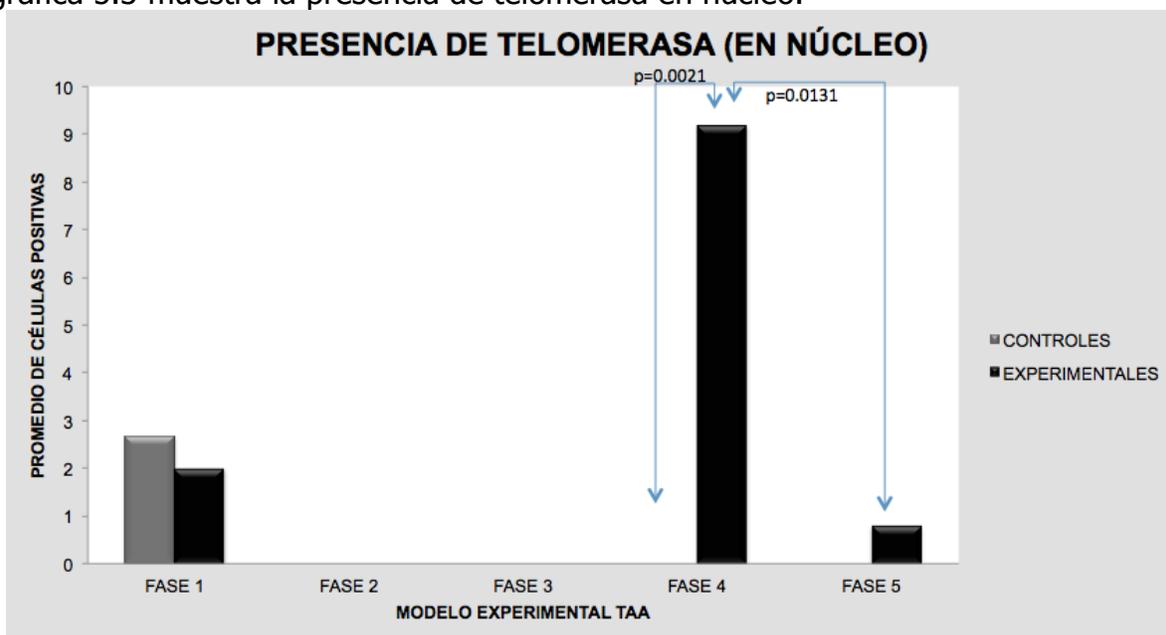
Los triángulos denotan el promedio de los nucleólos positivos de todas las ratas experimentales de cada fase; los extremos de las líneas negras demuestran el mayor y menor número de células con nucleólo positivo encontradas en una biopsia en particular en cada fase. Durante las primeras tres fases, la variación de la expresión de la telomerasa es mínima, sin embargo durante la cuarta fase es donde aumenta de manera significativa, aproximadamente 5 veces. Cabe mencionar que durante la quinta y última fase, la expresión de la enzima decrece cerca de un 40% con respecto a la cuarta etapa.

La gráfica 5.2 muestra la presencia de telomerasa en nucleólo en los grupos experimentales y control.



(gráfica 5.2 Resultados y Discusión: presencia de telomerasa en nucleólo)

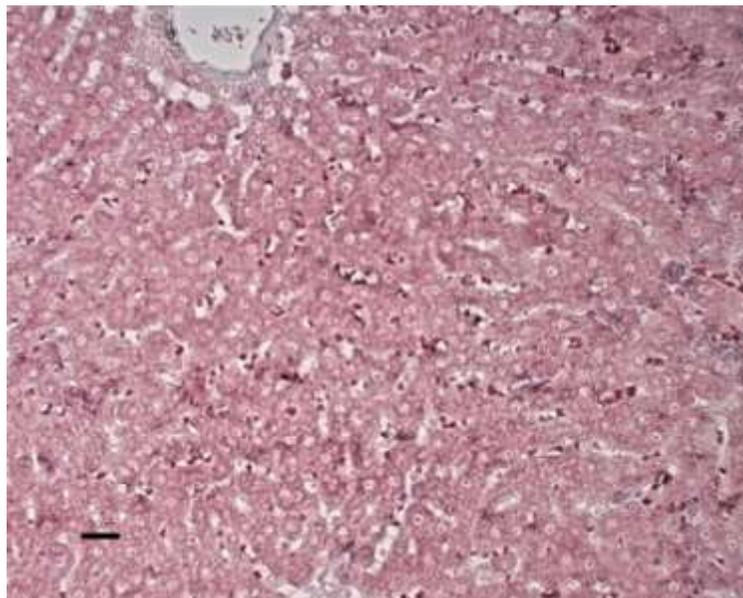
La gráfica 5.3 muestra la presencia de telomerasa en núcleo.



(gráfica 5.3 Resultados y Discusión: presencia de telomerasa en núcleo)

El ensayo inmunohistoquímico para la determinación de telomerasa indicó una aparente reactivación de su expresión durante las últimas dos fases, lo que concordó con la recuperación del tamaño del telómero. Estos resultados sugirieron que el mecanismo mediante el cual la senescencia pudo revertirse posiblemente se debió al incremento gradual de la expresión de la telomerasa que conllevó a la recuperación del tamaño del telómero, acompañado del menoscabo en la actividad reguladora de las proteínas p16, p21 y p53. Sin embargo esta sugerencia no se puede aseverar debido a que los resultados mostrados presentan datos de presencia y no de actividad, por lo que no se puede concluir que la recuperación telomérica y la reversión senescente se deba al aumento de la enzima.

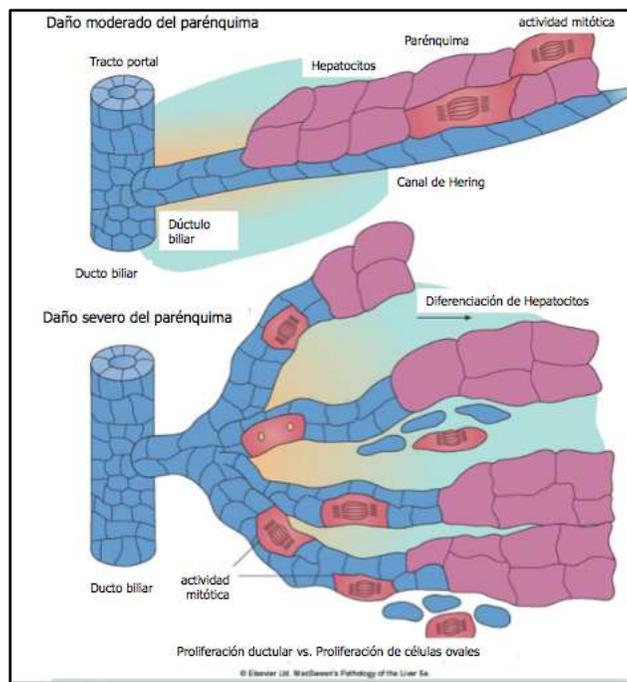
La presencia de la telomerasa no justifica la posible aparición de un proceso neoplásico ya que en las imágenes histológicas no se aprecian claramente células displásicas. Durante las fases 4 y 5 se logran identificar ciertas características displásicas, descritas en el monitoreo del modelo, como son hipercromatismo nuclear, binucleación, citoplasma granular, pálido y algunos hepatocitos anucleares. Sin embargo no se puede hablar con seguridad de un proceso neoplásico. Las células pertenecientes a la última fase, en proliferación, parecen ser células en recuperación.



(Imagen 3. Resultados y Discusión, células de la fase V en recuperación)

La imagen anterior (20x) muestra células en recuperación, con algunas características displásicas, mas no neoplásicas, pertenecientes a la fase (grupo) V, en donde los niveles de expresión de telomerasa decrecen ligeramente. Este decremento en el nivel de la presencia de telomerasa puede estar dado por la homeostasis en la recuperación funcional del organo durante la fase IV, lo que ocasionaria que en la siguiente fase, ya más recuperada, bajara el nivel debido a que ya no es necesaria la enzima.

El telómero recuperado durante las últimas dos fases (IV y V) puede pertenecer a diversos tipos celulares hepáticos presentes en las muestras de DNA analizadas. Probablemente, este incremento medido se deba a la proliferación de los hepatocitos en recuperación ó derivados de células madre bipotenciales presentes en los canales de Herring. Ya que en el hígado con daño severo y hepatocitos senescentes, se promueve la recuperación mediante células madre³² como se muestra en la siguiente imagen.



(Figura 9. Resultados y Discusión, proliferación ductular vs proliferación de células ovales)

³² Existen dos mecanismos de regeneración del parénquima en hígado; en respuesta a un daño moderado, la actividad mitótica de los hepatocitos es suficiente para mantener la masa hepática en un nivel adecuado. Sin embargo, cuando el daño es severo, la regeneración de los hepatocitos de células progenitoras del hígado. Éstas parecen ser derivados de células bipotenciales del ducto biliar/canales de Herring, la evidencia histológica es conocida como reacción ductular y/o producto del compartimento de células tronco o células ovales. La diferenciación a hepatocitos de las células progenitoras contribuyen a la proliferación nodular en el hígado cicatrizado característico de la cirrosis. (Alastair, 2007, 5th ed.)

Es en estas células en donde también pudiera haber un remanente de expresión de telomerasa, ya que se diferenciaron y proliferaron al convertirse en hepatocitos.

Es poco probable que el telómero recuperado y los niveles de telomerasa detectados por la IHQ correspondan a las HSC presentes en los tejidos de la fase 4 y 5; ya que estas células en el momento de la recuperación de la fibrosis dejan de proliferar y disminuyen en población. La mayoría de ellas al estar activadas mueren por apoptosis (no se puede asegurar que reviertan senescencia mediante la actividad de la telomerasa).

Conclusión

En las enfermedades hepáticas crónicas, el daño continuo y la concomitante regeneración aceleran el acortamiento del telómero, específicamente en los hepatocitos, quienes finalmente se convierten en senescentes y la recuperación de los mismos se detiene. Es evidente que el tamaño del telómero está en función del daño hepático/recuperación del órgano. La medición de la longitud telomérica arrojó, de manera adecuada, los resultados esperados. El acortamiento del telómero participa negativamente en el proceso cirrótico como consecuencia de la regeneración continua, y es un factor que interviene en el desarrollo de la cirrosis. Con este trabajo no se puede comprobar si la presencia de la telomerasa justifica la presencia del proceso proliferativo ni neoplásico en el modelo, ya que no se midió la actividad de la enzima. Por otro lado la fase 5, en donde se observa mayor índice de proliferación es en donde la medición de presencia de telomerasa disminuye. Aunque los datos obtenidos mediante la IHQ sugieren que existe una relación de la presencia de la telomerasa con la longitud telomérica, como se suponía en un principio.

Los niveles de senescencia están disminuidos en las últimas 2 fases, ya que en éstas se observa un alto índice de proliferación lo que lleva a una aparente recuperación del órgano. Esto último no se debe necesariamente por recuperación de telómero/ reactivación de telomerasa, también puede influir la aparición de células nuevas derivadas de los canales de Hering.

Se necesita más tiempo de seguimiento del experimento para comprobar la existencia de neoplasia y pruebas de actividad de telomerasa para poder correlacionarlas. Asimismo, mediante los resultados de actividad también se puede determinar si existe recuperación telomérica ó este incremento de tamaño (medido) se debe a la longitud del telómero de células nuevas.



CELLULAR SENESCENCE IN A MODEL OF EXPERIMENTAL FIBROSIS

Determination of Telomere Length recovery and Telomerase reactivation



Cequera A., Murga S., Senties K., Tello E., Gutiérrez-Reyes G., Gudiño M., Robles-Díaz G., Kershenovich D., Pérez-Tamayo R. y García de León-Méndez M.C. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México, México D.F.

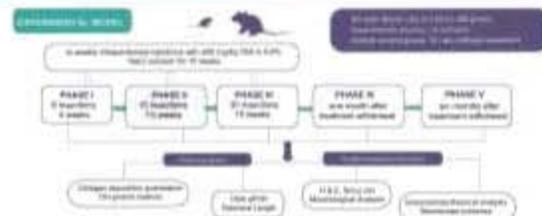
INTRODUCTION

The telomere shortening hypothesis in the chronic liver injury promotes destruction and regeneration waves resulting in cellular telomere length, which induces replicative senescence or hepatocyte death and finally cirrhosis. Thapsigargin (TAA) is a hepatotoxic drug. According to the dose-response relationship, this drug may produce gradual liver damage (inflammation, regeneration, fibrosis) and finally malignant transformation. The results of previous work suggested that regeneration occurs during the TAA-induced liver injury associated with altered expression and activity of cell cycle regulatory proteins, as a response to hepatotoxic induced damage. The aim of this study was to determine telomere length and the presence of telomerase in rat liver cells from animals treated with TAA and correlate the enzyme presence with the increased proliferation observed in the final phases of the model.

OBJECTIVE

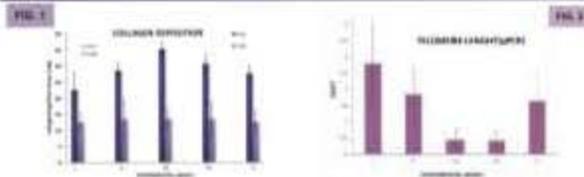
Determine that telomere shortening occurs in the cirrhotic process as a result of continuous liver regeneration and that the presence of telomerase is responsible for the increased cell proliferation in the model.

MATERIAL AND METHODS



Liver sections were prepared four days after the 8th, 13th and 10th injection and 30 and 180 days after the withdrawal of TAA (groups I-5 respectively). Liver DNA was used to determine the telomere shortening by qPCR. Telomerase was located by indirect immunohistochemistry on paraffin-embedded liver sections. To quantify the results' significance we used the Mann-Whitney correlation test.

RESULTS



Both, the quantification of collagen deposition, Sirius red and H & E stains of samples collected from all animals allowed us to monitor the development of the model. In the graph (Fig 1) we observe a gradual increase of significant collagen deposition ($p < 0.02$), compared levels of normal animals. The determination of telomere length by qPCR (Fig 2) revealed the progressive shortening of the this structure during the induction phases (I, II and III) with $p < 0.0005$, 3 animals aged in the final stages (recovery, IV and V). The test for the localization of telomerase expression (Fig. 3a and 3b) by immunohistochemistry indicates the reactivation of its expression (qualitative) in these stages.

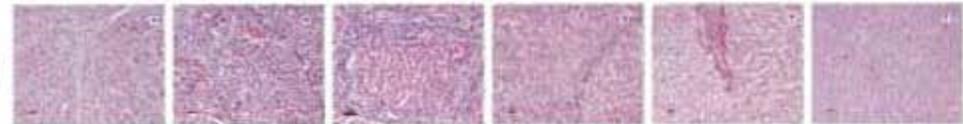


FIG. 2 Representative images of the histopathological analysis of tissue sections of rat liver obtained during the different phases of the experimental model: phase I (Fig. 2a) control liver levels of collagen fibers; phase II (Fig. 2b) cirrhotic liver with surrounding regenerative nodules; Phase III (Fig. 2c) liver sections of fibrosis with areas of liver fibrosis; fibrosis, activated and large nodules, nodular cirrhosis; Phase IV (Fig. 2d) cirrhotic liver with liver nodules, regenerative nodules surrounded by fibrous connective tissue; Sirius red (Fig. 2e) collagen fibers in purple stain; hepatocytes with nuclear hyperchromatism, fibrous bands and loss of normal cytoplasmic color and proliferation; Phase V (Fig. 2f) regenerative nodules surrounded with high hepatocyte proliferation; Sirius red is observed; fibrous bands, cirrhotic hepatocellular nodules and loss of normal liver (Fig. 2f). The hepatocytes are polygonal with granular cytoplasm and central nucleus, round and prominent nucleus.

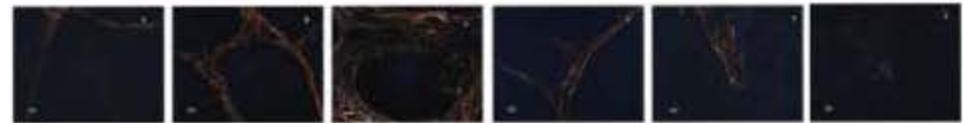


FIG. 3 Correlation between histological sections stained with cresyl violet (H & E) (upper panel) and Sirius red (bottom panel), the second staining clearly delineated the collagen fibers deposited in the tissue. The figures show the progressive fibrosis that comprises the matrix and under polarized light we see the difference between the degree and type of collagen deposition that gradually increases a clear indication of the progression of fibrosis. In red, type I collagen (type II) in green. Phase I (Fig. 3a), Phase II (Fig. 3b), Phase III (Fig. 3c), Phase IV (Fig. 3d) and Phase V (Fig. 3e) to normal liver (Fig. 3f).

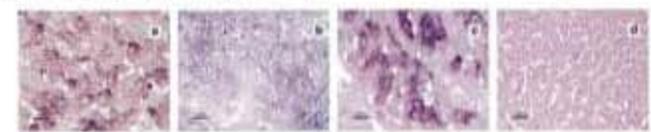
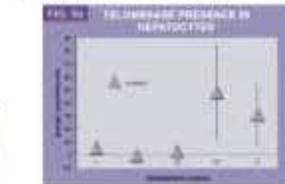


FIG. 5 Representative images of telomerase expression by immunohistochemistry in cirrhotic liver sections obtained from paraffin-embedded liver sections (Phase IV). Positive staining was observed in the nucleus of hepatocytes (green arrows, Fig. 5a, 5b, 5c). The black arrows indicate the staining obtained with an unrelated antibody (negative control) (Fig. 5d) in a parallel section (Fig. 5). The reaction was revealed with a secondary antibody conjugated to alkaline phosphatase, DAB as substrate. Aquatic mount was used to counterstain the structure.

CONCLUSION

The results obtained confirm that the TAA-induced liver cirrhosis is associated with alterations in cell cycle regulatory mechanisms as a result of persistent liver damage. The model strengthens the hypothesis of telomere shortening during the process, and further suggests that the reactivation of telomerase may be responsible for the gradual recovery of the size of the chromosome structure, which is demonstrated by qPCR. Finally, to reinforce this statement, the quantification of the enzyme activity is required, whose expression was only demonstrated qualitatively in the immunohistochemistry assay.

The work was supported by funds provided by CONACyT (2014-2016) and UNAM (2017-2018).

Poster del trabajo presentado en los siguientes congresos:

- VII Congreso Nacional de Hepatología
Cancún, Quintana Roo. 22 al 25 de junio del 2011.
Cequera A*, Murga S*, Senties K*, Tello E*, Gutiérrez-Reyes G., Gudiño M*, Robles-Díaz G*, Kershenobich D., Pérez-Tamayo R., y García de León-Méndez M.C. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México, México D.F.
"SENESCENCIA CELULAR EN UN MODELO DE FIBROSIS EXPERIMENTAL: Determinación de Longitud de Telómero y Presencia de Telomerasa"
- 62nd Annual Meeting of AASLD, "The Liver Meeting 2011"
San Francisco, California, November 4 to November 8
Cequera A, Senties K, Murga S, Tello E, Gutiérrez-Reyes G, Togno G, Robles-Díaz G, Kershenobich D*, Pérez-Tamayo R., and García de León-Méndez M.C. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM/Hospital General de México, México D.F. " Cellular Senescence in a Model of Experimental Fibrosis: Determination of Telomere Length recovery and Telomerase reactivation.

Bibliografía

1. Akira, S; Takeda, K. (2004) **Toll-like receptor signaling**. *Nat Rev Immunol*. 4(7): 499-511.
2. Burt, A.D; Portman, B.C; Ferrell, L.D. (2007) **MacSween`s Pathology of the Liver**. 5th ed. Churchill Livingstone. Elsevier. Pp 1- 119
3. Alcolado, R., Arthur, M. J. P., and Iredale, J. P. (1997) **Pathogenesis of liver fibrosis**. *Clin Sci* **92**, 103–112
4. Allsopp, R. C., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E. I., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., and Harley, C. B. (1995) **Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo** *Exp. Cell Res*. **220**, 194–200.
5. Amiard, S; *et al.* (2007) **A topological mechanism for TRF2 enhanced strand invasion**. *Nature Struct Mol Biol*. 14: 147- 154.
6. Artandi S.E; Chan, S; Lee, S.L; Alson, S; Gottlieb, G.J; Chin, L; DePinho, R.A; (2000) **Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice**. *Nature* 406: 641-645.
7. Artandi, S.E; DePinho, R.A. (2000) **A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis**. *Curr. Opin. Genet. Dev.*10: 39–46.
8. Arthur, M. J. (1995) *J. Hepatol.* **22**, Suppl. 2, 43–48
9. Bae, N.S; Baumann, P.A. (2007) **RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends**. *Moll Cell*. 26: 323-334.
10. Ball, S. E; Gibson, F. M; Rizzo, S; Tooze, J. A; Marsh, J. C; Gordon-Smith, E. C. (1998) **Progressive telomere shortening in aplastic anemia**. *Blood* 91,3582–3592
11. Bandyopadhyay, D; Medrano, E.E. (2003) **The emerging role of epigenetics in cellular and organismal aging**. *Exp. Gerontol*. 38: 1299–1307.
12. Bandyopadhyay, D.; Okan, N.A; Bales, E; Nascimento, L; Cole, P.A; Medrano, E.E. (2002) **Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes**. *Cancer Res*. 62: 6231–6239.
13. Bataller, R; Schwabe, R.F; Choi, Y.H; Yang, L; Paik, Y.H; Lindquist, J; *et al.* (2003) **NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis**. *J Clin Invest*. 112(9): 1383- 1394.
14. Beausejour, C.M; Krtolica, A; Galimi, F; Narita, M; Lowe, S.W; Yaswen, P; Campisi, J. (2003) **Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways**. *EMBO J*. 22: 4212– 4222.
15. Belperio, J.A; Dy, M; Burdick, M.D; Xue, Y.Y; Li, K; Elias J.A; *et al.* (2002) **Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis**. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 27(4): 419- 427.
16. Ben-Porath, I; Weinberg, R.A. (2004) **When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence**. *J. Clin. Invest*. 113: 8–13.
17. Blackburn, E. H. (1991) **Structure and function of telomeres**. *Nature (London)* **350**, 569–573
18. Blasco, M.A. (2002) **Mouse Models to Study the Role of Telomeres in Cancer, Ageing and DNA Repair**. *Eur J Cancer* 38: 2222- 2228.
19. Blasco, M.A. (2007) **The epigenetics regulation of mammalian telomeres**. *Nature Rev. Genet*. 8:299-309.
20. Boultonwood, J., Peniket, A., Watkins, F., Shepherd, P., McGale, P., Richards, S., Fidler, C., Littlewood, T. J., and Wainscoat, J. S. (2000) **Telomere length shortening in chronic myelogenous leukemia is associated with reduced time to accelerated phase**. *Blood* **96**, 358–361
21. Brookes, S; Rowe, J; Ruas, M; Llanos, S; Clark, P.A; Lomax, M; James, M.C; Vatcheva, R; Bates, S; Vousden, K.H; *et al.* (2002) **INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS induced senescence**. *EMBO J*. 21: 2936–2945.
22. Brown, J.P; Wei, W; Sedivy, J.M. (1997) **Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1**

- gene in normal diploid human fibroblasts.** Science 277: 831–834.
23. Brunori, M; Luciano, P; Gilson, E; Geli, V. (2005) **The telomerase cycle: normal and pathological aspects.** J Mol Med. 83: 244-257
 24. Callicott, R., Womack, J.E. (2006) **Real-time PCR Assay for Measurement of Mouse Telomeres.** Comparative Medicine. , Vol 56, No 1, 17- 22
 25. Campisi, J. 2005. **Senescent Cells, Tumor Suppression, an Organismal Aging: Godd Citizens, Bas Neighbors.** Cell: 120, 513- 522.USA.
 26. Campisi, J; Kim, S., Lim, C. Rubio, m. 2001. **Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection.** Exp Gerontol: 36, 1619- 1637.
 27. Campisi, J. (2011) **Cellular Senescence: Putting the Paradoxes in Perspective.** Elsevier. Vol. 21. Issue 1 pp 107-112
 28. Cawthon, R.M. (2009) **Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method.** Nucleic Acids Research. **37** (3 e21), 1-7
 29. Chen, Z; *et al.* (2005) Nature. 436: 725- 730.
 30. Coelho, A.L; Hogaboam, C.M; Kundel, S.L. (2005) **Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity.** Cytokine Growth Factor Rev. 16(6): 553-560
 31. Coppé, J.P; Patil, C.K; Rodier, F;*et al.*(2008) **Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor.** PLoS Biol. 6:2853–2868.
 32. Da-Hee Jeong, Ja-June Jang, Su-Jae Lee, Jae-Hyun Lee, Ihn-Kyung Lim, Min-Jae Lee, and Yun-Sil Lee **Expression patterns of cell cycle-related proteins in a rat cirrhotic model induced by CCl₄ or thioacetamide.** J Gastroenterol 2001; 36:24–33
 33. Dimri, G.P; *et al.* (1995) **A Biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*.** Proc. Natl Acad. Sci. USA. 92: 9363- 9367.
 34. Di Sario, A., Bendia, E., Svegliati Baroni, G., Ridolfi, F., Bolognini, L., Feliciangeli, G., Jezequel, A. M., Orlandi, F., Benedetti, A. (1999) Gastroenterology 116, 1155–1166
 35. Effros, R. B. (2000) **Telomeres and HIV disease.** Microbes Infect. **2**, 69–76
 36. Fertin, C; Nicolas, J.F; Gillery, P; Kalis, B; Banchereau, J; Maquart, F.X. (1991) **Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents.** Cell Mol Biol. 37(8): 823- 829.
 37. Fibbi, G., Pucci, M., Grappone, C., Pellegrini, G., Salzano, R., Casini, A., Milani, S., Del Rosso, M. (1999) *Hepatology* **29**, 868–878
 38. Friedman, S. L. (1983) **The cellular basis of hepatic fibrosis** N. Engl. J. Med. **328**, 1828–1835
 39. Friedman, S. L. (1999) **Semin. Liver Dis.** **19**, 129–140
 40. Friedman, S.L; (2000) **Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury.** The Journal of Biological Chemistry. Vol: 275, no. 4. Pp 2247- 2250.
 41. Friedman, S. L; (2004)**Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications.** Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 1 (2): 98-105
 42. Forbes, S.J; Russo, F.P.; Rey, V; Burra, P; Rugge, M; Wright, N.A; *et al.* 2004. **A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis.** Gastroenterology. 126(4): 955–963.
 43. Frohlich, A; Marsland, B.J; Sonderegger, I; Kurrer, M; Hodge, M.R; Harris, N.L; *et al.* (2007) **IL-21 receptor signaling is integral to the development of Th2 effector responses *in vivo*.** Blood. 109(5):2023- 2031.
 44. Gilson, E; Géli, V. (2007)**How Telomeres are Replicated.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology: 8, 825- 838.
 45. Goytisolo, F.A; Blasco, M.A. (2002)**Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models.** Oncogene 21:584-591.

46. Grana, X; Reddy, E.P. (1995) **Cell cycle control in mammalian cells: Rol of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin.dependent kinase inhibitors (CKIs)**. *Oncogene*. 11: 211-219.
47. Greider, CW. (1996)**Telomere length regulation**. *Annu Rev Biochem*: 65, 337- 365.
48. Griffith, J.D; Comeau, L; Rosenfield, S; Stansel, R.M; Bianchi, A; Moss, H; de Lange, T. (1999)**Mammalian telomeres are end in a large duplex loop**. *Cell* 97: 503-514.
49. Grinnell, F. (2003). **Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices**. *Trends Cell Biol*. 13, 264–269.
50. Ham, A.W. (1975)**Tratado de Histología**. Nueva Editorial Interamericana, 7ed. Facultad de Medicina, University of Toronto. **Páncreas, hígado y vesícula biliar**. 641-665.
51. Hasegawa, M; Fujimoto, M; Takehara, K; Sato, S. (2005) **Pathogenesis of systematic sclerosis: altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis**. *J Dermatol Sci*. 39(1): 1-7.
52. Haudek, S.B; Xia, Y; Huebener, .P; Lee.J.M; Carlson, S; Crawford, J.R. et al. (2006)**Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(48): 18284- 18289.
53. Hayflick. L. (1965)**The limited in vitro life time of human diploid cell strains**. *Exp Cell Res* 37:614-636.
54. Hodes, R.J; 1999. **Telomere length, aging, and somatic cell turnover**. *J Exp Med* 190: 153-156.
55. Hoffmann, K.F; McCarty, T.C; Segal, D.H; Chiamonte, M; Hesse, M; Davis, E.M; *et al.* (2001) **Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type I and type 2 citokine-mediated inflammatory reactions**. *FASEB J*. 15(13): 2545-2547.
56. Hong, S.H., Lee, G.H., et al. 2002. **Changes in expression of cell cycle regulators after g1 progression upon repetitive thioacetamide treatment in rat liver**. *Experimental and molecular Medicine*:34, 331-358.
57. Ishikawa, F. (2000) **Agingclock: the watchmakers´ s masterpiece**. *Cell Mol Life Sci*. 57:698- 704.
58. Jeong, J.S; Han, S.Y; Kim, Y.H; Choi, Y.C. (2001) **Altered remodeling of nucleolar machineries in cultured hepatocytes treated with thioacetamide**. *J Korean Med Sci*. 16: 75-82.
59. Jeong, J.S; Lee, H.J; Kang, H.J; Choi, Y.C. (1994) **Typesof nucleolar hypertrophy**. *Mol Cells*. 4: 85-90.
60. Kcmiec, Z; (2001) **Cooperation of liver cells in health and disease**. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 161: III-XIII: 1-151
61. Kim, Y., Ratziu, V., Choi, S. G., Lalazar, A., Theiss, G., Dang, Q., Kim, S. J., Friedman, S. L. (1998) **J. Biol. Chem.**273, 33750–33758
62. Kinzler, K.W; Vogelstein, B. (1997) **Cancer-Susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers**. *Nature*. 386(6627): 761- 763.
63. Kim, S., Parinello, S., Kim, J., Campisi, J. 2003. **Mus musculus and Mus spretus homologues of the human telomere associated protein TIN2**. *Genomics*: 81, 422- 432.
64. Kitada, T., Seki, S., Kawakita, N., Kuroki, T.,and Monna T. (1995) **Telomere shortening in chronic liver diseases**. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 211, 33–39
65. Knittel, T; Kobold, D; Saile, B; Grundmann, A; Neubauer, K; Piscaglia, F; Ramadori, G. (1999) **Gastroenterology**. 117, 1205-1221.
66. Krizhanovsky, V; Yon, M; Dickins, R.A;*et al.* (2008) **Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis**. *Cell*. 134:657–667.
67. Kristensen, D.B; Kawada, N; Imamura, K; Miyamoto, Y; Tateno, C; Seki, S; *et al.* (2000) **Proteome analysis of rat hepatic stellate cells**. *Hepatology*. 32(2): 268- 277.

68. Krtolica, A; Parrinello, S; Lockett, S; Desprez, P; Campisi, J. (2001). **Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 12072–12077.
69. Kumar, V; Abbas, A.K; Fausto, N. 2005. **Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis.** En **Pathologic Basis of Disease.** Kumar, V; Abbas, A.K; Fausto, N. (eds.) Elsevier Saunders: Philadelphia, PA. 87-118.
70. Lanone, S; Zheng, T; Zhu, Z; Liu, W; Lee, C.G; Ma, B; et al. (2002) **Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13 induced inflammation and remodeling.** J Clin Invest. 110(4): 463- 474.
71. Ledda-Columbano, GM., Goni, P., Curto, M. et al. 1991. **Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide.** Am J Pathol: 139, 1099- 1109.
72. Li, M.O; Wan, Y.Y; Sanjabi, S; Robertson, A.K; Flavell, R.A. 2006. **Transforming growth factor-beta regulation of immune responses.** Annu Rev Immunol. 24: 99-146.
73. Ma, B; Zhu, Z; Homer, R.J; Gerard, C; Strieter, R; Elias, J.A. (2004) **The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling.** J Immunol. 172(3): 1872- 1881.
74. Maher, J. J. (1999) **Alcohol Clin. Exp. Res.** **23**, 917–921
75. Makovets, S; Herskowitz, I; Blackburn, E.H. (2004) **Anatomy and dynamics of DNA replication fork movement in yeast telomeric regions.** Mol Cell Biol. 24: 4019- 4031.
76. Marcand, S; Gilson, E; Shore, D. (1997) **A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast.** Science. 275: 986- 990.
77. McEachern, MJ., Krausskopf, A., Blackburn, EH. 2000. **Telomeres and their control.** Annu Rev Genet: 34, 331- 358.
78. Meneghin, M.D; Hogaboam, C. 2007. **Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis.** J Clin Invest. 117(3): 530-538.
79. Mezzano, S.A; Ruiz-Ortega, M; Egido, J. (2001) **Angiotensin II and renal fibrosis.** Hypertension. 38(3, Pt 2): 635- 638.
80. Michaloglou, C; et al. (2005) Nature. 436: 720- 724.
81. Moore, B.B; Kolodsick, J.E; Thannickal, V.J; Cooke, K; Moore, T.A; Hogaboam, C; et al (2005) **CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury.** Am J Pathol. 166(3):675- 684.
82. Moore, K.W; de Waal Malefyt, R; Coffman, R.L; O'Garra, A. (2001) **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** Annu Rev Immunol. 19: 683- 765.
83. Morrison, S. J., White, P. M., Zock, C., Anderson, D. J. (1999) **Cell** **96**,737–749
84. Munger, J.S; Huang, X; Kawakatsu, H; Griffiths, M.J; Dalton, S.L; Wu, J; et al. (1999) **The integrin $\alpha v \beta 6$ binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.** Cell. 96(3): 319- 328.
85. Nakamura, T., Arii, S., Monden, K., Furutani, M., Takeda, Y., Imamura, M., Okada, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5389 –5394
86. Nelson, D.L ; Cox, M.M. (2005) **Lehninger Principles of biochemistry.** 4^{ed}. W.H Freeman Company. New York.
87. Niki, T; Pekny, M; Hellemans, K; Bleser, P.D.; Berg, K.V.; Vaeyens, F; Quartier, E; Schuit, F; Geerts, A. (1999) **Hepatology.** 29, 520-527.
88. Olumi, A.F; Grossfeld, G.D; Hayward, S.W; Carroll, P.R; Tlsty, T.D; D.H; Cunha, G.R. (1999). **Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium.** Cancer Res. 59: 5002–5011.
89. Sharpless, N.E; DePinho, R.A. (2005) **Crime and punishment.** Nature. 436.
90. Stein, G.H; Drullinger, L.F; Soulard, A; Dulić, V. (1999) **Differential roles for cyclin-dependent**

- kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts.** *Mol. Cell. Biol.* 19:2109–2117
91. Olaso, E., Eng, F., Lin, C., Yancopoulos, G., Friedman, S. L. (1999) *Hepatology* **30**, 413 (abstr.)
 92. Otte, J.M; Rosenberg, I.M; Podolosky, D.K; (2003) **Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine.** *Gastroenterology.* 124(17): 1866- 1878.
 93. Pardo, A; Selman, M. (2006)**Matrix metalloproteasas in aberrant fibrotic tissue remodeling.** *Proc Am Thorac Soc.* 3(4): 383- 388.
 94. Parsons, C.J; Takashima, M; Rippe, R.A. 2007. **Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis.** *J Gastroenterol Hepatol.* 22 (suppl): S79- 84.
 95. Parrinello, S; Coppe, J.P; Krtolica, A; Campisi, J. (2005). **Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts can alter epithelial cell differentiation.** *J. Cell Sci.* *118*, 485–496.
 96. Pesce, J; Kaviratne, M; Ramalingam, T.R; Thompson, R.W; Urban, J.F. Jr; Cheever, A.W; *et al.* (2006) **The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation.** *J Clin Invest.* 116(7): 2044- 2055.
 97. Phillips, R.J; Burdick, M.D; Hong, K; Lutz, M.A; Murray, L.A; Xue, Y.Y; *et al.* 2004. **Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis.** *J Clin Invest.* 114 (3): 438- 446.
 98. Pinzani, M., Marra, F., Carloni, V. (1998) *Liver*18, 2–13
 99. Poloumienko, A; Dershowitz, A; De, J; Newton, C.S. (2001) **Completion of replication map of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III.** *Mol Biol Cell.* 12:3317- 3327.
 100. Rappaport, A.M; 1957. **The Structural and functional acinar unit of the liver; some histopathological considerations (Monograph).** *Int.Symp Hepatitis Frontiers.* Boston, Little, Brown & Co./ 1958. **The Structural and functional unit in the human liver (liver acinus).** *Anat. Rec.* 130: 673
 101. Reddel, RR. (1998) **A Reassessment of the Telomere Hypothesis of Senescence.** *Bioessays.* 20: 977- 984.
 102. Reveal, P.M; Henkeis, K.M; Turchi, J.J. (2004) **Synthesis of the mammalian telomere lagging strand *in vitro*.** *J Biol Chem.* 272: 11678- 11681.
 103. Roberts, A.B; Russo, A; Felici, A; Flanders, K.C. (2003) **Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGFβ.** *Ann NY Acad Sci.* 995: 1-10.
 104. Rodier, F; Campisi, J. (2011) **Four faces of cellular senescence.** *JCB.* 192(4): 547- 556.
 105. Rojkind, M; Greenwel, P; (1994) **The extracellular matrix and the liver.**En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Shashter DA, Shafritz DA; *The Liver; Biology and Pathology.* Third Ed. Raven Press ,New York, pp 843-868
 106. Rosenkranz, S. **TGFβ1 and angiotensin networking in cardiac remodeling.** *Cardiovasc Res.* 63(3): 423- 432.
 107. Rudolph, K. L., and DePinho, R. A. (2001) **Telomeres and telomerase in experimental liver cirrhosis.** In *The Liver Biology and Pathobiology*, 4th Ed, pp. 1000–1010 and *Pathobiology*, 4th Ed, pp. 1000–1010
 108. Russo, F.P; Alison, M.R; Bigger, B.W; Amofah, E; Florou, A; Amin, F; *et al.* 2006. **The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis.** *Gastroenterology.* 130(6): 1807- 1821.
 109. Sandler, N.G; Mentink-Kane, M.M; Cheever, A.W; Wynn, T.A. (2003) **Global gene expression profiles during acute pathogen-induced pulmonary inflammation reveal divergent roles for Th1 and Th2 responses in tissue repair.** *J Immunol.* 171(7):3655- 3667.
 110. Serrano, M; Lin, A.W; McCurrach, M.E; Beach, D; Lowe, S.W. (1997) *Cell.* 88: 593- 602.
 111. Schuppan, D; Ruel, M; Somasundaram, R; Hahn, E.G. 2001. **Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis.** *Semin Liver Dis.* 21(3):351- 372.

112. Stefanie U. Wiemann, Ande Satyanarayana, Martina Tsahuridu, Hans L. Tillmann, Lars Zender, Juergen Klempnauer,* Peer Flemming,† Sonia Franco,‡ Maria A. Blasco,‡ Michael P. Manns, And K. Lenhard Rudolph. 2002 **Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis** The FASEB Journal: 16; 935-942
113. Stevenson, J.B; Gottschling, D.E (1999) **Telomeric chromatin modulates replication timing near chromosome ends.** Genes Dev. 13:146-151.
114. Stewart, N; Hicks, G.G; Paraskevas, F; Mowat, M. (1995) **Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53.** Oncogene. 10: 109- 115.
115. Strieter, R.M; Gomperts, B.N; Keane, M.P. (2007) **The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis.** J Clin Invest. 117(3): 576-586.
116. Tomasek, JJ; Gabbiani, G; Hinz, B; Chaponnier, C; Brown, RA. (2002)**Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling.** Nat Rev Mol Cell Biol. 3(5): 349-363.
117. Triola, F.M. (2009) **Estadística.** Pearson Educación. 10ªed. pp. 636-649
118. Vaillant, B; Chiaramonte, M.G; Cheever, A.W; Soloway, P.D; Wynn, T.A. (2001) **Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th response: New insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases.** J Immunol. 167(12): 7017- 7026.
119. Van den Heuvel, S; Harlow, E. (1993) **Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control.** Science. 262: 2050- 2054.
120. Verdun, R.E; Karlseder, J. (2006) **The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres.** Cell. 127: 709- 720.
121. Vodenicharov, M.D; Wellinger, R.J. (2006) **DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (cdc28/Clb) cell cycle kinase.** Mol Cell. 24: 127- 137.
122. Wang, Y; Fan, P.S; Kahaleh, B. (2006) **Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the *FLI1* gene in scleroderma fibroblasts.** Arthritis Rheum. 54(7): 2271- 2279.
123. Wangoo, A; Laban, C; Cook, H.T; Glenville, B; Shaw, R.J. (1997) **Interleukin-10- and corticosteroid-induced reduction in type I procollagen in a human *ex vivo* scar culture.** Int J Exp Pathol. 78(1): 33- 41.
124. Williams, E. J., and Iredale, J. P. (1998) **Liver cirrhosis.** Postgrad Med **J870**, 193–202
125. Wynn, TA; Cheever, A.W; Jankovic, D; Poindexter, R.W; Caspar, P; Lewis, F.A; *et al.* (1995) **An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection.** Nature. 376(6541):594- 596.
126. Wynn, TA. (2003)**IL-13 effector functions.** Annu Rev Immunol. 21: 425-456.
127. Wynn, TA. (2004) **Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm.** Nat Rev Immunol. 4(8): 583- 594.
128. Wynn, TA. (2007)**Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases.** J Clin Invest; 117 (3): 524- 529.
129. Wynn, TA. (2008)**Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.** Journal of Pathology: 214, 199-210.

Anexos

Anexos Introducción

Fibrosis y sus mecanismos

Anexo A

En respuesta al daño tisular, las células epiteliales y endoteliales liberan mediadores inflamatorios que dan inicio a una cascada de coagulación antifibrinolítica, que a su vez promueve la formación de coágulos y de una matriz extracelular provisional (Kumar, 2005). Mientras la agregación plaquetaria, la coagulación y hemostasis tienen lugar, los miofibroblastos (fibroblastos secretores de colágena, que son α -SMA+ como HSC y miofibroblastos) y las células endo/epiteliales producen MMPs (metaloproteinasas: irruptoras de la MEC) dando paso a las células inflamatorias (Wynn, 2008). El reclutamiento de los leucocitos a través de la matriz provisional es estimulado por factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Los macrófagos y neutrófilos son los responsables de la eliminación de los restos celulares, las células muertas y de los organismos invasores. Éstos últimos también producen citocinas y quimiocinas que son mitogénicas y quimioatrayentes de células endoteliales, las cuales inician un rodeo del área dañada en cuestión (Wynn, 2008). Cabe mencionar que las citocinas y quimiocinas forman parte en el proceso de creación de vasos sanguíneos mientras las células epi/endoteliales migran hacia el centro de la herida. Entonces es cuando se activan los linfocitos y otras células para secretar factores de crecimiento y citocinas profibroticas, como son TGF β , IL-13 y PDGF (Li, 2006; Wynn, 2003; Parsons, 2007). Estos GF y citocinas activan macrófagos y fibroblastos. Los fibroblastos activos se transforman a miofibroblastos que expresen α SMA mientras migran a la herida desde la red de fibrina. Los miofibroblastos promueven la concentración de las orillas de la herida hacia el centro de la misma (Wynn, 2008). Las células epi/endoteliales se dividen y migran sobre las capas basales para regenerar el tejido dañado, con lo que se completa el proceso de curación de la herida. La inflamación crónica y la reparación pueden promover una acumulación excesiva de componentes de MEC lo que lleva a la formación de la cicatriz fibrótica permanente (Wynn, 2008). El recambio de colágena y la remodelación de la MEC se regulan por varias MMPs y por sus inhibidores (como son los inhibidores de metaloproteinasas de tejido: TIMPs) (Wynn, 2008). A su vez, las variaciones de síntesis y catabolismo de la MEC regulan el incremento y decremento neto de la colágena en la herida (Pardo, 2006). La fibrosis ocurre cuando la síntesis de nueva colágena (por miofibroblastos) excede la tasa en la que se degrada,

dando pie a la acumulación e incremento de colágena a través del tiempo (Wynn, 2008).

Como se mencionó con anterioridad, el agente celular clave que media éste proceso es el miofibroblasto; una vez activo es la célula principal productora de colágena. Éste se puede generar de fuentes como células mesenquimatosas residentes, células epiteliales y endoteliales en proceso de transición epitelial/endotelial mesenquimatoso (EMT/EndMT) o de fibrocitos circulantes derivados de células madre de la médula ósea que poseen un fenotipo similar al de fibroblasto/miofibroblasto ya que expresan CD34, CD45 y colágena tipo I (Wynn, 2008). En el hígado fibroso las células hepáticas estrelladas son la principal fuente de miofibroblastos, aunque las células derivadas de médula ósea también contribuyen (Forbes, 2004; Russo, 2006). Los fibrocitos y los miofibroblastos derivados de la transición epitelial-mesenquimatoso participan junto con las células mesenquimatosas residentes en el proceso de reparación (Phillips, 2004). El reclutamiento de los miofibroblastos se desarrolla mediante quimiocinas y proteínas de fase aguda como SAP (suero amiloide P) (Phillips, 2004; Moore, 2005; Haudek, 2006). Los miofibroblastos se activan mediante señales parácrinas, derivadas de linfocitos y macrófagos, por factores autócrinos, secretados por ellos mismos, y/o por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP): producto de organismos patógenos que interactúan con los receptores de reconocimiento (TLPs) de los fibroblastos (Wynn, 2008; Meneghin, 2007). Según Otte (2003), las bacterias que habitan el intestino pueden contribuir en la activación de los miofibroblastos. Estos PAMPs pueden ser lipoproteínas, DNA y RNA de doble cadena bacterianos que son reconocidos por receptores que reconocen patrones (PPRs) localizados en fibroblastos (como es TLP: toll-like), entre otras células (Akira, 2004). Ésta interacción es la primer línea de defensa ante una infección y es la responsable de activar citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Los ligandos del TLR pueden activar directamente fibroblastos y promover su diferenciación hacia miofibroblastos productores de colágena (Meneghin, 2007; Otte, 2003; Coelho, 2005). En el caso de la esclerosis sistémica (SSc), se cree que el fenotipo de los fibroblastos se mantiene por una señal autócrina de TGF β (Wynn, 2008). Los cambios epigenéticos también pueden contribuir a la persistente activación de miofibroblastos (Wang, 2006). Las células B producen auto-anticuerpos y secretan IL-6, un factor de crecimiento de fibroblastos, por lo que también se han visto implicadas en el proceso (Hasegawa, 2005). Se ha propuesto que las citocinas de tipo Th2 tienen participación en el proceso (Wynn, 2004), luego entonces, las señales parácrinas derivadas de linfocitos, factores autócrinos producto de fibroblastos, así como las moléculas derivadas

de organismos patógenos pueden cooperar para iniciar y mantener la activación del miofibroblasto.

Las quimiocinas son quimioattractantes de leucocitos que cooperan con las citocinas profibróticas durante el desarrollo de la fibrosis mediante el reclutamiento de miofibroblastos, macrófagos y otras células efectoras clave, en el sitio dañado (Wynn, 2008). La familia de receptores de quimiocinas CC (CCL3, proteína 1 α macrófago-inflamatoria y CCL2, proteína-1 monocito-quimioattractante) y CXC, ambas quimiotácticas de fagocitos mononucleares, son las mayoritariamente implicadas ya que son mediadores profibróticos. Los macrófagos y las células epiteliales parecen ser las fuentes de CCL3 (Wynn, 2008). Existe una relación proporcional directa entre la actividad de las quimiocinas CC y la producción de citocinas profibróticas como IL-13. IL-13 es un fuerte inductor de quimiocinas CC (CCL3, CCL4: MIP-1 β , CCL20: MIP-3 α , CCL2, CCL11, CCL22: quimiocina derivada de macrófago, y CCL6: C10) (Belperio, 2002). Esto último sugiere un mecanismo de retroalimentación positiva entre IL-13 y la familia de quimiocinas CC (Ma, 2004). Las reacciones inflamatorias crónicas se caracterizan por un gran infiltrado de células mononucleares (macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células del plasma) (Wynn, 2008). Hay una activación significativa de la respuesta inmune adaptativa en las enfermedades inflamatorias crónicas. Los linfocitos se movilizan hacia sitios dañados y se activan después del contacto con distintos antígenos, lo que estimula la producción de linfocinas que activarán macrófagos y otras células locales inflamatorias. Sin embargo, Wynn (2004) propone un modelo en base a sus estudios de fibrosis hepática a causa de schistosomiasis, en donde la fibrosis se desarrolla progresivamente en respuesta a los huevos depositados en el órgano que inducen una respuesta crónica granulomatosa; independiente del constante proceso inflamatorio. En este modelo, la respuesta profibrótica de las células Th2 CD4+ juega un papel importante ya que involucra a IL-4, IL-5, IL-13 e IL-21 (Wynn, 1995). Otros experimentos han documentado fuerte actividad antifibrótica de las citocinas (IFN γ) asociadas a Th1 y de IL-12 (Wynn, 1995). Genes ligados a Th2 (Hoffman, 2001; Sandler, 2003): hem oxigenasa, procolágena III y V, fosfoproteína secretada I, reticulocalbina y fibilina I, han sido identificados en células estrelladas, productoras de colágena, de hígados estimulados con CCL4 de rata (Kristensen, 2000), lo que aporta más evidencia de la asociación del desarrollo de respuesta tipo Th2 y la fibrosis, en algunos casos. Dentro de las citocinas Th2, IL-4 parece tener un efectividad de acción del doble de la citocina profibrótica TGF β (Fertin, 1991). En respuesta al estímulo de IL-4 e IL-13 se sintetizan las colágenas tipo I y III más fibronectina, proteínas de la matriz extracelular (Wynn, 2008). La IL-5 y los eosinófilos regulan, también, la fibrogénesis. La diferenciación, activación y reclutamiento de eosinófilos es dependiente de IL-5. Los eosinófilos son fuente importante de citocinas fibrogénicas como TGF β e IL-13 (Wynn, 2008). Se ha sugerido que IL-5

y los eosinófilos son amplificadores y no mediadores directos de la fibrosis como son TGF β y/o IL-13. La señalización de IL-21 con sus receptores promueve la fibrosis facilitando el desarrollo de la respuesta Th2 CD4+; sobrevivencia y migración, aparte de que incrementa la expresión de los receptores de IL-4 e IL-13 en macrófagos (Pesce, 2006; Frohlich, 2007), con lo que se activan. Cabe mencionar que TGF β ha sido el regulador de MEC ligado al desarrollo de fibrosis más estudiado. Aunque hay una gran variedad de células que producen y responden a TGF β , el tejido fibroso se le atribuye a la isoforma TGF β 1 cuyas fuentes predominantes son los monocitos circulantes y los macrófagos del tejido (Wynn, 2008). El TGF β 1 se mantiene dentro de la célula inactivo por acción de una proteína asociada de latencia (LAP) hasta que la unión, de la citocina, a su receptor disocia la unión mediante agentes catalíticos (carepsinas, plasmina, calpaina, trombospondina, integrina- α v β 6, y metaloproteinasas de matriz) (Munger, 1999). Una vez activo, TGF β señala a través de receptores transmembranales que inician la señalización de intermediarios como las proteínas Smad (modulan la transcripción de genes blanco como procolágena I y III) (Roberts, 2003). El TGF β 1 derivado de macrófagos, promueve la fibrosis activando directamente a las células mesenquimatosas residentes, incluyendo a las células epiteliales, que se diferencian en miofibroblastos productores de colágena por la vía de transición epitelial-mesenquimal (Wynn, 2008). Las citocinas Th2 cooperan con TGF β en la inducción de fibrosis: IL-13 estimula las vías proteolíticas de las MMP y de catepsina que activan a TGF β (Vaillant, 2001; Lanone, 2002).

Es importante resaltar que previo al episodio fibrótico, se inicia una remodelación vascular en el tejido (Wynn, 2008) mediado por los miembros de las quimiocinas CXC (Strieter, 2007). La mayoría de los componentes del sistema renin/angiotensina/aldosterona exhiben actividad profibrótica. La ANG II juega un papel importante en la fibrosis hepática (Mezzano, 2001). La ANG II producida localmente por macrófagos y fibroblastos activos ejerce induciendo la actividad de la NADPH oxidasa, estimulando la producción de TGF β 1 e iniciando la proliferación y diferenciación de los fibroblastos hacia miofibroblastos secretores de colágena (Rosenkranz, 2004; Bataller, 2003). También incrementa los niveles de Smad2 y la translocación nuclear de Smad3 fosforilada, intensificando la señalización de TGF β 1. Así se establece un ciclo autócrino de diferenciación y activación de miofibroblastos.

Ante la inflamación crónica existen mecanismos de respuesta que funcionan como inmunosupresores, como la citocina IL-10 (Moore, 2001); contrastantes al proceso fibrótico. Esta interleucina suprime la síntesis de colágenas tipo I en tejidos cicatrizantes de origen fibroblástico (Wangoo, 1997). La IL-13R α 2-Fc soluble es un inhibidor efectivo de la IL-13, así que aminora la progresión de la fibrosis inhibiendo la remodelación de la MEC (Wynn, 2008). Es importante

recalcar que si la fibrosis está lo suficientemente avanzada, no hay posibilidad de revertir el proceso.

TAA

Anexo B

El ciclo celular eucarionte se encuentra regulado por vías de señalización de transducción mediadas por complejos de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), y sus respectivas ciclinas (Van, 1993). La actividad catalítica de CDK depende de la fosforilación en la tirosina o treonina mediada por las cinasas activadoras de CDK, la unión a las ciclinas y la interacción con los inhibidores de CDK (CKIs) (Hong, 2002). Los reguladores del ciclo juegan un rol importante en la regeneración fisiológica celular. Sin embargo las formas no reguladas se relacionan con la proliferación celular patológica, lo que incluye la transformación maligna (Grana, 1995). Jeong (1994), reportó que el hígado de rata, expuesto a repetidas dosis bajas de TAA (50mg/kg por día) presenta alargamiento celular, nuclear y nucleolar, diferentes a los caracteres observados en la regeneración del mismo órgano. El mismo autor, en 2001, consideró que la organomegalia celular se debía a un estado de arresto en G₂, reflejado hacia un estímulo compensatorio continuo. La entrada a la fase G₁ y su progresión se dan durante la exposición por la acción del complejo ciclina D1-CDK4/CDK6, p21^{Wal1} como su transportador nuclear y a la disfunción de p16^{Ink4a} Wal1 (datos sin publicar, Hong). La ciclina D1 y E forman el complejo de ciclina E-CDK2 que activa la fase S, mediante fosforilación (pRB, Cdc25) y liberación (E2F) de mediadores. Ante el estímulo del hepatotóxico, la expresión de la ciclina E y CDK2 se mantiene, lo que representa un estímulo correspondido para continuar el ciclo celular y provocar una respuesta compensatoria de reparación de tejido ante el daño químico (Hong, 2002). El mismo autor sugiere que p53 regula el ciclo celular en el checkpoint G₁ (su expresión produce arresto) e induce la expresión de p21^{Wal1}, lo que resulta en la reparación del DNA o en apoptosis. Se ha reportado que p53 inactiva a Cdc25 mediante la inhibición de la expresión transcripcional de la ciclina B1 y Cdc2 (Stewart, 1995). Hong (2002), sugiere que el arresto en G₂, bajo la inducción de tratamiento de TAA, es dependiente de p53 y de inhibidores (p27^{Kip1}, p57^{Kip2}) que retienen la progresión de la fase S. Una dosis baja de TAA induce apoptosis ó moderada necrosis en los hepatocitos de la rata acompañada de la inicialización del ciclo celular para promover la regeneración (Ledda- Columbano, 1991); éstos cambios se asocian con el alargamiento nuclear, incremento en la síntesis de

poliamida, alteraciones en la proporción relativa de histonas y al incremento de RNA nuclear en el citosol (Hong, 2002).

Ciclo Celular

Anexo C

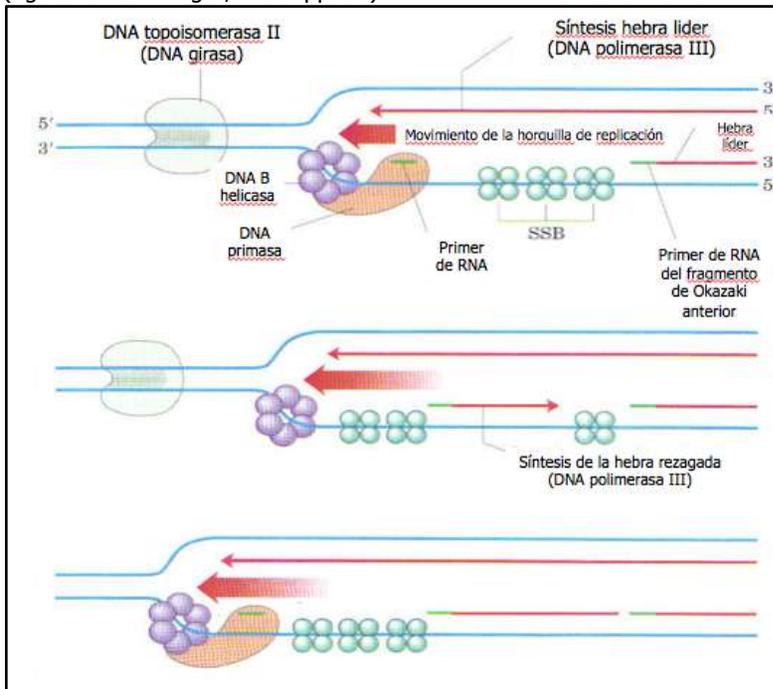
El sistema de control es respuesta de señales, de manera que la progresión del ciclo puede caer en arresto cuando la célula falla en completar un proceso esencial o encuentra condiciones ambientales desfavorables. Los componentes centrales en el control son las proteínas quinasas dependientes de ciclinas, *Cdk*, cuya actividad depende de la asociación con las subunidades reguladoras ciclinas. Las oscilaciones en actividad de varios complejos *ciclina-Cdk*, conllevan a la iniciación de varios eventos del ciclo celular. Así, la activación del complejo *ciclina-Cdk-fase-S*, da inicio a la fase 'S'; mientras que el complejo *ciclina-Cdk-fase-M*, da inicio a la mitosis. Así mismo, la actividad de los complejos *ciclina-Cdk* son influenciados por otros mecanismos que incluyen la fosforilación de la subunidad *Cdk*, la unión de proteínas inhibitorias (*CKIs*), la proteólisis de ciclinas y los cambios transcripcionales de genes codificantes de reguladores de *Cdk*. Otros complejos enzimáticos, como son *SCF* y *APC*, son componentes cruciales del sistema de control del ciclo celular ya que inducen la proteólisis de reguladores específicos del ciclo por medio de la ubiquitinización, y consecuentemente, el inicio de eventos críticos. Una secuencia ordenada de actividad de las ciclina-Cdk activa la mayoría de los eventos del ciclo. Durante la fase G₁, la actividad *Cdk* se reduce al mínimo por efecto de CKIs, proteólisis de ciclinas y un decremento de transcripción génica de ciclinas. Cuando las condiciones ambientales son favorables, G₁ y G₁/S-*Cdks* incrementan en concentración sobreponiéndose a las barreras inhibitorias en la fase tardía de G₁ y se inicia la activación de S-*Cdk*. Las proteínas fosforiladas de S-*Cdk* en los orígenes de replicación de DNA dan inicio a la síntesis por medio de un mecanismo que asegura la duplicación del DNA, una vez por ciclo. Una vez completa la fase S, la activación de M-*Cdk* conduce hacia los eventos tempranos de la mitosis, en donde la célula ensambla el huso mitótico y prepara la segregación del duplicado de cromosomas, que consiste en dos hermanas cromátidas juntas. La anafase inicia después de la destrucción de las proteínas que mantienen las cromátidas juntas. La M-*Cdk* se inactiva por la proteólisis de ciclinas que derivan la citocinesis y el final de la fase M. La progresión del ciclo se regula precisamente por varios mecanismos inhibidores que producen el arresto del ciclo en puntos de revisión específicos cuando los eventos no se completan satisfactoriamente, cuando hay daño en el DNA o cuando las

condiciones extracelulares no son favorables (Alberts, 2002).

Telomeros, Telomerasa y Senescencia

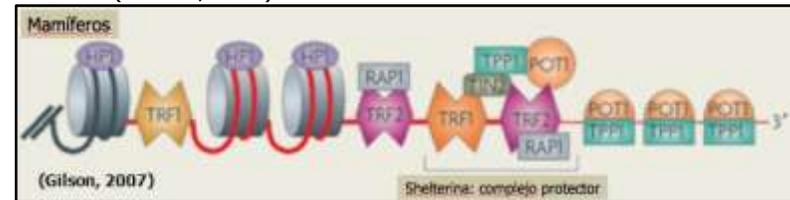
Anexo D

(figura25-13 leninger, 4ºed. pp960)



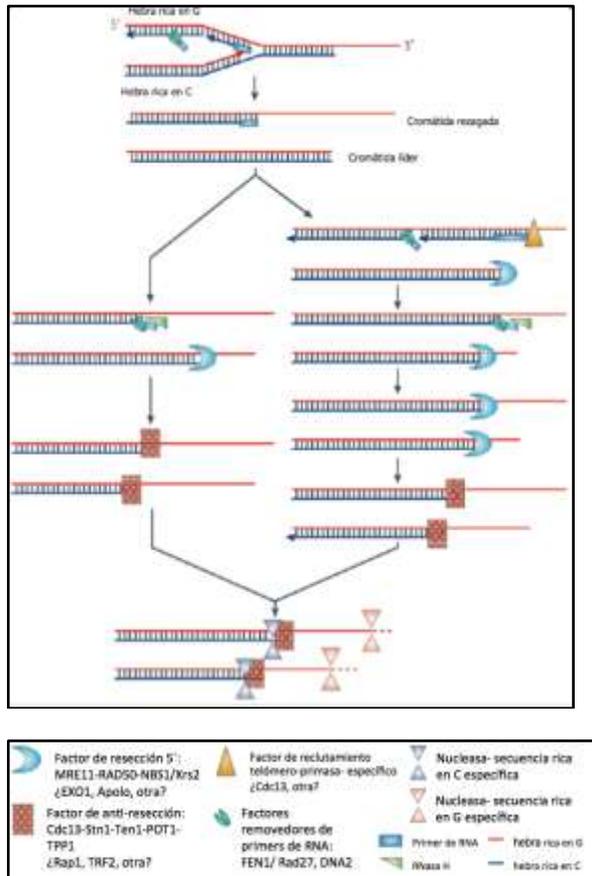
Anexo E

En los mamíferos, la mayoría del DNA telomérico se organiza en nucleosomas fuertemente empaquetados (40pb menores que la mayoría de los nucleosomas) (Gilson, 2007). Algunos nucleosomas teloméricos contienen uniones con proteínas de heterocromatina, como HP1 (Blasco, 2007). Los telómeros humanos ejercen efecto sobre la expresión de los genes subteloméricos. La cromatina telomérica incluye proteínas de unión al DNA telomérico: TRF1 (factor de repetición 1 TTAGGG) y TRF2, la POT1 (proteína 1 de protección telomérica) y POT1-TPP1 (asociada de unión a POT1) (Gilson, 2007). Estas proteínas están involucradas en la red de interacción homo y heterotípica con otras proteínas (TIN2: factor de interacción con TRF1- 2; y RAP1). El complejo proteínico-nucleosoma telomérico se encuentran de manera arbitraria a lo largo del DNA telomérico, con excepción de POT1-TPP1 que interactúa con la cola G (Gilson, 2007). El DNA telomérico se organiza en conjuntos estructurales de cromatina que promueven actividades que evitan los eventos de reparación de DNA (conjunción de terminaciones). Estos complejos de protección, a su vez, deben ser resueltos para la replicación y elongación mediante la telomerasa. Las proteínas TRF1, TRF2 y POT1 modulan varias actividades enzimáticas y conformaciones de DNA que controlan diferentes aspectos de la homeostasis del telómero (Brunori, 1985).



Anexo F

En la hebra líder, debe haber una resección en el extremo 5' para generar una cola-G (Gilson, 2007) mediada por el complejo MRE11-RAD50-NBS1. (Figura Gilson 2007)



Durante la replicación del telómero, la señal de daño dependiente de ATM se requiere para la generación de la cola-G (Verdun, 2006; Vodenicharov, 2006). La exonucleasa Apollo 5' asociada a TRF2 parece contribuir a la formación del excedente G mediante la resección 5' (Gilson, 2007). La síntesis de la replicación de la hebra rezagada se detiene una vez se termine de sintetizar la replicación de la hebra líder rica en C. Este lapsus corresponde, en longitud, a un fragmento de Okazaki de 200 nucleótidos (Gilson, 2007). La cola-G de la hebra líder es más corta que la de la hebra rezagada, por lo que es más propensa a ser elongada por la telomerasa. Las proteínas de unión al DNA telomérico regulan la longitud de los telómeros mediante un mecanismo de

retroalimentación negativa (Marcand, 1997). La represión-*cis* que ejercen estas proteínas afectan la probabilidad de que la telomerasa pueda acceder y elongar el telómero, consecuentemente, los telómeros más cortos están más predispuestos a ser alargados. Por otro lado TPP1 y POT1 actúan en conjunto para reclutar telomerasa en los telómeros (Gilson, 2007) y la molécula helicasa Pif1 coopera con un subdominio de la telomerasa para limitar su actividad y separarla de los telómeros (Gilson, 2007). Cabe mencionar que los *primers* de RNA en el telómero de la hebra rezagada se remueven mediante la RNasa H (Reveal, 1997).

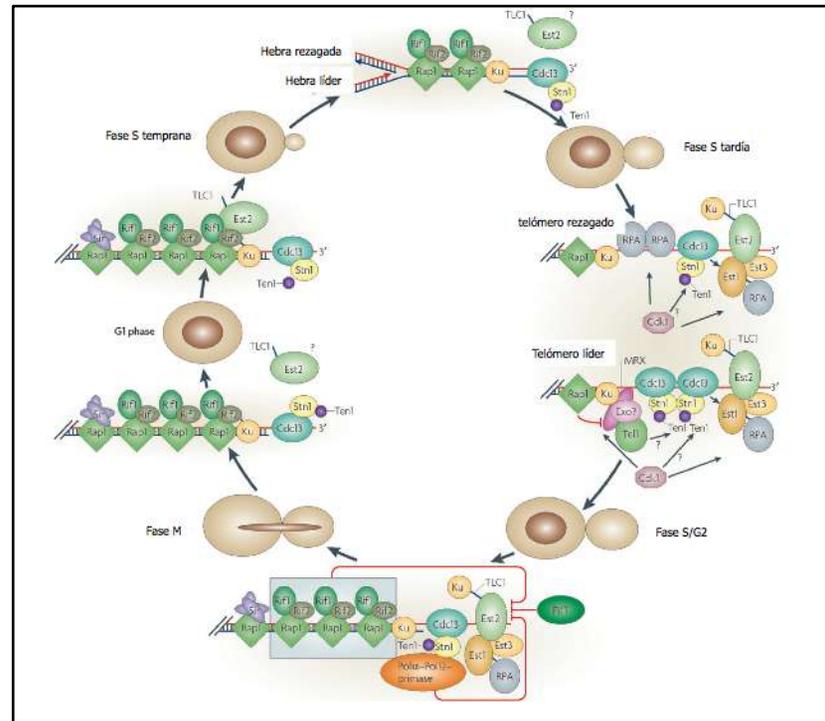
Anexo G

En los repetidos subtelo méricos de las levaduras existen secuencias repetitivas de en medio, como son el centro X y Y' (que flanquean el DNA telomérico) que, a su vez, contienen secuencias de replicación autónomas (ARS). Todas las regiones subtelo méricas incluyen 1 centro X y de 0 a 4 copias del centro Y' (Gilson, 2007). La gran mayoría de los ARS Y' sirven como orígenes de replicación (Markovets, 2004; Stevenson, 1999; Poloumiendo, 2001). En los mamíferos se presume existe la posibilidad de que los telómeros sirvan como orígenes de replicación. Se cree que el factor de repetición TTAGGG 2 (TRF2) que se une al dúplex telomérico contribuye a la formación de orígenes o de elementos tipo orígenes en los telómeros (Gilson, 2007). Este factor recluta al complejo de reconocimiento de origen (ORC) y media la apertura de la doble hélice (Amiard, 2007) mediante exonucleasas (5'-3') y endonucleasas; por lo que participa en la maduración de fragmentos de Okazaki (Gilson, 2007). TRF1 y 2 controlan la apertura y cierre de los bucles teloméricos (t), estructuras adoptadas por los telómeros resultantes de la invasión del sobrante 3' en el dúplex de DNA, por medio de chaperonas y reclutamiento de enzimas. TRF2 interactúa con distintas enzimas que controlan la formación de la cola-G (Gilson, 2007), como son la nucleasa XPF1-ERCC1, el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), la WRN helicasa RecQ y la 5' exonucleasa Apollo. La inhibición de TRF2 provoca la fusión de las terminaciones. TRF1 junta porciones de DNA telomérico, forma un apareo paralelo. TRF2 promueve la invasión de 3', introduce estrés topológico y activa la formación del bucle-t mediante las helicases RecQ: WRN y BLM (en la cual también tiene participación POT1) (Gilson, 2007). POT1 y las helicases pueden desdoblar el cuádruplex-G de DNA (G4), estructuras de cuatro hebras asociadas mediante 4 guaninas en los bucles D, donde coinciden las terminaciones de las hebras con el DNA telomérico. Cabe mencionar que TRF1 también interactúa con POT1. La sobreexpresión de TRF1 provoca el acortamiento del telómero y actúa sobre la asociación del DNA telomérico de

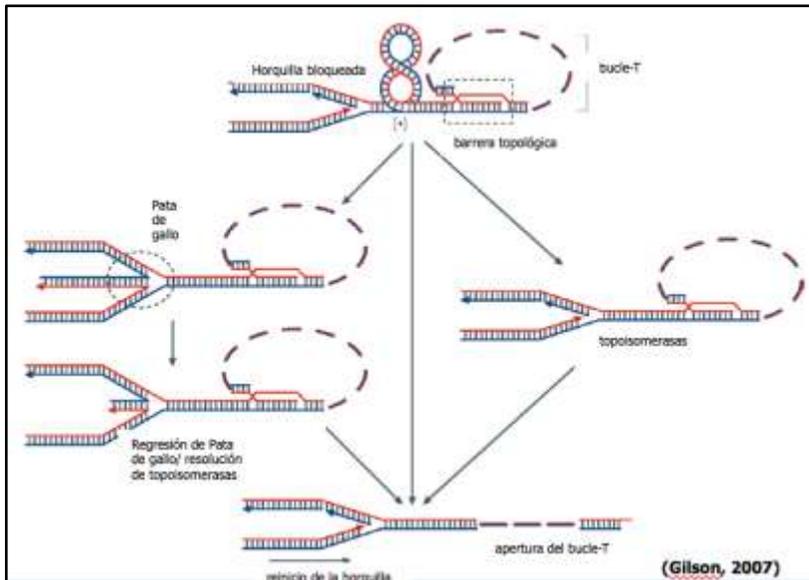
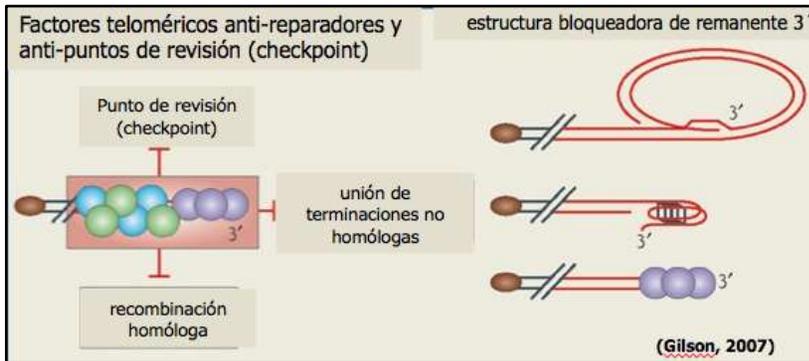
doble cadena. Aunque no se ha demostrado, parece que la estructura formada por TRF2, bucle-D (bucle de desplazamiento resultante del desplazamiento del duplex de DNA por su homóloga hebra), es templete para el cebo de RNA y la subsecuente extensión de DNA (Gilson, 2007). TRF2 se encuentra físicamente unido a la DNA polimerasa β (POL β) y a la endonucleasa-1 (FEN1) por lo que tiene participación en la replicación.

Anexo H

En los humanos la replicación subtelomérica tiene lugar durante la fase tardía S, mientras el telómero se replica antes (Gilson, 2007) inclusive, Verdun & Karlseder (2006) mostraron que la replicación del telómero ocurre en dos fases: una tiene lugar durante la fase S y la segunda durante G2-M. Este destiempo es necesario para coordinar las funciones teloméricas con el ciclo celular ya que es cuando los telómeros más cortos se elongan gracias a CHK2 (cinasa 2 *checkpoint*) que demora el accionamiento de los orígenes subteloméricos. (Figura Gilson, 2007)



Los cuádruplex G, bucles-t y las estructuras parecidas a heterocromatina son algunas formas complejas que puede llegar a adoptar la cromatina telomérica que dificultan el paso de replicación. Las proteínas unidas al telómero (como la helicasa RecQ WRN y BLM, reguladas por TRF2 y POT1) tienen un rol esencial en la coordinación de la progresión de la horquilla de replicación a lo largo del telómero ya que previenen el estancamiento del complejo (lo que produce desgaste del telómero o alta recombinación) (Gilson, 2007). Estas actúan mediante la acción directa de las topoisomerasas que abren el dúplex, o mediante la formación de una pata de gallo en la que se forma una tercera hebra con la réplica de las hebras que se están copiando. Esta tercera hebra posteriormente se separa y se une a las hebras parentales correspondientes desdoblado la estructura compleja de DNA. (Figura Gilson, 2007)



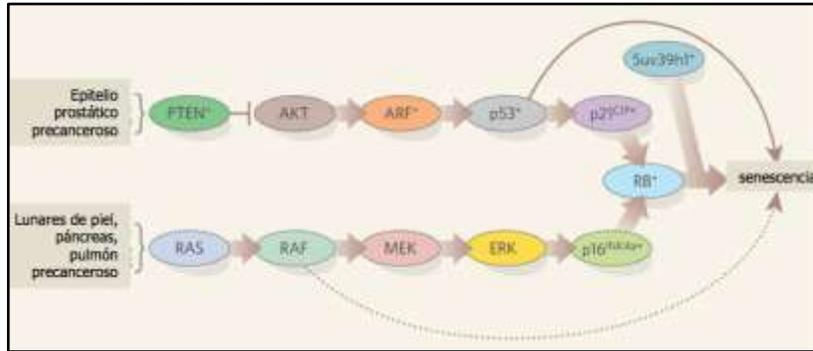
Anexo I

El fibroblasto humano derogado de telomerasa, normalmente, prolifera durante 60 divisiones celulares antes de entrar en senescencia replicativa (Alberts, 5ed). Cuando se les inserta un gen que activa la telomerasa mediante el gen que codifica la subunidad catalítica de la enzima, la longitud telomérica se mantiene y la célula prolifera indefinidamente hasta que entre en acción el mecanismo del ciclo celular *checkpoint*. Este tipo de control de proliferación celular es importante en el mantenimiento de la arquitectura del tejido responsable del envejecimiento. Estas ideas se han probado con ratones transgénicos carentes de telomerasa: los telómeros en cromosomas de ratón son cinco veces mayores a los de un humano por lo que los ratones deben ser criados durante 3 o más generaciones antes de que sus telómeros se reduzcan al tamaño del humano (Alberts, 5ed.). Inicialmente los ratones se desarrollaron de manera normal. En las siguientes generaciones se observó un desarrollo progresivamente más defectuoso en algunos de sus tejidos con mayor proliferación. Los ratones no parecían envejecer prematuramente, sin embargo los animales más viejos tendían a desarrollar tumores (Alberts, 5ed, 2002). Estos ratones se asemejaban a los humanos con la enfermedad genética *dyskeratosis congénita*, que ha sido atribuida al acortamiento prematuro de telómeros. Los individuos afectados con esta enfermedad presentan anomalías en varias estructuras epidérmicas como la piel, uñas, y ductos lacrimosos, así como en la producción de células rojas sanguíneas.

Anexo J

La función promotora senescente de RB está mediada por la proteína metiladora de histonas Suv39h1, unida físicamente al supresor de tumores. La actividad de esta proteína parece ser requerida por OIS inducidos por *Ras* (Sharpless, 2005). Parece que las funciones de Suv39h1 en paralelo con RB alteran el empaquetamiento de DNA requerido para entrar en senescencia. Por otro lado, la senescencia independiente de ARF no requiere la expresión de p16 o p53, y la senescencia inducida por ARF ocurre en respuesta a ARF mutada (Michaloglou, 2005; Chen, 2005). La senescencia es molecularmente heterogénea: requiere de diferentes vías en diferentes tipos celulares y en respuesta a diferentes agravios oncogénicos (Sharpless, 2005). Las células senescentes adquieren cambios fenotípicos que contribuyen al envejecimiento, y a enfermedades relacionadas al mismo: incluyendo cáncer por edad (Campisi, 2005).

(Figura Sharpless, 2005)



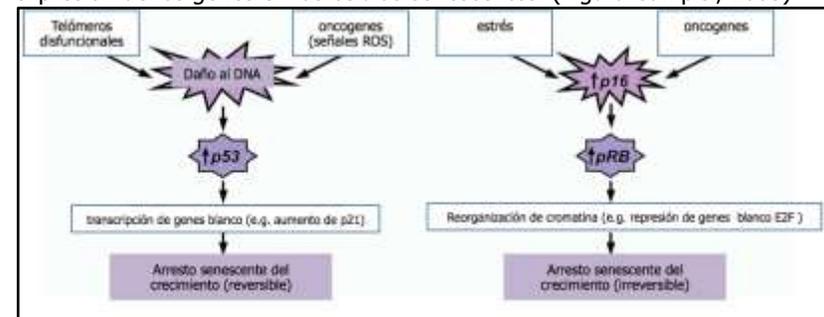
Anexo K

p53, supresor de tumores, contribuye al envejecimiento, en parte mediante la respuesta senescente. Por otro lado, los niveles de expresión de p16 aumentan conforme a la edad en tejidos de rata (Campisi, 2005). La expresión de p16 es paralela a la de β -galactosidasa (SA- β -gal) asociada a senescencia (Dimri, 1995). El incremento de edad sensibiliza el locus INK4a/ARF a la activación transcripcional (Campisi, 2005). Así, debido a que p16 activa la vía de pRB e induce senescencia, la vía pRB y p53 conducen al envejecimiento fenotípico mediante la inducción del proceso senescente (Campisi, 2005). El resultado del uso de p16 y SA- β -gal indican que las células con características senescentes se acumulan con la edad en tejidos de roedores y humanos (Campisi, 2005). Estas células están presentes en tejidos con patologías relacionadas con la edad, como lesiones hepáticas (Campisi, 2005). Así que puede parecer obvio que los tejidos presentan un número constante de células, por lo que la acumulación de células senescentes puede comprometer la renovación o reparación del tejido y de esta manera inducir envejecimiento y patologías.

Anexo L

La vía de p53 participa, también, sobrexpresando oncogenes como RAS. La vía mitogénica RAS señala mediante especies reactivas de oxígeno (ROS). La sobrexpresión oncogénica de RAS induce la respuesta al daño dependiente de p53, por la producción de altos niveles de ROS de daño al DNA (Campisi, 2005). RAS oncogénico también puede inducir p16 (activador de la vía pRB), lo que provee de una segunda barrera ante la proliferación. La inactivación de p53 invierte el arresto senescente (Beausejour, 2003) a pesar del corto tamaño

telomérico en el que se puedan encontrar los cromosomas. La inactivación del gen que codifica p21, un blanco para la transactivación de p53 e inhibidor de la progresión del ciclo celular, causa que la célula esquite la senescencia replicativa dependiente del telómero y que la célula entre en crisis (Brown, 1997). Por otro lado, p16 es un regulador positivo de pRB y supresor de tumores (Campisi, 2005). A p16 también lo induce una variedad de estímulos de estrés que incluyen la sobrexpresión de oncogenes como RAS. Cabe mencionar que algunas células reducen o silencian la expresión de p16 mediante la metilación del promotor por lo que la vía p53 queda como la vía primaria. Curiosamente, p16, previene la inversión de la senescencia causada por la inactivación de p53 mediante la vía pRB (Beausejour, 2003) y se requiere en la senescencia inducida por RAS (Brooks, 2002). La respuesta senescente resulta en la reorganización de la cromatina (Bandyopadhyay, 2002). Las células senescentes desarrollan foci densos de heterocromatina (como SAHF) que coincide con la represión heterocromática dependiente de pRB de genes que codifican ciclinas y otros reguladores positivos del ciclo celular (Bandyopadhyay, 2002). Muchos de los genes reprimidos son blancos de activación de factores de transcripción E2F (promotores de crecimiento), los cuales se convierten en represores transcripcionales en combinación con pRB. Cuando la vía de pRB se desencadena, no hay manera de invertir el proceso senescente mediante la inactivación de p53, p16 o pRB (Beausejour, 2003) ya que la manutención de los dominios de heterocromatina dejan de necesitar la actividad de p16 y pRB. La reorganización de la cromatina parece ser la responsable de la regulación de la expresión de los genes en las células senescentes. (Figura Campisi, 2005)

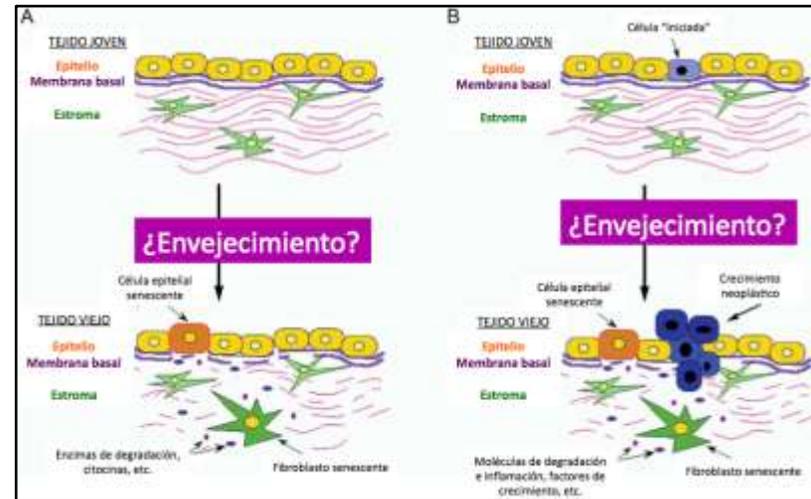


Pareciera que la actividad de la vía p53 compromete la vía de pRB ya que p53 induce la expresión de p21. p21 es un inhibidor de cinasas dependientes de cilinas que causa hipofosforilación y activación de pRB. Sin embargo, las consecuencias de la activación de pRB mediante p21 difieren de la activación por p16. La inactivación de p53 promueve la proliferación en células que expresan p21, pero no en las que expresan p16 (Campisi, 2005). p16 es

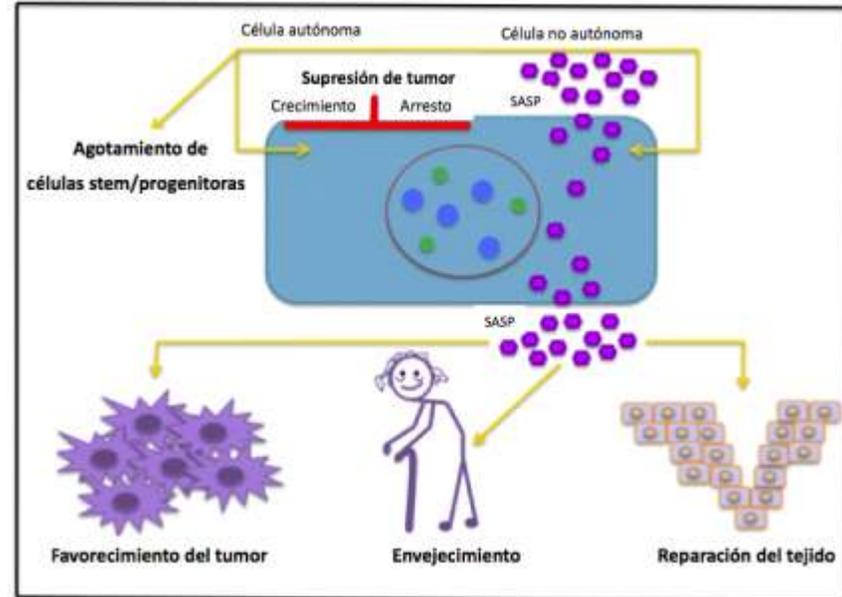
más efectiva en la inducción de senescencia en fibroblastos, en los cuales se puede encontrar expresada sólo una de éstas.

Anexo M

Estos factores varían dependiendo del tipo celular. Los fibroblastos senescentes secretan niveles altos de varias metaloproteinasas de matriz, factores de crecimiento epiteliales y citocinas inflamatorias. De manera que el fenotipo secretor de los fibroblastos senescentes se parece al de los fibroblastos en respuesta al daño, lo que implica remodelación del tejido (Grinnell, 2003). El fenotipo de algunos carcinomas asociados a fibroblastos también se parece al fenotipo senescente de las mismas células ya que éstos carcinomas son componentes del estroma reactivo, lo que facilita la progresión de cánceres epiteliales (Olumi, 1999). Las células senescentes pueden contribuir en el envejecimiento y en las patologías asociadas a la edad, estimulando la remodelación crónica del tejido y/o la inflamación, lo que compromete la estructura y función del tejido. Las células senescentes pueden estimular la proliferación celular de células con mutaciones preneoplásicas (Campisi, 2005). Los fibroblastos senescentes pueden irrumpir la diferenciación funcional y morfológica de las células epiteliales (Parrinello, 2005), entonces las células de estroma senescentes promueven el desarrollo hiperplático. Por otro lado, las células con mutaciones oncogénicas se mantienen bajo la vigilancia del microambiente del tejido, por lo que cambios en éste último pueden resultar en el crecimiento y progresión de las células malignas (Campisi, 2005). Los fibroblastos senescentes crean un ambiente local que promueve el crecimiento de las células epiteliales preneoplásicas (Krtolica, 2001). Los fibroblastos senescentes secretan SASP: amphiregulina y oncogén relacionado al crecimiento α (GRO) que estimula la proliferación de células epiteliales premalignas (Rodier, 2011). También pueden secretar altos niveles de interleucina 6 y 8 (IL-6, IL-8) que promueven la invasión hacia la membrana basal de células premalignas (Coppé, 2008). Los fibroblastos senescentes, junto con las células del mesotelio secretan VEGF, que estimula la migración celular endotelial y la invasión, y junto con los keratinocitos secretan MMPs, que facilitan la invasión de células tumorales (Coppé, 2008). (Figura Campisi, 2005)



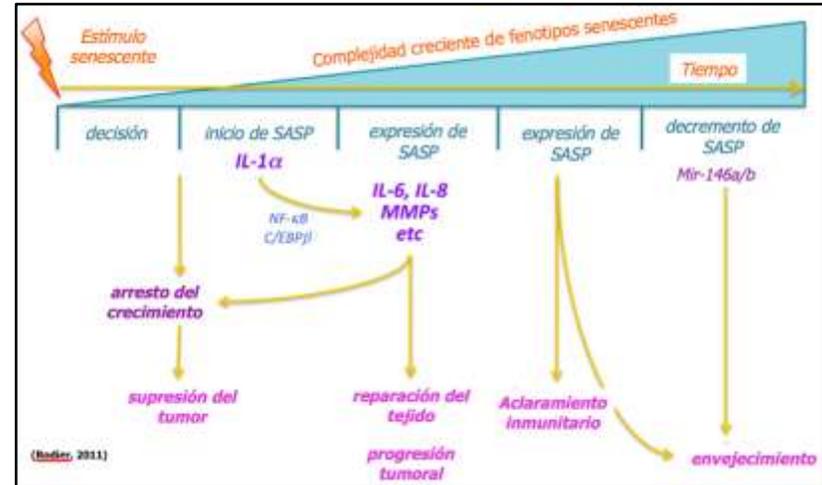
(Figura Rodier, 2011)



Anexo N

Cuando las células estrelladas comprometen su habilidad para entrar en arresto senescente (por deficiencias en p53, p16 y p19ARF) se desarrolla fibrosis severa (Rodier, 2011). Este escenario sería viable en un escenario en el que el daño hepático fuese local y reversible.

La senescencia participa en procesos de supresión de tumores, promoción de tumores, envejecimiento y reparación de tejido (Rodier, 2011). La organización temporal del fenotipo senescente inicia cuando la célula repara el daño o entra en senescencia. La célula entra en senescencia permanente y evita la formación de un tumor mediante células malignas. La expresión de IL-1 α en la superficie celular es una manifestación temprana del fenotipo. Esta citocina actúa uniéndose al receptor IL-1 de superficie celular que inicia una cascada de señalización que activa factores de transcripción (NF- κ B, C/EBP β). Estos factores estimulan la expresión de SASP, incrementan la expresión de IL-1 α e inducen la expresión de citocinas inflamatorias (IL-6 y 8). Estas citocinas intensifican a las proteínas secretadas SASP hasta alcanzar los niveles encontrados en las células senescentes. Algunos componentes de las SASP (IL-6, IL-8, MMPs) pueden promover la reparación tisular, pero también la progresión del cáncer (Rodier, 2011). Algunas proteínas SASP junto con ligandos en la superficie celular y moléculas de adhesión (expresadas por células senescentes) eventualmente atraen células inmunes que matan y despejan células senescentes. Como manifestación final del fenotipo senescente, se expresan los microRNAs (mir-146a y mir-146b) que decrecen la expresión de IL-6 y 8 y de otras proteínas SASP, para prevenir que éstas generen una respuesta inflamatoria persistente. Las SASP, aún así, continúan generando una inflamación crónica ligera. La acumulación de células restantes, que no fueron degradadas y que expresan SASP en un nivel bajo y crónico son las que conducen al envejecimiento (Rodier, 2011). A lo largo del tiempo, la célula senescente se desarrolla un fenotipo complejo benéfico (supresor de tumores y reparador de tejidos) y deleterio (promoción tumoral y envejecimiento) (Rodier, 2011). (Figura Rodier, 2011)



Anexo O

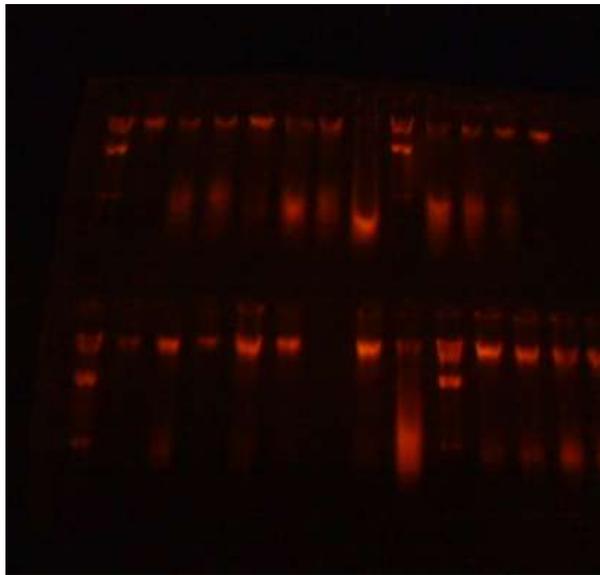
La estrategia para determinar la longitud relativa telomérica mediante PCR cuantitativa fue medir, para cada muestra de DNA, el factor por el cual la muestra difería de una muestra referencia de DNA en el radio de número de copias de repeticiones de telómero a un número de copias de un gen de copia única (scg). Éste radio debe ser proporcional a la longitud telomérica promedio. Las muestras de DNA se diluyeron y el radio del factor de dilución es el radio relativo del telómero en contra del scg (T/S). $T/S = 1$ cuando el DNA desconocido es idéntico al DNA de referencia en su radio de número de repeticiones de copia del telómero al número de copias de scg. El DNA de referencia (la muestra con la que se compara) puede ser de un individuo o un pool. Entonces el radio T/S de un individuo relativo al radio T/S de otro, corresponde a la longitud telomérica relativa de su DNA. La PCR cuantitativa en tiempo real determina, para cada pozo de muestra el Ct, el número de ciclo fraccionable en el que la fluorescencia acumulada en el pozo cruza un umbral dado que se encuentra varias desviaciones estándar sobre la base de fluorescencia. La PCR de telómero (T) y la del scg (S) se realizaron en placas separadas de 96 pozos. Dos reactivos Master Mix fueron usados, uno con el par de primers T y otro con el par de primers S. La composición de las PCRs T y S eran idénticas excepto por los oligonucleótidos primers. Los radios T/S relativos reflejan la diferencia de longitud en el DNA telomérico sólo si el número de copias de S por célula que son amplificadas efectivamente es la misma en todos

los individuos estudiados. Cada *primer* se diseñó de manera que la DNA polimerasa los extienda a partir del extremo 3' cuando se hibridizan a las repeticiones hexaméricas del telómero pero no cuando se hibridiza con otro *primer*. Las seis últimas bases del extremo 5' de cada *primer* no pueden aparearse con la secuencia telomérica aún cuando el resto se encuentra hibridizado de manera óptima. Los complementos de estas secuencias 5' se generan en los extremos 3' de todos los productos que se completan en cada ciclo de PCR, de tal manera que es imposible que esos extremos 3' inicien la síntesis de DNA en medio de la amplificación en ciclos subsecuentes. Cabe mencionar que cualquier gen de copia única autosomal sirve para normalizar la señal telomérica de PCR cuantitativa. Debido a que la cantidad de producto PCR se duplica en cada ciclo, el radio T/S es $2^{-(\Delta C_{t1} - \Delta C_{t2})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$; así un radio relativo T/S se obtuvo para cada pozo. La correlación entre el radio relativo T/S medido cuantitativamente por PCR y las mediciones de longitud relativas TRF (Southern Blot tradicional) concluye que el método por PCR mide la longitud promedio telomérica. Cawthon asegura que los investigadores que quieren identificar factores primarios tomando en cuenta variaciones inter-individuales en la longitud media de la secuencia telomérica verdadera, hacen bien en evitar las mediciones de longitud mediante TRF ya que tienden a resultados falsos a causa de los polimorfismos subteloméricos y de la consecuente elección de corte de la enzima. Por el contrario se debe enfocar en métodos que determinen las cantidades relativas de las repeticiones hexaméricas del telómero *per se*.

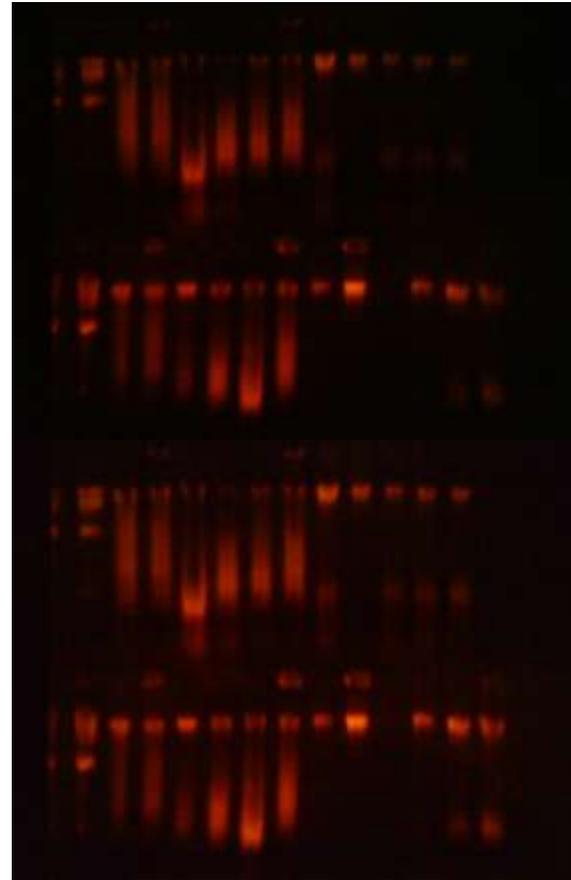
Anexos Resultados

q-PCR

Anexo P Geles de integridad de DNA



1ra y 2da dilución de fases 3 y 4 del modelo de tioacetamida.



1ra y 2da dilución de fase 4

Anexo P.1 Datos espectrofotómetro

modelo	fase	rata	Lectura espectro				
			260Å	280 Å	260/280 Å	radio	concentración
2- TAA	1	ctl 1	0.084	0.048	0.013	2.029	71.000
2- TAA	1	ctl2	0.099	0.063	0.025	1.947	74.000
2- TAA	1	ctl3	0.044	0.035	0.019	1.563	25.000
2- TAA	1	1	0.042	0.028	0.011	1.824	31.000
2- TAA	1	2	0.076	0.096	0.014	1.938	62.000
2- TAA	1	3	0.118	0.064	0.011	2.019	107.000
2- TAA	1	4	0.016	0.011	0.003	1.625	13.000
2- TAA	1	5	0.017	0.012	0.005	1.414	12.000
2- TAA	2	ctl 1	0.083	0.047	0.007	1.900	76.000
2- TAA	2	ctl2	0.025	0.014	0.002	1.917	23.000
2- TAA	2	ctl3	-0.008	-0.030	-0.040	3.200	32.000
2- TAA	2	1	0.051	0.027	0.003	2.000	48.000
2- TAA	2	2	0.099	0.059	0.017	1.952	82.000
2- TAA	2	3	0.062	0.035	0.005	1.900	57.000
2- TAA	2	4	0.099	0.053	0.003	1.920	96.000
2- TAA	2	5	-0.006	-0.028	-0.039	3.000	33.000
2- TAA	3	ctl 1	0.055	0.037	0.018	1.947	37.000
2- TAA	3	ctl2	0.031	0.012	-0.005	2.118	36.000
2- TAA	3	ctl3	0.005	0.003	-0.002	1.400	7.000
2- TAA	3	1	0.068	0.011	-0.036	2.213	104.000
2- TAA	3	2	0.089	0.047	0.005	2.000	84.000
2- TAA	3	3	0.129	0.066	0.006	2.050	123.000
2- TAA	3	4	0.043	0.021	0.000	2.048	43.000
2- TAA	3	5	0.162	0.059	-0.041	2.030	203.000

2- TAA	4	ctl 1	0.020	0.011	0.001	1.900	19.000
2- TAA	4	ctl2	0.028	0.015	0.000	1.867	28.000
2- TAA	4	1	0.002	0.009	-0.006	1.867	28.000
2- TAA	4	2	1.920	0.095	-0.004	1.980	196.000
2- TAA	4	3	0.030	0.017	0.003	1.929	27.000
2- TAA	4	4	0.036	0.016	-0.007	1.870	43.000
2- TAA	4	ctl 3	0.013	0.001	-0.009	2.200	22.000
2- TAA	5	ctl 1	0.017	-0.017	-0.040	2.478	57.000
2- TAA	5	ctl2	0.104	0.025	-0.039	2.234	143.000
2- TAA	5	ctl3	0.259	0.106	-0.035	2.085	294.000
2- TAA	5	1	0.174	0.850	0.001	2.060	173.000
2- TAA	5	2	0.087	0.040	-0.008	1.979	95.000
2- TAA	5	3	0.028	0.009	-0.011	1.95	39
2- TAA	5	4	0.119	0.058	0	2.052	119

Anexo P.2
Datos Diluciones

Modelo	Fase	Muestra	Concentración inicial (C1)	Vol de DNA (V1)	Vol de agua
TAA 2	I	C 1	71	2.25	7.75
TAA 2	I	C 2	74	2.16	7.84
TAA 2	I	C 3	25	6.40	3.60
TAA 2	I	1	31	5.16	4.84
TAA 2	I	2	62	2.58	7.42
TAA 2	I	3	107	1.50	8.50
TAA 2	I	4	13	12.31	-2.31
TAA 2	I	5	12	13.33	-3.33
TAA 2	II	C 1	76	2.11	7.89

TAA 2	II	C 2	23	6.96	3.04
TAA 2	II	C 3	32	5.00	5.00
TAA 2	II	1	48	3.33	6.67
TAA 2	II	2	82	1.95	8.05
TAA 2	II	3	57	2.81	7.19
TAA 2	II	4	96	1.67	8.33
TAA 2	II	5	33	4.85	5.15
TAA 2	II I	C 1	37	4.32	5.68
TAA 2	II I	C 2	36	4.44	5.56
TAA 2	II I	C 3	7	22.86	-12.86
TAA 2	II I	1	104	1.54	8.46

TAA 2	II I	2	84	1.90	8.10
TAA 2	II I	3	123	1.30	8.70
TAA 2	II I	4	43	3.72	6.28
TAA 2	II I	5	203	0.79	9.21
TAA 2	IV C 1		19	8.42	1.58
TAA 2	IV C 2		28	5.71	4.29
TAA 2	IV 1		28	5.71	4.29
TAA 2	IV 2		196	0.82	9.18
TAA 2	IV 3		27	5.93	4.07
TAA 2	IV 4		43	3.72	6.28
TAA 2	IV 5		22	7.27	2.73

TAA 2	V C 1		57	2.81	7.19
TAA 2	V C 2		143	1.12	8.88
TAA 2	V C 3		294	0.54	9.46
TAA 2	V 1		173	0.92	9.08
TAA 2	V 2		95	1.68	8.32
TAA 2	V 3		39	4.10	5.90
TAA 2	V 4		119	1.34	8.66

Anexo P.3

Método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) tratamiento TAA

Muestra por fases	Detector blanco	Task	Ct	Muestra por fases	Detector endógeno	Task	Ct	control de telómero - Ct alβumina)	control de ΔCt (Ct promedio) - ΔCt	fold in difference (2 ^{ΔΔCt}) (tratamiento)
1: c1	telo mer o	calibr ador	21.61	1: C1	Al b u	calibr ador	30 .1 5	- 8.54	1.786 6667	0.289 84094 1

1: c1	telo mero	calibrador	20.59	1: C1	Al bu	calibrador	30 .7	- 10.1 1	0.216 6667	0.860 55141 7
1: c1	telo mero	calibrador	20.54	1: C1	Al bu	calibrador	29 .3 7	- 8.83	1.496 6667	0.354 37120 9
1: c2	telo mero	calibrador	18.81	1: C2	Al bu	calibrador	29 .4 7	- 10.6 6	0.333 3333	1.259 92102 1
1: c2	telo mero	calibrador	18.84	1: C2	Al bu	calibrador	29 .1 7	- 10.3 3	0.003 3333	1.002 31313 9
1: c2	telo mero	calibrador	18.77	1: C2	Al bu	calibrador	29 .7 7	-11	0.673 3333	1.594 75334
1: c3	telo mero	calibrador	19.54	1: C3	Al bu	calibrador	31 .0 4	- 11.5	1.173 3333	2.255 32180 2
1: c3	telo mero	calibrador	19.93	1: C3	Al bu	calibrador	31 .0 3	- 11.1	0.773 3333	1.709 21430 9
1: c3	telo mero	calibrador	20.2	1: C3	Al bu	calibrador	31 .0 7	- 10.8 7	0.543 3333	1.457 33575 7
01 :0 1	telo mero	trata miento	18.11	01 :0 1	Al bu	trata miento	30 .4 5	- 12.3 4	2.013 3333	4.037 13911 2
01 :0 1	telo mero	trata miento	17.89	01 :0 1	Al bu	trata miento	31 .0 3	- 13.1 4	2.813 3333	7.029 06745 5
01 :0 1	telo mero	trata miento	18	01 :0 1	Al bu	trata miento	30 .3 2	- 12.3 2	1.993 3333	3.981 55862 4
01 :0 2	telo mero	trata miento	19.38	01 :0 2	Al bu	trata miento	30 .5 1	- 11.1 3	0.803 3333	1.745 12853 5
01 :0 2	telo mero	trata miento	18.45	01 :0 2	Al bu	trata miento	30 .3 4	- 11.8 9	1.563 3333	2.955 35881 3
01 :0	telo mero	trata miento	19.14	01 :0	Al bu	trata miento	30 .6	- 11.5	1.223	2.334 85555

2	o	o		2	u	o	9	5	3333	4
01 :0 3	telo mero	trata miento	18.55	01 :0 3	Al bu	trata miento	31 .4 7	- 12.9 2	2.593 3333	6.034 91436 8
01 :0 3	telo mero	trata miento	19.05	01 :0 3	Al bu	trata miento	30	- 10.9 5	0.623 3333	1.540 43018 7
01 :0 3	telo mero	trata miento	18.78	01 :0 3	Al bu	trata miento	29 .6 2	- 10.8 4	0.513 3333	1.427 34422 1
01 :0 4	telo mero	trata miento	19.76	01 :0 4	Al bu	trata miento	31 .2 3	- 11.4 7	1.143 3333	2.208 90795
01 :0 4	telo mero	trata miento	20.75	01 :0 4	Al bu	trata miento	31 .2 6	- 10.5 1	0.183 3333	1.135 50440 3
01 :0 4	telo mero	trata miento	20.52	01 :0 4	Al bu	trata miento	31 .2 4	- 10.7 2	0.393 3333	1.313 42452 6
01 :0 5	telo mero	trata miento	18.67	01 :0 5	Al bu	trata miento	30 .2 8	- 11.6 1	1.283 3333	2.434 00697 1
01 :0 5	telo mero	trata miento	18.89	01 :0 5	Al bu	trata miento	31 .2 1	- 12.3 2	1.993 3333	3.981 55862 4
01 :0 5	telo mero	trata miento	19.34	01 :0 5	Al bu	trata miento	31 .2 6	- 11.9 2	1.593 3333	3.017 45718 4
2: c1	telo mero	calibrador	21	2: C1	Al bu	calibrador	29 .7 7	- 8.77	2.103 3333	0.232 71993 4
2: c1	telo mero	calibrador	19.98	2: C1	Al bu	calibrador	31 .2 1	- 11.2 3	0.356 6667	1.280 46400 7
2: c1	telo mero	calibrador	20.19	2: C1	Al bu	calibrador	30	- 9.81	1.063 3333	0.478 52516 5
2: c2	telo mero	calibrador	16.6	2: C2	Al bu	calibrador	31 .0 4	- 14.4 4	3.566 6667	11.84 87806 9

2: c2	telo mer o	calibr ador	17.18	2: C2	Al b u	calibr ador	31 .0 8	- 13.9	- 3.026 6667	8.149 24666 8
2: c2	telo mer o	calibr ador	17.23	2: C2	Al b u	calibr ador	30 .7 9	- 13.5 6	- 2.686 6667	6.438 24152 8
2: C3	telo mer o	calibr ador	20.11	2: C3	Al b u	calibr ador	30 .0 2	- 9.91	0.963 3333	0.512 87057 3
2: C3	telo mer o	calibr ador	20.73	2: C3	Al b u	calibr ador	30 .1 2	- 9.39	1.483 3333	0.357 66149 1
2: C3	telo mer o	calibr ador	20.24	2: C3	Al b u	calibr ador	27 .0 9	- 6.85	4.023 3333	0.061 49729 2
02 :0 1	telo mer o	trata mient o	19.37	02 :0 1	Al b u	trata mient o	29 .3 4	- 9.97	0.903 3333	0.534 65001 2
02 :0 1	telo mer o	trata mient o	18.21	02 :0 1	Al b u	trata mient o	29 .4 8	- 11.2 7	- 0.396 6667	1.316 46275
02 :0 1	telo mer o	trata mient o	Undet ermine d	02 :0 1	Al b u	trata mient o	29 .4 4	#VA LUE !	#VAL UE! !	#VAL UE! !
02 :0 2	telo mer o	trata mient o	17.18	02 :0 2	Al b u	trata mient o	30 .2 3	- 13.0 5	- 2.176 6667	4.521 07766 2
02 :0 2	telo mer o	trata mient o	16.93	02 :0 2	Al b u	trata mient o	29 .9 7	- 12.9 7	- 2.096 6667	4.277 20009 3
02 :0 2	telo mer o	trata mient o	17.19	02 :0 2	Al b u	trata mient o	29 .9 7	- 12.7 8	- 1.906 6667	3.749 41807 3
02 :0 3	telo mer o	trata mient o	18.01	02 :0 3	Al b u	trata mient o	29 .8 5	- 11.8 4	- 0.966 6667	1.954 31998 2
02 :0 3	telo mer o	trata mient o	17.78	02 :0 3	Al b u	trata mient o	29 .6 3	- 11.8 5	- 0.976 6667	1.967 91335 2
02 :0 0	telo mer o	trata mient	18.14	02 :0 0	Al b u	trata mient	29 .4	- 11.3	- 0.456	1.372 36734

3 o	o			3 u	o	7	3	6667	2	
02 :0 4	telo mer o	trata mient o	17.09	02 :0 4	Al b u	trata mient o	30 .0 2	- 12.9 3	- 2.056 6667	4.160 23983 2
02 :0 4	telo mer o	trata mient o	17.22	02 :0 4	Al b u	trata mient o	29 .2 7	- 12.0 5	- 1.176 6667	2.260 53883 1
02 :0 4	telo mer o	trata mient o	17.19	02 :0 4	Al b u	trata mient o	30 .3 2	- 13.1 3	- 2.256 6667	4.778 86065 1
02 :0 5	telo mer o	trata mient o	17.61	02 :0 5	Al b u	trata mient o	29 .4 6	- 11.8 5	- 0.976 6667	1.967 91335 2
02 :0 5	telo mer o	trata mient o	17.62	02 :0 5	Al b u	trata mient o	30 .1 4	- 12.5 2	- 1.646 6667	3.131 09373 8
02 :0 5	telo mer o	trata mient o	17.63	02 :0 5	Al b u	trata mient o	29 .6 6	- 12.0 3	- 1.156 6667	2.229 41732 5
3: C1	telo mer o	calibr ador	18.51	3: C1	Al b u	calibr ador	30 .2 9	- 11.7 8	0.825 55556	0.564 26487 1
3: C1	telo mer o	calibr ador	18.63	3: C1	Al b u	calibr ador	30 .3 6	- 11.7 3	0.875 55556	0.545 04393 8
3: C1	telo mer o	calibr ador	19	3: C1	Al b u	calibr ador	30 .1 9	- 11.1 9	1.415 55556	0.374 86536 5
3: C2	telo mer o	calibr ador	18.28	3: C2	Al b u	calibr ador	29 .9 4	- 11.6 6	0.945 55556	0.519 22956 6
3: C2	telo mer o	calibr ador	18.14	3: C2	Al b u	calibr ador	30 .2 1	- 12.0 7	0.535 55556	0.689 89295 8
3: C2	telo mer o	calibr ador	18.13	3: C2	Al b u	calibr ador	30 .2 7	- 12.1 4	0.465 55556	0.724 19214 8
3: C3	telo mer o	calibr ador	17.6	3: C3	Al b u	calibr ador	31 .1 5	- 13.5 5	- 0.944 44444	1.924 44766 8

3: C3	telo mero	calibr ador	16.55	3: C3	Al bu	calibr ador	31 .1 7	- 14.6 2	- 2.014 44444	4.040 24964 7
3: C3	telo mero	calibr ador	16.48	3: C3	Al bu	calibr ador	31 .1 9	- 14.7 1	- 2.104 44444	4.300 32125 4
03 :0 1	telo mero	trata mient o	17.75	03 :0 1	Al bu	trata mient o	29 .2 4	- 11.4 9	1.115 55556	0.461 51339 9
03 :0 1	telo mero	trata mient o	17.63	03 :0 1	Al bu	trata mient o	29 .5 8	- 11.9 5	0.655 55556	0.634 83098
03 :0 1	telo mero	trata mient o	17.91	03 :0 1	Al bu	trata mient o	29 .7 9	- 11.7 9	0.815 55556	0.568 18964 3
03 :0 2	telo mero	trata mient o	18.44	03 :0 2	Al bu	trata mient o	30 .1 4	- 11.7 4	0.905 55556	0.533 82709 6
03 :0 2	telo mero	trata mient o	19	03 :0 2	Al bu	trata mient o	29 .8 1	- 10.8 1	1.795 55556	0.288 06063 8
03 :0 2	telo mero	trata mient o	19.07	03 :0 2	Al bu	trata mient o	29 .6 6	- 10.5 9	2.015 55556	0.247 31890 7
03 :0 3	telo mero	trata mient o	19.79	03 :0 3	Al bu	trata mient o	29 .1 5	- 9.36 5	3.245 55556	0.105 43636 5
03 :0 3	telo mero	trata mient o	20.11	03 :0 3	Al bu	trata mient o	29 .8 2	- 9.71 2	2.895 55556	0.134 38503 9
03 :0 3	telo mero	trata mient o	20.02	03 :0 3	Al bu	trata mient o	29 .7 8	- 9.76 8	2.845 55556	0.139 12411 7
03 :0 4	telo mero	trata mient o	17.91	03 :0 4	Al bu	trata mient o	28 .7 5	- 10.8 4	1.765 55556	0.294 11340 4
03 :0 4	telo mero	trata mient o	17.88	03 :0 4	Al bu	trata mient o	28 .7 4	- 10.8 6	1.745 55556	0.298 21907 4
03 :0 0	telo mero	trata mient	17.94	03 :0 0	Al bu	trata mient	28 .4	- 10.5	2.105 55556	0.232 36173

4	o	o		4	u	o	4			9
03 :0 5	telo mero	trata mient o	17.11	03 :0 5	Al bu	trata mient o	29 .8	- 12.6 9	- 0.084 44444	1.060 27936 5
03 :0 5	telo mero	trata mient o	17.14	03 :0 5	Al bu	trata mient o	29 .6 7	- 12.5 3	0.075 55556	0.948 97661 4
03 :0 5	telo mero	trata mient o	17.24	03 :0 5	Al bu	trata mient o	30 .4 5	- 13.2 1	- 0.604 44444	1.520 39316
4: C1	telo mero	calibr ador	18.11	4: C1	Al bu	calibr ador	29 .8 9	- 11.7 8	- 0.028 3333	1.019 83326 4
4: C1	telo mero	calibr ador	17.68	4: C1	Al bu	calibr ador	29 .6 7	- 11.9 9	- 0.238 3333	1.179 62908 6
4: C1	telo mero	calibr ador	18.2	4: C1	Al bu	calibr ador	29 .5 9	- 11.3 9	0.361 6667	0.778 26495 5
4: C2	telo mero	calibr ador	20.04	4: C2	Al bu	calibr ador	29 .4 5	- 9.41 5	2.341 6667	0.197 28228 2
4: C2	telo mero	calibr ador	16.66	4: C2	Al bu	calibr ador	29 .5	- 12.8 4	- 1.088 3333	2.126 28251 8
4: C2	telo mero	calibr ador	16.41	4: C2	Al bu	calibr ador	29 .5 1	- 13.1 1	- 1.348 3333	2.546 17803 6
04 :0 1	telo mero	trata mient o	17.4	04 :0 1	Al bu	trata mient o	29 .4 9	- 12.0 9	- 0.338 3333	1.264 29515
04 :0 1	telo mero	trata mient o	16.38	04 :0 1	Al bu	trata mient o	29 .4 9	- 13.1 1	- 1.358 3333	2.563 88810 5
04 :0 1	telo mero	trata mient o	17.58	04 :0 1	Al bu	trata mient o	29 .4 6	- 11.8 8	- 0.128 3333	1.093 03022 8
04 :0 2	telo mero	trata mient o	19.29	04 :0 2	Al bu	trata mient o	28 .9 1	- 9.62 1	2.131 6667	0.228 19408 5

04:02	telo mero	trata miento	19.14	04:02	Al bu	trata miento	29	-	1.891	0.269
								9.86	6667	49554
04:02	telo mero	trata miento	19.19	04:02	Al bu	trata miento	28	-	2.341	0.197
							.6	9.41	6667	28228
04:03	telo mero	trata miento	16.35	04:03	Al bu	trata miento	27	-	0.571	0.672
							.5	11.1	6667	83903
04:03	telo mero	trata miento	16.66	04:03	Al bu	trata miento	28	-	0.321	0.800
							.0	11.4	6667	14496
04:03	telo mero	trata miento	16.35	04:03	Al bu	trata miento	29	-	-	1.876
							.0	12.6	0.908	87595
04:04	telo mero	trata miento	17.84	04:04	Al bu	trata miento	28	-	0.761	0.589
							.8	10.9	6667	81454
04:04	telo mero	trata miento	18.06	04:04	Al bu	trata miento	29	-	0.731	0.602
							.0	11.0	6667	2078
04:04	telo mero	trata miento	18.26	04:04	Al bu	trata miento	29	-	0.401	0.756
							.6	11.3	6667	98325
04:05	telo mero	trata miento	19.24	04:05	Al bu	trata miento	29	-	1.881	0.271
							.1	9.87	6667	37002
04:05	telo mero	trata miento	20.57	04:05	Al bu	trata miento	28	-	3.961	0.064
							.3	7.79	6667	18292
04:05	telo mero	trata miento	20.09	04:05	Al bu	trata miento	28	-	3.231	0.106
							.6	8.52	6667	45630
5:C1	telo mero	calibr ador	18.61	5:C1	Al bu	calibr ador	28	-	-	3.872
							.1	9.51	1.953	68188
5:C1	telo mero	calibr ador	18.38	5:C1	Al bu	calibr ador	28	-	-	8.243
							.9	10.6	3.043	93425
5:C1	telo mero	calibr ador	20.89	5:C1	Al bu	calibr ador	29	-	-	2.075
							.5	8.61	1.053	31883

	o				u				333	9
5:C2	telo mero	calibr ador	20.67	5:C2	Al bu	calibr ador	29	-	-	2.224
							.3	8.71	1.153	27165
5:C2	telo mero	calibr ador	20.34	5:C2	Al bu	calibr ador	29	-	-	2.255
							.0	8.73	1.173	32133
5:C2	telo mero	calibr ador	20.44	5:C2	Al bu	calibr ador	28	-	-	1.990
							.9	8.55	0.993	77889
5:C3	telo mero	calibr ador	21.26	5:C3	Al bu	calibr ador	28	-	-	1.016
							.8	7.58	0.023	30469
5:C3	telo mero	calibr ador	31.97	5:C3	Al bu	calibr ador	28	3.8	11.35	0.000
							.1		6667	38133
5:C3	telo mero	calibr ador	20.17	5:C3	Al bu	calibr ador	29	-	-	3.899
							.6	9.52	1.963	61852
05:01	telo mero	trata miento	20.17	05:01	Al bu	trata miento	29	-	-	2.700
							.1	8.99	1.433	69926
05:01	telo mero	trata miento	20.87	05:01	Al bu	trata miento	28	-	-	1.074
							.5	7.66	0.103	2524
05:01	telo mero	trata miento	21	05:01	Al bu	trata miento	28	-	0.016	0.988
							.5	7.54	667	51379
05:02	telo mero	trata miento	18.12	05:02	Al bu	trata miento	28	-	-	7.853
							.6	10.5	2.973	48502
05:02	telo mero	trata miento	18.49	05:02	Al bu	trata miento	29	-	-	10.00
							.3	10.8	3.323	97428
05:02	telo mero	trata miento	20.06	05:02	Al bu	trata miento	29	-	-	3.234
							.3	9.25	1.693	02986
05:03	telo mero	trata miento	Undet ermine d	05:03	Al bu	trata miento	29	#VA LUE !	#VAL UE!	#VAL UE!
							.4			

05:03	telo mero	trata miento	18.96	05:03	Al bu	trata miento	29 1	- 10.25	- 2.693333	6.468 059723
05:03	telo mero	trata miento	19	05:03	Al bu	trata miento	29 2	- 10.2	- 2.643333	6.247 733864
05:04	telo mero	trata miento	20	05:04	Al bu	trata miento	29 3	- 9.33	- 1.773333	3.418 427907
05:04	telo mero	trata miento	19.89	05:04	Al bu	trata miento	29 2	- 9.43	- 1.873333	3.663 780315
05:04	telo mero	trata miento	24.65	05:04	Al bu	trata miento	25 9	- 0.54	7.016 667	0.007 722764

Anexo P.4

Promedios de cada muestra triplicada

Muestras por fases TAA	promedio $\Delta\Delta Ct$ de triplicados del mismo sujeto	fold in difference ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
1:C1	1.1666667	0.445449349
1:C2	-0.336666633	1.262835422
1:C3	-0.829999967	1.777685321
01:01	-2.2733333	4.834388114
01:02	-1.196666633	2.292094671
01:03	-1.2433333	2.367448922
01:04	-0.5733333	1.48795748
01:05	-1.6233333	3.080860373
2:C1	0.936666633	0.522438589
2:C2	-3.093333367	8.534658141
2:C3	2.156666633	0.224273857
02:01	0.2533333	0.838955794
02:02	-2.060000033	4.16986314

02:03	-0.800000033	1.741101167
02:04	-1.830000033	3.555370807
02:05	-1.260000033	2.394957465
3:C1	1.038888893	0.486702168
3:C2	0.648888893	0.637771311
3:C3	-1.687777773	3.221600884
03:01	0.862222227	0.550104562
03:02	1.572222227	0.336289997
03:03	2.995555556	0.125385675
03:04	1.872222227	0.273152356
03:05	-0.204444444	1.15224255
4:C1	0.0316667	0.978289458
4:C2	-0.031666633	1.022192303
04:01	-0.6083333	1.524496988
04:02	2.1216667	0.2297813
04:03	-0.004999967	1.003471725
04:04	0.6316667	0.645430339
04:05	3.025000033	0.122852572
5:C1	-2.016666333	4.046476826
5:C2	-1.106666333	2.153474639
5:C3	3.123333667	0.114757976
05:01	-0.506666333	1.420763411
05:02	-2.663333	6.334948979
05:03	-2.668333	6.356942328
05:04	1.123333667	0.459031904

Anexo P.5

ANOVA: Results

The results of a ANOVA statistical test performed at 02:12 on 19-APR-2012

Source of Variation	Sum of Squares	d.f.	Mean Squares	F
between	104.8	9	11.64	4.283
error	274.4	101	2.717	
total	379.2	110		

The probability of this result, assuming the null hypothesis, is less than .0001
 The probability of this result, assuming the null hypothesis, is less than .0001

F calculada (4.283) > F Fischer $\alpha = 0.05$ en la cola derecha (gl numerador (k-1)=9; gl denominador (N-k)= 101: ~1.9588) por lo que la hipótesis nula se rechaza, pues el efecto del factor es significativo.
 P: 0.011 < 0.05

Group A: Number of items= 9
 0.290 0.354 0.861 1.00 1.26 1.46 1.59 1.71 2.26
 Mean = 1.1982
 95% confidence interval for Mean: 0.1082 thru 2.288
 Standard Deviation = 0.642
 High = 2.255 Low = 0.2898
 Median = 1.260
 Average Absolute Deviation from Median = 0.501

Group B: Number of items= 15
 1.14 1.31 1.43 1.54 1.75 2.21 2.33 2.43 2.96 3.02 3.98 3.98 4.04 6.03 7.03
 Mean = 3.0118
 95% confidence interval for Mean: 2.167 thru 3.856
 Standard Deviation = 1.74
 High = 7.029 Low = 1.136
 Median = 2.434
 Average Absolute Deviation from Median = 1.29

Group C: Number of items= 9
 6.150E-02 0.233 0.358 0.479 0.513 1.28 6.44 8.15 11.8

Mean = 3.2622
 95% confidence interval for Mean: 2.172 thru 4.352
 Standard Deviation = 4.40
 High = 11.85 Low = 6.1497E-02
 Median = 0.5129
 Average Absolute Deviation from Median = 2.95

Group D: Number of items= 14
 0.535 1.32 1.37 1.95 1.97 1.97 2.23 2.26 3.13 3.75 4.16 4.28 4.52 4.78
 Mean = 2.7301
 95% confidence interval for Mean: 1.856 thru 3.604
 Standard Deviation = 1.36
 High = 4.779 Low = 0.5347
 Median = 2.245
 Average Absolute Deviation from Median = 1.11

Group E: Number of items= 9
 0.375 0.519 0.545 0.564 0.690 0.724 1.92 4.04 4.30
 Mean = 1.5203
 95% confidence interval for Mean: 0.4303 thru 2.610
 Standard Deviation = 1.57
 High = 4.300 Low = 0.3749
 Median = 0.6899
 Average Absolute Deviation from Median = 0.998

Group F: Number of items= 15
 0.105 0.134 0.139 0.232 0.247 0.288 0.294 0.298 0.462 0.534 0.568 0.635
 0.949 1.06 1.52
 Mean = 0.49780
 95% confidence interval for Mean: -0.3465 thru 1.342
 Standard Deviation = 0.402
 High = 1.520 Low = 0.1054
 Median = 0.2982
 Average Absolute Deviation from Median = 0.286

Group G: Number of items= 6
 0.197 0.778 1.02 1.18 2.13 2.55
 Mean = 1.3079
 95% confidence interval for Mean: -2.7064E-02 thru 2.643
 Standard Deviation = 0.874
 High = 2.546 Low = 0.1973

Median = 1.100

Average Absolute Deviation from Median = 0.643

Group H: Number of items= 15

6.418E-02 0.106 0.197 0.228 0.269 0.271 0.590 0.602 0.673 0.757 0.800 1.09
1.26 1.88 2.56

Mean = 0.75714

95% confidence interval for Mean: -8.7175E-02 thru 1.601

Standard Deviation = 0.703

High = 2.564 Low = 6.4183E-02

Median = 0.6022

Average Absolute Deviation from Median = 0.487

Group I: Number of items= 9

1.425E-04 0.380 0.744 0.776 0.831 0.843 1.45 1.46 3.08

Mean = 1.0624

95% confidence interval for Mean: -2.7580E-02 thru 2.152

Standard Deviation = 0.885

High = 3.082 Low = 1.4255E-04

Median = 0.8315

Average Absolute Deviation from Median = 0.548

Group J: Number of items= 10

0.370 0.402 1.01 1.21 1.28 1.37 2.34 2.42 2.94 3.74

Mean = 1.7068

95% confidence interval for Mean: 0.6727 thru 2.741

Standard Deviation = 1.11

High = 3.742 Low = 0.3695

Median = 1.324

Average Absolute Deviation from Median = 0.853

IHQ

Anexo Q

Conteo de las células con expresión de telomerasa

				Células positivas					Células negativas		Células totales	
Número de biopsia	Rata	Anticuerpo analizado	Núcleo (Tipo 1)	Núcleo (%) (Tipo 2)	Citoplasma (%) (Tipo 2)	Citoplasma (%) (Tipo 3)	Núcleo (%) (Tipo 4)	negativas (%)	Células negativas			
			FASE 1 EXPERIMENTAL	B 07 354 29 ABRIL 11	Hígado A3 TAA	AC TELOMERASA	8	0.9 0 9 %		9 5	10.7 95 %	5
B 07 360 29 ABRIL 11	Hígado A2 TAA	AC TELOMERASA		13	1.4 7 7 %	2 6	2.95 5 %	3	0.3 3 4 1 %	8 3 8	95.2 27 %	880
B 07 363 29 ABRIL 11	Hígado A1 TAA	AC TELOMERASA		2	0.2 2 7 %	4 5	5.11 4 %	0	0.0 0 0 %	8 3 3	94.6 59 %	880
B 07 365 29 ABRIL 11	Hígado A4 TAA	AC TELOMERASA		0	0.0 0 0 %	5	0.56 8 %	0	0.0 0 0 %	8 7 5	99.4 32 %	880
			AVE	5.7 5	0.6 5	4.2 7	4.86 %	2.0 0	0.2 3	8.2 9.	94.2 6	880.

				0	%	5		0	%	5	%	0	0
				0	%	5		0	%	5	%	0	0
F A S E 1			SD	5.909	0.67%	38.474	4.37%	2.449	0.28%	42.665	4.85%	0.000	0
			CI	5.791	0.66%	37.704	4.28%	2.400	0.27%	41.811	4.75%	#	N U M !
FASE 1 CONTROL	B 07 355 29 ABRIL 11	Híga do A3 Normal	AC TELOM ERASA	0	0.00%	18.05	21.023%	0	0.00%	69.05	78.977%	88	880
	B 07 358 29 ABRIL 11	Híga do A1 Normal	AC TELOM ERASA	0	0.00%	9.5	10.80%	8	0.91%	77.7	88.30%	88	880
	B 07 362 29 ABRIL 11	Híga do A2 Normal	AC TELOM ERASA	2	0.23%	40	4.55%	0	0.00%	83.8	95.23%	88	880
			AVE	0.667	0.08%	16.67	12.12%	2.67	0.30%	70.0	87.50%	88	880
			SD	1.155	0.13%	73.20	8.32%	4.619	0.52%	71.75	8.15%	0.000	0

										1			7		
			CI	1.307	0.13%	71.735	8.15%	4.526	0.51%	70.320	7.99%	#	N U M !		
FASE 2 EXPERIMENTAL	B 07 497 13 Mayo 12	Híga do 1 TAA	AC. TELOM ERASA	0	0.00%	43	4.886%	0	0.00%	0.00%	83.7	95.11%	88	880	
	B 07 498 13 Mayo 13	Híga do 2 TAA	AC. TELOM ERASA	0	0.00%	180	20.455%	0	0.00%	0.00%	700	79.55%	88	880	
	B 07 502 13 Mayo 16	Híga do 3 TAA	AC. TELOM ERASA	0	0.00%	25	2.841%	0	0.00%	0.00%	855	97.16%	88	880	
	B 07 504 13 Mayo 17	Híga do 4 TAA	AC. TELOM ERASA	0	0.00%	65	7.386%	0	0.00%	0.00%	815	92.61%	88	880	
	B 07 507 13 Mayo 18	Híga do 5 TAA	AC. TELOM ERASA	0	0.00%	108	12.273%	0	0.00%	0.00%	772	87.73%	88	880	
				AVE	0.000	0.00%	84.2	9.568%	0	0.00%	0.00%	795.8	90.432%	88	880

					%			%				
F A S E 2			SD	0	0.000%	61.876	7.031%	0	0.000%	61.876	7.031%	0.000%
			CI	# N U M !	# N U M !	54.236	6.163%	# N U M !	# N U M !	54.236	6.163%	# N U M !
F A S E 2 CONTROL	B 07 495 13 Mayo 11	Híga do 1 Normal	AC. TELOMERASA	3	0.341%	10	1.136%	0	0.000%	867	98.52%	880
	B 07 500 13 Mayo 14	Híga do 2 Normal	AC. TELOMERASA	0	0.000%	4	0.455%	0	0.000%	876	99.55%	880
	B 07 501 13 Mayo 15	Híga do 3 Normal	AC. TELOMERASA	0	0.000%	50	5.682%	0	0.000%	830	94.32%	880
			AVE	1.000	0.114%	21.333	2.424%	0.000	0.000%	857.667	97.462%	880.000
			SD	1.732	0.197%	25.007	2.842%	0.000	0.000%	24.379	2.770%	0.000

			CI	1.960	0.223%	28.297	3.216%	# N U M !	# N U M !	27.587	3.135%	# N U M !
F A S E 3 EXPERIMENTAL	B 07 568 9 MAYO 11	Híga do TAA 1	AC. TELOMERASA	0	0.000%	0	0.000%	0.000	0.000%	880	100.00%	880
	B 07 569 9 MAYO 11	Híga do TAA 2	AC. TELOMERASA	6	0.682%	25	2.841%	0	0.000%	849	96.477%	880
	B 07 570 9 MAYO 11	Híga do TAA 3	AC. TELOMERASA	4	0.455%	0	0.000%	0.000	0.000%	876	99.545%	880
			AVE	3.333	0.334%	8.333	0.900%	0.000	0.000%	863.333	98.107%	880.000
F A S E 3			SD	3.055	0.303%	14.334	1.616%	0.000	0.000%	16.862	1.909%	0.000
			CI	3.457	0.344%	16.333	1.819%	# N U M	# N U M	19.08	2.162%	# N U M

						3		!	!	1		!
FASE 3 CONTROL	B 07 573 9 MAYO 11	Híga do N3	AC. TELOM ERASA	0	0.0000%	15	1.705%	0	0.0000%	865	98.295%	880
	B 07 573 9 MAYO 11	Híga do N3	AC. TELOM ERASA	0	0.0000%	0	0.0000%	0	0.0000%	880	100.000%	880
	B 07 573 9 MAYO 11	Híga do N3	AC. TELOM ERASA	0	0.0000%	100	11.364%	0	0.0000%	780	88.636%	880
			AVE	0.000	0.000	38.33	0.04	0.000	0.000	841.67	0.96	880.000
			SD	0.000	0.000	10.61	0.01	0.000	0.000	10.61	0.01	0.000
			CI	# N U M !	# N U M !	14.000	0.017	# N U M !	# N U M !	14.000	0.017	# N U M !
EXPERIMENT	B 07 589 13 MAYO	Híga do 1 TAA	AC. TELOM ERASA	49	5.568	237	26.932%	7	0.795	587	66.705%	880

											%				%			
	B 07 597 13 MAYO 11	Híga do 3 TAA	AC. TELOM ERASA	85	9.659%	167	18.977%	5	0.568%	623	70.795%	880						
	B 07 599 13 MAYO 11	Híga do 4 TAA	AC. TELOM ERASA	83	9.432%	38	4.318%	1	0.114%	758	86.136%	880						
	B 07 600 13 MAYO 11	Híga do 4 TAA	AC. TELOM ERASA	2	0.227%	210	23.864%	12	1.364%	656	74.545%	880						
	B 07 593 13 MAYO 11	Híga do 2 TAA	AC. TELOM ERASA	23	2.614%	86	9.773%	21	2.386%	750	85.227%	880						
			AVE	48.400	0.055	147.600	0.168	9.200	0.010	674.800	0.767	880.000						
FASE 4			SD	36.521	0.042	83.769	0.095	7.694	0.009	76.359	0.087	0.000						
			CI	32.012	0.036	73.426	0.083	6.744	0.008	66.930	0.076	# N U M !						

FASE 4 CONTROL	B 07 591 13 MAYO 11	Híga do N1	AC. TELOM ERASA	0	0. 0 0 0 %	0	0. 0 0 0 %	0	0. 0 0 0 %	8 8 0 0	10 0. 00 0 0 %	8 8 0
	B 07 592 13 MAYO 11	Híga do N2	AC. TELOM ERASA	1	0. 1 1 4 %	0	0. 0 0 0 %	0	0. 0 0 0 %	8 7 9	99 .8 86 %	8 8 0
	B 07 595 13 MAYO 11	Híga do N3	AC. TELOM ERASA	4	0. 4 5 5 %	0	0. 0 0 0 %	0	0. 0 0 0 %	8 7 6	99 .5 45 %	8 8 0
			AVE	1. 6 6 7	0. 0 0 2	0. 0 0 0	0. 0 0 0	0. 0 0 0	0. 0 0 0	8 7 8. 3 3 3	0. 99 8	8 8 0 0 0 0
			SD	2. 0 8 2	0. 0 0 2	0. 0 0 0	0. 0 0 0	0. 0 0 0	0. 0 0 0	2. 0 8 2	0. 0 0 2	0. 0 0 0
			CI	2. 3 5 6	0. 0 0 3	# N U M !	# N U M !	# N U M !	# N U M !	2. 3 5 6	0. 0 0 3	# N U M !
FASE 5 EXPERIMENTAL	B 07 967 13 MAYO 11	Híga do TAA 3	AC. TELOM ERASA	6 7	7. 6 1 4 %	5 0	5. 68 2 %	0	0. 0 0 0 %	7 6 3	86 .7 05 %	8 8 0

	B 07 967 13 MAYO 11	Híga do TAA 3	AC. TELOM ERASA	6	0. 6 8 2 %	0	0. 0 0 0 %	0	0. 0 0 0 %	8 7 4	99 .3 18 %	8 8 0
	B 07 972 13 MAYO 11	Híga do TAA 5	AC. TELOM ERASA	3 0	3. 4 0 9 %	5	0. 56 8 %	4	0. 4 5 5 %	8 4 1	95 .5 68 %	8 8 0
	B 07 973 13 MAYO 11	Híga do TAA 4	AC. TELOM ERASA	3 5	3. 9 7 7 %	7 6	8. 63 6 %	0	0. 0 0 0 %	7 6 9	87 .3 86 %	8 8 0
	B 07 974 13 MAYO 11	Híga do TAA 1	AC. TELOM ERASA	1 8	2. 0 4 5 %	4 3	4. 88 6 %	0	0. 0 0 0 %	8 1 9	93 .0 68 %	8 8 0
			AVE	3 1. 2 0 0	0. 0 3 5	3 4. 8 0 0	0. 0 4 0	0. 8 0 0	0. 0 0 1	8 1 3. 2 0 0	0. 92 4	8 8 0. 0 0 0
FASE 5			SD	2 2. 9 5 0	0. 0 2 6	3 1. 9 9 5	0. 03 6	1. 7 8 9	0. 0 0 2	4 7. 3 7 3	0. 05 4	0. 0 0 0
			CI	2 0. 1 1 6	0. 0 2 3	2 8. 0 4 5	0. 03 2	1. 5 6 8	0. 0 0 2	4 1. 5 2 3	0. 04 7	# N U M !
	B 07 966	Híga do	AC. TELOM	2	0. 2	1	0. 11	0	0. 0	8 7	99 .6	8 8

	13 MAYO 11	Control 1	ERASA		27%		4%		00%	7	59%	0
	B 07 969 13 MAYO 11	Hígado Control 3	AC. TELOMERASA	12	1364%	1	0.114%	0	00%	867	98.523%	880
	B 07 970 13 MAYO 11	Hígado Control 2	AC. TELOMERASA	4	0.455%	0	0.000%	0	00%	876	99.545%	880
			AVE	6.0000	0.0007	0.0067	0.0001	0.0000	0.0000	8733	0.992	88000
			SD	5.292	0.006	0.0057	0.0001	0.0000	0.0000	558	0.006	0.000
			CI	5.988	0.006	0.0056	0.0001	#NUM!	#NUM!	5397	0.006	#NUM!

Anexo Q.1

Datos estadísticos de la cuantificación de presencia de telomerasa

Con el apoyo en estadística del Dr. José Sotero Delgado Domínguez, usando el software "STATISTICA" se formularon 30 variables para ser evaluadas mediante la prueba U de Mann-Whitney de la siguiente manera:

Variable	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Fase V
----------	--------	---------	----------	---------	--------

Nucleólo ratas control	1	7	13	19	25
Nucleólo ratas experimentales	2	8	14	20	26
Núcleo ratas control	3	9	15	21	27
Núcleo ratas experimentales	4	10	16	22	28
Cels negativas control	5	11	17	23	29
Cels negativas experimentales	6	12	18	24	30

Para entonces ser comparadas con el programa:

RESULTADOS		valor de p significativo
variable	valor de p	
1 vs. 2	0.27	
3 vs. 4	0.37	
5 vs. 6	0.37	
7 vs. 8	0.19	
9 vs. 10	1	
11 vs. 12	0.19	
13 vs. 14	0.12	
15 vs. 16	> 1	
17 vs. 18	0.12	
19 vs. 20	0.052	fase 4 nucleólo ratas control vs fase 4 nucleólo ratas experimentales
21 vs. 22	0.0021	fase 4 núcleo ratas control vs fase 4 núcleo rtas experimentales

23 vs. 24	0.025	fase 4 cels negativas ratas control vs fase 4 cels negativas ratas experimentales
25 vs. 26	0.052	fase 5 nucleólo ratas control vs. fase 5 nucleólo ratas experimentales
27 vs. 28	0.43	
29 vs. 30	0.52	fase 5 cels negativas ratas control vs fase 5 cels negativas ratas experimentales
1 vs. 7	0.73	
1 vs. 13	0.31	
1 vs. 19	0.48	
2 vs. 14	0.59	
2 vs. 20	0.065	
2 vs. 26	0.05	nucleólo ratas experimentales fase 1 vs nucleólo ratas experimentales fase 5
4 vs. 16	0.18	
4 vs. 22	0.063	
4 vs. 28	0.38	
6 vs. 18	0.85	
6 vs. 24	0.027	cels negativas ratas experimentales fase 1 vs. cels negativas ratas experimentales fase 4
6 vs. 30	0.05	cels negativas ratas experimentales fase 1 vs. cels negativas ratas experimentales fase 5
14 vs. 16	0.12	
20 vs. 22	0.075	
26 vs. 28	0.007	
2 vs. 4	0.37	

2 vs. 6	0.002	nucleólo ratas experimentales fase 1 vs cels negativas ratas experimentales fase 1
20 vs. 24	0.009	nucleólo ratas experimentales fase 4 vs cels negativas ratas experimentales fase 4
26 vs. 30	0.009	nucleólo ratas experimentales fase 5 vs cels negativas ratas experimentales fase 5
14 vs. 20	0.1	
16 vs. 22	0.021	
18 vs. 24	0.179	
14 vs. 26	0.035	nucleólo ratas experimentales fase 3 vs. nucleólo ratas experimentales fase 5
16 vs. 28	0.43	
18 vs. 30	0.548	
20 vs. 26	0.46	
22 vs. 28	0.013	núcleo ratas experimentales fase 4 vs. núcleo ratas experimentales fase 5
24 vs. 30	0.17	