



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DURANTE LA CIRROSIS
EXPERIMENTAL Y SU REVERSIÓN POR EL HEPATOPROTECTOR IFC-305

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB. JESÚS RAFAEL RODRÍGUEZ AGUILERA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
[Instituto de Fisiología Celular](#)

DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MÉXICO, D. F. febrero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo fue elaborado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en los laboratorios de la Dra. Victoria Chagoya Hazas y del Dr. Félix Recillas Targa con los apoyos de DGAPA-UNAM IN207012 para la Dra. Victoria Chagoya y DGAPA-UNAM IN203811 e IN201114; CONACyT 128464 y 220503 para el Dr. Félix Recillas. Se agradece a ambos la confianza, el apoyo, la contribución al conocimiento y mi formación académica.

Los estudios de maestría del QFB Jesús Rafael Rodríguez Aguilera se realizaron con el apoyo de la beca de maestría del CONACyT

Se agradece y reconoce al comité tutor que asesoró esta tesis, el cual estuvo integrado por:

Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Emilio Rojas del Castillo	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Se agradece la ayuda técnica brindada por la Biol. Georgina Guerrero Avendaño, el Dr. Fernando Suaste Olmos, la Dra. Nora Gabriela Velasco Loyden, la Dra. Mariana Domínguez López, la Biol. Susana Vidrio Gómez y la M en C. Lucía Yañez Maldonado. Asimismo se reconoce el trabajo de los laboratoristas Jesús Salgado y Gianelli Cortés González así como el de las secretarías Rosario Villaseñor Ávila y Gabriela Valdés Silva.

Asesorías fundamentales para la realización de éste trabajo fueron proporcionadas por la cDra. Rosario Pérez Molina, la M en C. Carla Cadena del Castillo, el Dr. Carlos Alberto Guerrero Hernández, la cDra. Erandi Ayala Ortega, el cDr. Edgar Fernán González Buendía, el Dr. Christian Valdes Quezada, la M en C. Mariana Ruiz Velazco Leyva, la M en C. Yael Fonseca Guzmán y el cDr. Rodrigo Arzate Mejía.

Gracias por el apoyo durante los experimentos a la M en C. Lidia Martínez Pérez †, a la M en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca, a la Biol. Nuria Guerrero Celis, a la Dra. Elizabeth Castillo Villanueva, a la Dra. Dianely Colli Magaña, a la Dra. Isis Trujillo González y al estudiante de IBB Adrián Rafael Murillo de Ozores.

A la Lic. María Elena Rodríguez Aguilera por sus observaciones y comentarios sobre el escrito de la Tesis.

Se agradece al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por los recursos brindados para asistir a presentar parte de este trabajo al *Keystone Symposia Chromatin Mechanism and Cell Physiology* en Oberstdorf, Alemania en marzo de 2014.

Finalmente se agradece a los miembros del Jurado que revisaron y enriquecieron este trabajo con sus observaciones y comentarios.

PRESIDENTE	Dr. José Pedraza Chaverri	(FQ-UNAM)
VOCAL	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	(IFC-UNAM)
VOCAL	Dra. Viviana Valadez Graham	(IBT-UNAM)
VOCAL	Dr. Julio Isael Pérez Carreón	(INMEGEN)
VOCAL	Dra. Nimbe Torres y Torres	(INNSZ)

A la UNAM por adoptarme y ser mi segunda casa desde hace 8.5 años.

Mientras haya vida, habrá esperanza
Stephen Hawking

"Se decía que el DNA era el libro de la vida, pero le faltaban las comas, los puntos..., es decir, la epigenética".
Manel Esteller

In memoriam

Isabel Mendieta Ramirez, Mamis

Lidia Martínez Pérez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios porque que sin El no puedo hacer nada.

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

A mis amigos que siempre están presentes.

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

A la Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas y al Dr. Félix Recillas Targa por permitirme formar parte de su equipo de investigación.

Al la M en C Rosario Pérez Molina, a la M en C. Carla Cadena del Castillo y al Dr. Carlos Alberto Guerrero Hernández por todo el apoyo para que este trabajo saliera adelante.

A la QFB Cristina Aranda Fraustro por los consejos brindados.

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

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
I. RESUMEN	12
I. ABSTRACT	13
II. INTRODUCCIÓN	14
1. El hígado	14
1. Enfermedades hepáticas	16
1.1. La cirrosis.....	17
1.1.1. Diagnóstico de la cirrosis.....	17
1.1.2. Curso natural de la cirrosis.....	18
1.1.3. Patofisiología de la cirrosis.....	18
1.1.4. Factores que predisponen a la fibrosis	20
1.1.5. Prevención y tratamiento de las complicaciones de la cirrosis	22
1.1.6. Reversibilidad de la cirrosis.....	26
2. Regulación de la transcripción	28
2.1. Los promotores de los genes	29
3. Regulación epigenética	31
3.1. La cromatina y su estructura.....	32
3.1.1. Metilación del DNA	34
3.1.1.1. Mecanismo de desmetilación activa del DNA.....	36
3.1.2. El código epigenético de las histonas.....	39
3.1.2.1. La acetilación y desacetilación de las histonas	40
3.1.2.2. La metilación y desmetilación de histonas	42
3.1.3. Resumen epigenética y cromatina.....	44
3.2. Epigenética en la fibrosis hepática.....	45
4. Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)	47
4.1. Mecanismos transcripcionales de PPAR γ en adipocitos y macrófagos.....	50
4.2. Resumen epigenética en la fibrosis hepática y PPAR γ	52
III. ANTECEDENTES	54
IV. JUSTIFICACIÓN	63
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	63
VI. HIPÓTESIS.....	63
VII. OBJETIVO GENERAL.....	63
VIII. OBJETIVOS PARTICULARES	64
IX. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	64
1. Sustancias químicas.....	64
2. Obtención de material biológico.....	65
2.1. Tratamiento de animales e inducción de cirrosis con CCl ₄	65
2.2. Aislamiento y cultivo de células estelares hepáticas	67
X. MÉTODOS.....	71
1. Evaluación cuantitativa de la metilación global de DNA genómico con el kit <i>Imprint Methylated DNA Quantification</i>	71
2. Análisis del estado de metilación de los promotores de <i>Pparg</i> y <i>Col1a1</i>	72
3. Dot blot de DNA	74
4. Western blot de histonas	74
5. Inmunofluorescencia.....	75
6. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	76

7. Análisis estadístico	77
XI. RESULTADOS	78
1. El IFC-305 mantiene la cantidad de DNA metilado durante la activación de HSC	78
2. Estado de metilación de los promotores de <i>Pparg</i> y <i>Col1a1</i>	79
3. El IFC-305 evita la pérdida global de 5hmC en el hígado de ratas cirróticas	87
4. El IFC-305 evita el incremento de 5hmC global durante la activación de HSC	89
5. La hiperacetilación de la histona H4 perdida en la cirrosis es restaurada por la administración de IFC-305.....	91
6. El IFC-305 mantiene el grado de acetilación de la histona H4 control durante la activación de HSC	93
7. El IFC-305 favorece una cromatina abierta en el promotor de <i>Pparg</i> en hígados de ratas cirróticas.....	95
8. El IFC-305 favorece el reclutamiento de PPAR γ al promotor de <i>Col1a1</i> para reprimir su expresión en la cirrosis preestablecida.....	107
XII. DISCUSIÓN.....	109
1. Evaluación global de la metilación del DNA genómico durante la activación de HSC.....	109
2. Estado de metilación del promotor de <i>Pparg</i>	110
3. Estado de metilación del promotor de <i>Col1a1</i>	112
4. Evaluación global de 5hmC	114
5. Determinación de la cantidad global de acetilación de la histona H4.....	116
6. Propuesta. Regulación epigenética de <i>Pparg</i> y mecanismo de represión de <i>Col1a1</i> por PPAR γ mediada por el IFC-305	117
XIII. CONCLUSIONES	121
XIV. LIMITANTES DEL ESTUDIO.....	123
XV. PERSPECTIVAS	123
XVI. REFERENCIAS.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
10IFC	Tratamiento con IFC-305 durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis
10ss	Tratamiento con solución salina durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis
5Azadc	5-azadesoxicitidina
5caC	5-carboxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5hmU	5-hidroximetiluracilo
5IFC	Tratamiento con IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis
5mC	5-metilcitosina
5ss	Tratamiento con solución salina durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis
Ac	Acetilación
ADP	Difosfato de adenosina
AID	Desaminasa de citidina inducida por activación
ALT	Alanina aminotransferasa
aP2	Proteína de adipocito 2
APOBEC	Enzima editora de la apolipoproteína B mediante RNAm semejante al polipéptido catalítico
ARP	Proteína ácida ribosomal
ASH1	Metiltransferasa de la histona H3K4/H3K36
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Trifosfato de adenosina
BER	Maquinaria de reparación por escisión de bases
BHMT	Betaina-homocisteína S-metiltransferasa
BSA	Albúmina sérica bovina
C/EBP	Proteína de unión a CCAAT/enhancer
CBP	Proteína de unión a CREB
CBS	Cistationina-β-sintasa
CCl ₃ ·	Radical triclorometano
CCl ₃ OO·	Radical triclorometiloperóxido
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CDKN1A	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A
CHC	Carcinoma hepatocelular
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CIT	Complejo de inicio de la transcripción
CLD	Enfermedad crónica del hígado
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
Col1a1	Gen de colágena tipo 1 alfa 1
CpG	Dinucleótido CG (citosina - fosfato - guanina)

Continuación lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
CREB	Elemento de respuesta de unión a cAMP
d	día
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genómico
Dnmt	Metiltransferasa de DNA
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
dZNep	3-desazaneplanocina A
ELISA	Prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas
FAD	Dinucleótido de flavina adenina
FADH2	Dinucleótido de flavina adenina reducido
g	gramo
G9a	Metiltransferasa de la lisina 9 de la histona H3
Gadd45a	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha</i>
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
h	hora
H1	Histona H1
H2A	Histona H2A
H2B	Histona H2B
H3	Histona H3
H3K20	Lisina 20 de la histona H3
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
H3K36	Lisina 36 de la histona H3
H3K4me2	Dimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H3K79	Lisina 79 de la histona H3
H3K9me3	Trimetilación de la lisina 9 de la histona H3
H4	Histona H4
H4	Histona H4
H4ac	Histona H4 hiperacetilada
HAT	Acetiltransferasa de histona
HBsAG	Antígeno de superficie de la hepatitis B
HBV	Virus de hepatitis B
HCV	Virus de hepatitis C
HDAC	Desacetilasa de histona
HDM	Desmetilasa de histona

Continuación lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
HDV	Virus de hepatitis D
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanesulfónico
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSC	Célula estelar hepática
HVPG	Gradiente de presión venosa hepática
IFC-305	Aspartato de Adenosina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP	Intraperitoneal
JARID1	Dominio 1 rico en AT de jumonji
JmjC	Jumonji C
K	Lisina
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
KDM	Desmetilasa de lisina
kg	kilogramo
KMT	Metiltransferasa de lisina
LCR	Región de control del locus
lncRNA	RNA largo no codificante
LSD1	Monoamino oxidasa dependiente de flavina capaz de desmetilar lisinas mono, di y trimetiladas
M	Molar (mol/L)
MAT	Metionina adenosiltransferasa
MBD	Proteína de unión a DNA metilado
m-CpG	CpG metilada
MeCP2	Proteína de unión a CpG metilada 2
MF	Miofibroblasto contractil
mg	Miligramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitro
MLL	Leucemia de linaje mixto
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercurio
MS	Metionina sintasa
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NaCl	Cloruro de sodio
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólica
NaOH	Hidróxido de sodio

Continuación lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
NCoR	Corepresor 1 de receptores nucleares
ng	Nanogramo
NK	<i>Natural killer</i>
NL	Hígado normal
nm	Nanómetro
NTC	Control sin templado
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PolII	RNA polimerasa II
PPAR	Receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales
PPARE	Elemento de respuesta de PPAR
<i>Pparg</i>	Gen del receptor nuclear PPAR γ
PPAR α	Receptor nuclear alfa activado por proliferadores peroxisomales
PPAR β/δ	Receptor nuclear beta/delta activado por proliferadores peroxisomales
PPAR γ	Receptor nuclear gama activado por proliferadores peroxisomales
pRB	Proteína retinoblastoma
Pr-Set7	Metiltransferasa de la lisina 20
PTCH1	Patched 1
Pten	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTM	Modificación post-traducciona
PU.1	Factor de transcripción hematopoyético específico
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
Rpd3	Desacetilasa de histona en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
RXR	Receptor de ácido retinóico X
SAH	S-adenosilhomocisteina
SAHH	S-adenosilhomocisteina hidrolasa
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SET	Dominio de metilación de histonas conservado
SFB	Suero fetal bovino
SRC	Coactivador del receptor de esteroides
SUMO1	Pequeño modificador tipo ubiquitina
Suv4-20	Metiltransferasa de la lisina 20
TBL1	Transducina β tipo 1

Continuación lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
TBLR1	Proteína relacionada TBL1
TDG	Timina DNA glucosilasa
TET	Enzima Ten eleven translocation
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
to	10 semanas de tratamiento con CCl ₄ para inducir cirrosis
TZD	Tiazolidinediona
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTR	Regiones no traducida del gen
WT	Silvestre
αKG	alfa cetoglutarato
α-SMA	Actina de músculo liso alfa
μg	Microgramo
μL	Microlitro

I. RESUMEN

La cirrosis es un proceso complejo que altera el fenotipo celular hepático, sus características patológicas consisten en la generación de un grado de fibrosis que resulta en una distorsión estructural y la disfunción del hígado.

Ensayos de transcriptoma realizados en el laboratorio revelaron que 414 genes que se encuentran desregulados en muestras cirróticas tienden a la normalidad con el tratamiento de un derivado de adenosina, IFC-305 (Patente UNAM 207422). Algunos de estos genes fueron profibrogénicos y adipogénicos como *Col1a1* y *Pparg*, respectivamente. Por otra parte el tratamiento con IFC-305 a ratas cirróticas provoca un incremento en la cantidad global de DNA metilado.

Para conocer los cambios epigenéticos que ocurren, a nivel global y en los promotores de los genes *Pparg* y *Col1a1*, durante la cirrosis y cuáles son regulados con la administración del IFC-305, se utilizó por una parte un modelo murino de inducción de cirrosis con CCl_4 para el estudio a nivel de hígado completo y además se evaluaron estos cambios en un modelo de activación de células estelares hepáticas (HSC) en cultivos primarios.

La evaluación de la metilación global de DNA en el cultivo de HSC reveló que el IFC-305 previene el incremento de la metilación que se observó en las HSCs activadas. Al evaluar el estado de metilación del DNA se encontraron 4 CpGs en la región analizada de *Col1a1* que pierden la metilación durante la cirrosis, lo cual posiblemente tenga relación con el incremento en la expresión de colágena I; y el tratamiento con IFC-305 conduce a un incremento de la metilación en torno al sitio de inicio de la transcripción lo cual puede estar relacionado con la disminución de colágena I observada en estudios histológicos. El análisis global de la presencia de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y la hiperacetilación de la histona H4 (H4ac) reveló que en el hígado hay una disminución de ambas marcas en el estado cirrótico y que el tratamiento con IFC-305 restablece los niveles normales, mientras que en la activación de HSC en cultivo ambas marcas describieron un incremento y el IFC-305 mantiene los niveles de manera similar a los de una célula quiescente.

Los resultados del estudio de las modificaciones post-traduccionales de histonas revelaron que en el estado cirrótico hay un contexto cromatínico cerrado en el promotor de *Pparg*, mientras que la administración de IFC-305 durante 5 semanas a ratas cirróticas lleva hacia un contexto cromatínico abierto en el mismo promotor; por otra parte, se encontró que hay una pérdida de la interacción de PPAR γ con el promotor de *Col1a1* durante la cirrosis y que la administración de IFC-305 produce un enriquecimiento del receptor nuclear en el mismo promotor, esto posiblemente participe en la subexpresión de *Col1a1* por PPAR γ como en el mecanismo descrito en HSC por el grupo de Tsukamoto.

Estos resultados apoyan la comprensión del mecanismo hepatoprotector del IFC-305 a nivel epigenético en un modelo de cirrosis inducida con CCl_4 .

I. ABSTRACT

Cirrhosis is a complex process that alters liver cells phenotype, the pathological characteristics are the generation of fibrosis degree that results on a structural distortion and dysfunctional liver.

Transcriptome assays made in our laboratory showed that 414 differential genes, deregulated in cirrhotic samples, tended to be normalized by treatment with an adenosine derivative compound, IFC-305 (UNAM Patent 207422). Some of these genes were profibrogenic and adipogenic like *Col1a1* and *Pparg* respectively (Perez-Carreón et al., 2010). Also we know that treatment with IFC-305 to cirrhotic rats trigger an increase of global DNA methylation.

To understand the epigenetic changes that occurs during cirrhosis and which of this are regulated by IFC-305 administration, we used a rat CCl_4 – induced cirrhosis model to evaluate at complete liver level and the changes also were evaluated in an activation model of hepatic stellate cells (HSC) in primary culture.

The evaluation of global DNA methylation from HSC culture showed that the IFC-305 prevent the increase of methylation that was observed in activated HSC. On DNA methylation status, we found 4 CpG in the analyzed region of *Col1a1* that lose the methylation at cirrhosis and it is possible that this change is related with the increase expression of collagen I at this state. The IFC-305 increased the DNA methylation around the transcription start site which can be related with the diminishment of collagen I observed by histological studies. Also we analysed, at global scale the presence of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) and the hyperacetylated histone H4 (H4ac). We found that in the liver, there was a decrease of both marks in the cirrhosis state and the treatment with IFC-305 reestablished the normal levels, meanwhile in the activation of HSC both marks described an increase and the IFC-305 keep the levels like an a quiescent cell.

The results of the analysis of histone post-translational modifications showed that in a cirrhosis state there was a compact-chromatin context at the *Pparg* promoter, while the administration of IFC-305 during 5 weeks to cirrhotic rats brings to an open-chromatin context in the same promoter; on the other hand, we found that there was a lost of PPAR γ -interaction in the *Col1a1* gene promoter in the cirrhotic state and the administration of IFC-305 produces an enrichment of the nuclear receptor in the same promoter, this may participate in the down regulation action of *Col1a1* by PPAR- γ like the mechanism described in HSC by Tsukamoto's group.

Thus, these results contributes to the comprehension of the hepatoprotective mechanism of the IFC-305 at epigenetic level in a CCl_4 – induced cirrhosis model.

II. INTRODUCCIÓN

La cirrosis es una causa creciente de morbilidad y mortalidad en los países más desarrollados, siendo la decimocuarta causa de muerte más común a nivel mundial (Tsochatzis et al., 2014). Su etiología es diversa y no existe un tratamiento efectivo para prevenir o revertir ésta patología (Chagoya-de-Sánchez et al., 2005). Con los avances en el entendimiento de la organización de la cromatina en el genoma eucariote, se ha hecho evidente que no solo la genética sino también la epigenética influye tanto en la biología normal como en las enfermedades (Recillas-Targa, 2014). En este trabajo se exploran algunas modificaciones epigenéticas y se evalúa qué cambios ocurren a este nivel durante el proceso cirrótico y cómo la administración del hepatoprotector IFC-305 regula cambios en la cromatina mismos que pueden asociarse a la reversión de la cirrosis.

1. El hígado

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano después de la piel, en el adulto pesa en promedio 1.5 kg (Ham y Cormack, 1985); representa de 2 a 5 % del peso corporal del adulto y 5% en el neonato (Drucker, 2005). Su color es pardo rojizo y está cubierto con una fina capa de tejido conectivo resistente llamada cápsula de Glisson. La mayor parte del hígado está en la mitad derecha del cuerpo con superficie superior convexa adaptada íntimamente a la concavidad de la hemicúpula diafragmática derecha (Figura 1). Tiene dos lóbulos principales, de los cuales, el derecho es mucho mayor que el izquierdo y están separados entre sí por el ligamento falciforme. Posee una cisura transversal profunda y corta llamada surco transversal o hilio hepático. Los lóbulos del hígado están formados por numerosas unidades funcionales llamadas lobulillos hepáticos (Ham y Cormack, 1985; Rizzon, 2011).

El hígado a semejanza de otras glándulas, tiene parénquima y estroma. En general, el primero comprende células epiteliales de origen endodérmico llamadas hepatocitos. El segundo deriva del mesodermo y consiste en tejido conectivo ordinario (Drucker, 2005).

El hígado está formado por varias poblaciones celulares (Tabla 1), el tipo celular más abundante en masa y número son los hepatocitos, los cuales forman el parénquima de este tejido y en el hígado humano el número de dichas células es de alrededor de 80×10^9 (Dufour y Clavien, 2010). Por su parte, la porción no parenquimal está formada por células endoteliales, células estelares (HSC), células de Kupffer y linfocitos residentes (Drucker, 2005).

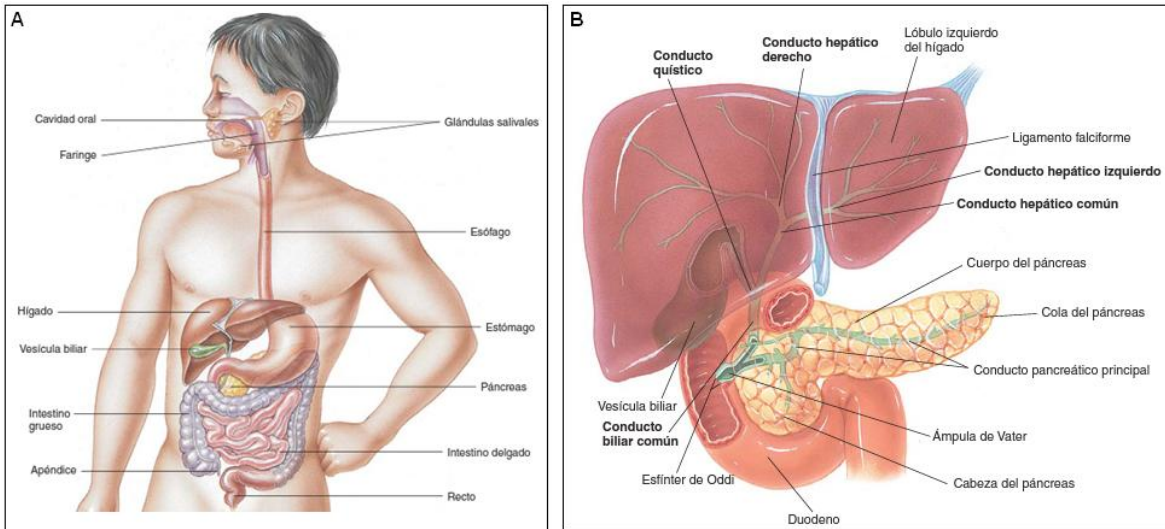


Fig. 1. Anatomía del hígado en el humano. A) Localización anatómica del hígado B) Características macroscópicas del hígado (Rizzon, 2011)

Tabla 1. Tipos celulares residentes en el hígado

Células parenquimales	Hepatocitos
Células inmunes residentes	Células de Kupffer
	Linfocitos-NK
	Linfocitos T
Células especializadas	Células endoteliales sinusoidales
	Colangiocitos
	Células ovas
Células endoteliales con potencial fibrogénico	Células estelares hepáticas
	Miofibroblastos hepáticos
	Fibroblastos portales

(Dufour y Clavien, 2010)

La unidad funcional del hígado es el acino hepático (Drucker, 2005) (Figura 2). Está constituido por pequeños segmentos de dos lobulillos clásicos delimitados y dos venas hepáticas terminales (venas centrales del lobulillo clásico). Su forma es oval o romboidal y se encuentra centrado por un eje terminal portal que contiene ramas de los diferentes componentes del espacio porta. Dentro de cada acino, las células se colocan concéntricamente alrededor de su eje conectivo, de forma que las próximas a éste (zona I) recibirán la sangre con mayor concentración de oxígeno y de nutrientes y, por el contrario, las más lejanas (las próximas a las venas terminales) (zona III) recibirán sangre

de menor calidad. Entre estas dos zonas se encuentra una formación aproximadamente circular en corte transversal (zona II), por la que circula sangre de calidad intermedia en términos de oxigenación y nutrientes (Herrerías, 1996).

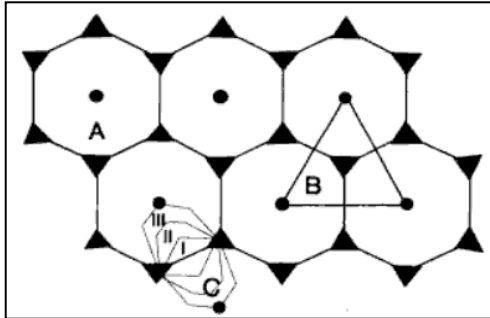


Fig. 2. Representación gráfica de las tres concepciones de la unidad funcional del hígado. A: Lobulillo clásico; B: Lobulillo portal; C: Acino hepático. Esta forma de concebir al hígado y las diferencias en el gradiente de actividad metabólica en relación con la irrigación, ayudan a explicar el proceso de regeneración y de desarrollo de cirrosis, y esclarecer diferentes aspectos histológicos de la distribución de la bilis en diversas afecciones hepáticas (Herrerías, 1996).

Esta compleja arquitectura, con diversas capas estructurales y metabólicas, es responsable de diferentes actividades. Los hepatocitos desempeñan funciones numerosas y vitales para mantener la homeostasia y la salud. Estas funciones son la síntesis de muchas de las proteínas séricas esenciales (albúmina, proteínas transportadoras, factores de coagulación, muchos factores hormonales y de crecimiento), la producción de bilis y sus transportadores (ácidos biliares, colesterol, lecitina, fosfolípidos), la regulación de los nutrimentos (glucosa, glucógeno, lípidos, colesterol, aminoácidos) y el metabolismo y conjugación de los compuestos lipófilos (bilirrubina, cationes, fármacos) para excretarlos por la bilis o la orina. Medir estas actividades para valorar la función hepática es complicado a causa de la multiplicidad y variabilidad de estas funciones. Las pruebas de "funcionamiento" hepático más utilizadas son las determinaciones de bilirrubina, albúmina y tiempo de protrombina en suero. El valor sérico de bilirrubina representa una medida de la conjugación y excreción hepáticas, mientras que las concentraciones séricas de albúmina y el tiempo de protrombina miden la síntesis de proteínas. Las alteraciones en cualesquiera de estos tres parámetros son típicas de la disfunción hepática. La insuficiencia hepática manifiesta es incompatible con la vida y las funciones del hígado son demasiado complejas y diversas para poder ser sustituidas por una bomba mecánica, una membrana de diálisis o una infusión de una mezcla de hormonas, proteínas y factores de crecimiento (Longo et al., 2012).

1. Enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas son un problema de salud pública, desde 1998 y hasta 2012 en México han representado la quinta causa de muerte de acuerdo con el Instituto

Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2014). Aunque existen muchas causas de hepatopatía, en la clínica por lo general se presentan agrupadas sólo en unos cuantos patrones, que suelen clasificarse como hepatocelulares, colestásicos (obstructivos) o mixtos. En las enfermedades hepatocelulares (como las hepatitis virales o la hepatopatía alcohólica) predominan lesión, inflamación y necrosis hepáticas. En las enfermedades colestásicas (como colelitiasis, obstrucción maligna, cirrosis biliar primaria o muchas enfermedades hepáticas inducidas por fármacos) predominan las características de inhibición del flujo biliar. En la forma mixta se observan signos de lesiones hepatocelular y colestásica (como en las formas colestásicas de la hepatitis viral y en muchos trastornos del hígado inducidos por fármacos) (Longo et al., 2012).

1.1. La cirrosis

A nivel mundial, la cirrosis es la 14° causa de muerte en adultos (Tsochatzis et al., 2014), dicha patología es un trastorno hepatocelular histológicamente definido por una remodelación vascular que resulta en la presencia de septos fibróticos interconectados que envuelven completamente al hígado y subdividen al parénquima en nódulos (Ma y Brunt, 2012), esto da por resultado una disminución tanto de la masa hepatocelular y de su función, así como alteraciones en el flujo sanguíneo; estas características patológicas son independientes de la etiología de la enfermedad la cual puede ser principalmente alcohólica, biliar y debida a hepatitis vírica o crónica (Fauci et al., 2009).

En el pasado se consideraba que la cirrosis no era reversible; sin embargo, es evidente que cuando se elimina la agresión fundamental que ha producido la cirrosis, se puede resolver la fibrosis. Esto es más evidente con el tratamiento satisfactorio de la hepatitis C crónica; sin embargo, la resolución de la fibrosis también se observa en pacientes con hemocromatosis que se han tratado en forma satisfactoria y enfermos con hepatopatía alcohólica que han suspendido el consumo de alcohol (Longo et al., 2012).

1.1.1. Diagnóstico de la cirrosis

Muchas enfermedades hepáticas crónicas son notoriamente asintomáticas hasta que la cirrosis con descompensación clínica ocurre. Los eventos de descompensación incluyen ascitis, sepsis, hemorragia de várices, encefalopatía e ictericia no obstructiva. Estudios de imagenología por ecografía, tomografía computarizada o resonancia magnética de un hígado irregular y nodular, junto con la función de síntesis hepática alterada es suficiente para el diagnóstico de cirrosis. Otros hallazgos incluyen reducción del tamaño del hígado,

esplenomegalia, y la evidencia de circulación portosistémica colateral. Los diagnósticos diferenciales incluyen la fibrosis hepática congénita (fibrosis sin nódulos de regeneración), hiperplasia nodular regenerativa (nódulos pero no fibrosis) e hipertensión portal no cirrótica. Una biopsia hepática es rara vez necesaria pero el estudio de una muestra puede proporcionar un diagnóstico definitivo y confirmar la etiología en casos inciertos (Tsochatzis et al., 2014).

1.1.2. Curso natural de la cirrosis

La cirrosis ya no debe ser considerada como una enfermedad terminal, ni como un proceso dinámico que debe aceptarse cada vez más (Tsochatzis et al., 2014), sin embargo, se le ha considerado un estado preneoplásico ya que el 80% de los cánceres hepatocelulares (CHC) se originan en una cirrosis (Forner et al., 2006). Una clasificación clínica pronóstica con cuatro distintas etapas se ha propuesto con probabilidades de mortalidad sustancialmente diferentes: etapa 1 (compensada sin várices esofágicas) tiene una mortalidad estimada de 1% por año; las etapas 2 (compensada con várices), 3 (descompensada con ascitis) y 4 (descompensada con hemorragia gastrointestinal) tienen una mortalidad anual en un intervalo de 3.4%, 20% y 57%, respectivamente (D'Amico et al., 2006). Infecciones y falla renal se han considerado como el estado 5 con 67% de mortalidad en un año. Eventos de descompensación aguda que llevan a la falla orgánica tienen una mortalidad del 30%; notablemente, la mortalidad es más alta en pacientes previamente compensados que en aquellos con previa descompensación, lo que sugiere una mayor tolerancia de la última por efectos de la respuesta inflamatoria (Fede et al., 2012; Moreau et al., 2013). Los eventos descompensadores se desencadenan generalmente por factores como la infección, trombosis de la vena portal, cirugía y carcinoma hepatocelular (Tsochatzis et al., 2014).

1.1.3. Patofisiología de la cirrosis

Ya que la fibrosis hepática es asintomática, la progresión hacia cirrosis confiere un riesgo significativo de morbilidad y mortalidad; la progresión hacia este estado terminal es lento, desarrollándose alrededor de 20 a 40 años en pacientes con enfermedad hepática crónica y el ritmo es influenciado tanto por factores genéticos como ambientales (Hernandez-Gea y Friedman, 2011). La transición de la enfermedad hepática crónica hacia cirrosis involucra inflamación, activación de HSCs con la consecuente fibrogénesis (la cual se detallará más adelante en ésta sección), angiogénesis y las lesiones de extinción

parenquimal causadas por la oclusión vascular (Wanless et al., 1995). Este proceso conduce a cambios microvasculares hepáticos pronunciados caracterizados por una remodelación sinusoidal, formación de derivaciones intrahepáticas (debido a la angiogénesis y la pérdida de las células del parénquima) y una disfunción hepática endotelial (Fernandez et al., 2009). La disfunción endotelial está caracterizada por una liberación insuficiente de vasodilatadores, de los cuales el más importante es el óxido nítrico con una concomitante producción de vasoconstrictores (Garcia-Pagan et al., 2012).

La respuesta de cicatrización del hígado es una vía común que resulta de una variedad de factores de daño incluyendo, tóxicos, metabólicos y virales. Detrás de esta respuesta (Figura 3) se encuentra la activación de las células mesenquimales residentes en miofibroblastos contráctiles (MF), principalmente derivados de HSCs que generan la cicatriz la cual encapsula la lesión. Las HSCs se activan, lo que lleva a una conversión de células quiescentes ricas en ácido retinóico (vitamina A) a unas que han perdido estas gotas lipídicas conduciendo al aumento de la proliferación, la contracción y la liberación de citocinas proinflamatorias, profibrogénicas y promitogénicas. Estas células activadas son capaces de potenciar la migración y deposición de componentes de matriz extracelular (ECM) entre los que destaca la colágena I (Hernandez-Gea y Friedman, 2011)

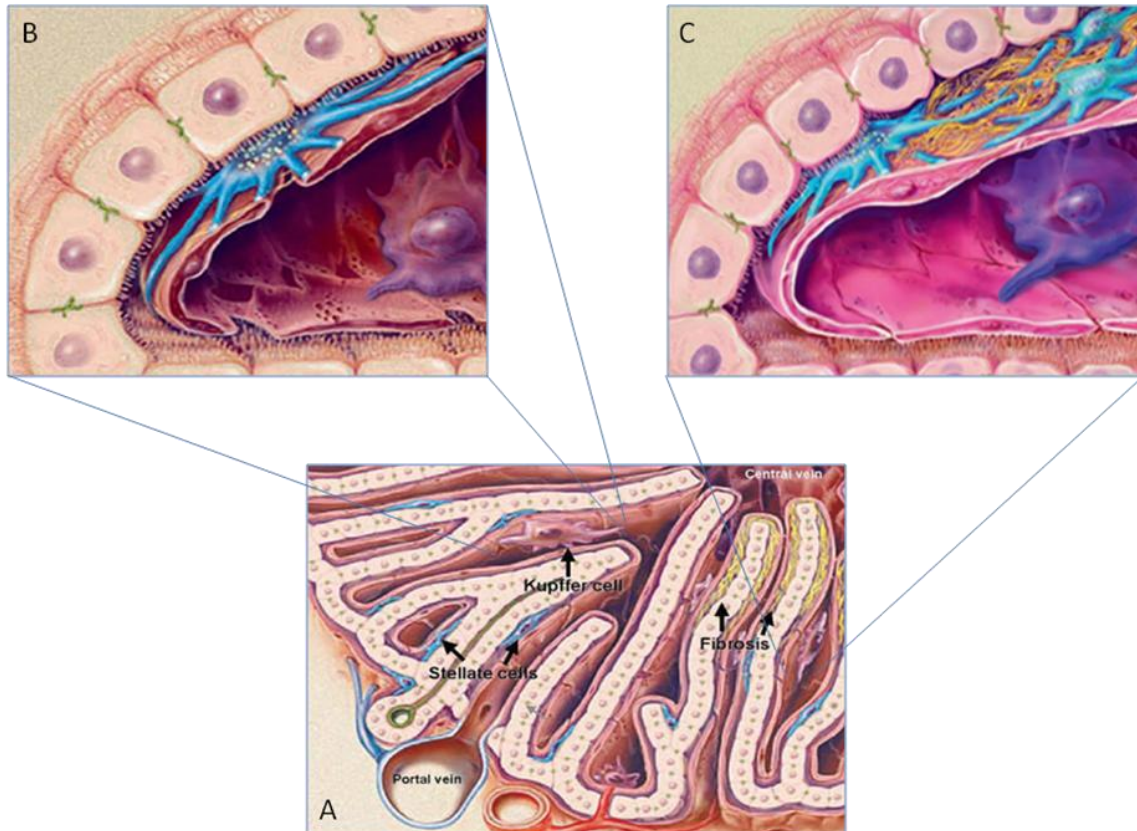


Fig. 3. Arquitectura sinusoidal en el hígado sano y durante la enfermedad hepática.

A) En el hígado sano los cordones de hepatocitos se encuentran rodeados por un revestimiento endotelial con fenestras. En el espacio intermedio entre las células endoteliales y los hepatocitos (espacio de Disse) se encuentran las HSCs (azules). Las células de Kupffer (moradas) se encuentran típicamente entre los sinusoides y adheridas a la pared endotelial. La activación de las HSCs conduce a la acumulación de ECM (bandas amarillas en la parte derecha de la figura). B) Acercamiento a la arquitectura sinusoidal sana con las HSCs (en azul) conteniendo gotas de vitamina A perinucleares. Una baja densidad de ECM está presente en este estado. C) Acercamiento a la arquitectura sinusoidal de la enfermedad hepática donde las HSCs se han multiplicado y están rodeadas por matriz fibrilar acumulada (bandas amarillas). Estos eventos contribuyen a la pérdida de las microvellosidades del hepatocito y al cierre de las fenestras endoteliales (Friedman, 2003).

1.1.4. Factores que predisponen a la fibrosis

La fibrosis representa una vía final, en principio, común a todas las enfermedades crónicas del hígado (CLDs), como pueden ser enfermedades virales, colestásicas o enfermedad del hígado graso (Bataller y Brenner, 2005). En la presencia continua del daño hepático, se desencadena un proceso sostenido de cicatrización que resulta en una acumulación progresiva de ECM en el espacio subendotelial de Disse y la distorsión del

parénquima y de la arquitectura vascular del hígado por el tejido cicatricial (Pinzani et al., 2005).

En una perspectiva mundial, las siguientes etiologías son los factores predisponentes más relevantes: infección crónica por virus hepatotrópicos (virus de hepatitis B o C); exposición crónica a toxinas o fármacos (el exceso en el consumo de alcohol predominantemente en países occidentales); exposición crónica a condiciones metabólicas alteradas y la enfermedad autoinmune persistente (Novo et al., 2014).

La predicción de la progresión de la fibrosis tiene un papel clave en el manejo de la hepatitis viral crónica, ya que se traducirá en el futuro riesgo de cirrosis y sus diversas complicaciones, incluyendo el carcinoma hepatocelular. Tanto el virus de hepatitis B como C conducen principalmente a la fibrogénesis inducida por la inflamación crónica y a una respuesta continua de lesión-cicatrización. Simultáneamente, respuestas profibrogénicas directas e indirectas son provocadas por la infección viral. Existe una serie de factores de riesgo bien establecidos para la progresión de la fibrosis los cuales se enlistan en la tabla 2 (Wong, 2014).

Tabla 2. Factores asociados con un elevado riesgo de progresión hacia cirrosis

Factores del hospedero	Factores virales	Otros factores
Edad avanzada (> 40 años)	Altos niveles de HBV DNA o HCV RNA	Alto consumo de alcohol
Género masculino	Genotipo HBV (C más maligno que B; D más maligno que A)	Esteatosis
Diversidad genética	Variante de HBV	Diabetes
	Coinfección con HBV/HCV/HDV	Obesidad
	Coinfección con HIV	

Datos tomados de (Wong, 2014). HBV: virus de hepatitis B; HCV: virus de hepatitis C; HDV: virus de hepatitis D; HIV: virus de inmunodeficiencia humana.

La resistencia a la insulina, la obesidad y el síndrome metabólico están fisiopatológicamente relacionados a la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD por sus siglas en inglés) y tienen efectos perjudiciales independientemente de la etiología de la enfermedad hepática. La obesidad es un factor predictivo independiente para la cirrosis durante la enfermedad hepática alcohólica (Naveau et al., 1997), y la

presencia de síndrome metabólico se asocia con una fibrosis y cirrosis más severas (Tsochatzis et al., 2008). Por otra parte, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico se han asociado independientemente con la mortalidad por enfermedades hepáticas crónicas (Stepanova et al., 2010). La resistencia a la insulina favorece la aparición de carcinoma hepatocelular en pacientes cirróticos (Nkontchou et al., 2010) y estudios epidemiológicos han demostrado que tanto la diabetes como el síndrome metabólico incrementan el riesgo de carcinoma hepatocelular (El-Serag et al., 2004; Welzel et al., 2011).

El consumo de alcohol deteriora al paciente con cirrosis alcohólica pero también a aquellos cuya enfermedad hepática tenga otras causas. En la cirrosis alcohólica, la ingesta de alcohol incrementa el gradiente de presión venosa hepática (HVPG, por sus siglas en inglés) y el flujo sanguíneo portocolateral (Luca et al., 1997); estos efectos se presentan también en la cirrosis de diferente etiología y pueden originar hemorragia por várices (Tsochatzis et al., 2014). Únicamente la abstinencia del alcohol mejora la supervivencia en la cirrosis alcohólica (Mathurin et al., 2012). En pacientes con hepatitis C crónica, el consumo de alcohol incrementa el riesgo de dos a tres veces de cirrosis y de enfermedad hepática descompensada, incluso con un consumo moderado. Por otra parte, el consumo de alcohol es un factor de riesgo independiente para carcinoma hepatocelular en hepatitis C crónica y en esteatohepatitis no alcohólica (Ascha et al., 2010; Oliveri et al., 2012).

El tabaquismo se ha asociado con una fibrosis más severa en la hepatitis C crónica, esteatohepatitis no alcohólica y cirrosis biliar primaria y posiblemente incrementa el riesgo de carcinoma hepatocelular en hepatitis B (Zein, 2010), mientras que el consumo de cannabis empeora la fibrosis durante la hepatitis C (Hezode et al., 2005). Además, el fumar también incrementa la morbilidad y mortalidad posterior al trasplante hepático (Leithead et al., 2008)

1.1.5. Prevención y tratamiento de las complicaciones de la cirrosis

El aumento en la incidencia de las enfermedades hepáticas y el problema de la manifestación tardía de dichas enfermedades además de la descompensación, enfatizan la necesidad de un tamizaje poblacional para identificar a los pacientes con enfermedades crónicas hepáticas, equivalente al que se realiza para los factores de riesgo cardiovascular (Tsochatzis et al., 2014). Marcadores no invasivos para la fibrosis

podrían ser herramientas en la atención primaria, sobre todo para la enfermedad de hígado graso no alcohólico y por uso indebido del alcohol. La puntuación de fibrosis para la NAFLD se basa en índices simples (edad, conteo de plaquetas, albúmina sérica, aminotrasferasas y diabetes) y tienen un valor predictivo negativo de 96% para la fibrosis avanzada (Angulo et al., 2007).

Los cambios en el estilo de vida tienden a ser pasados por alto en el manejo de la cirrosis, porque la esperanza de vida es corta y los beneficios son difíciles de medir. Aunque la evidencia proveniente de estudios epidemiológicos o de estudios caso-control, ha demostrado que deben ofrecerse consejos sobre el estilo de vida a los pacientes, ya que son sencillos de implementar además de tener un bajo riesgo de efectos secundarios y no ser costosos. Los pacientes con sobre peso con cirrosis compensada (estados clínicos 1 y 2), deben bajar de peso para reducir el riesgo a largo plazo de complicaciones hepáticas. En pacientes con cirrosis descompensada, el mantenimiento de una nutrición adecuada es importante para evitar la pérdida de masa muscular. Por otra parte, en pacientes que tienen una baja tolerancia a ayuno a largo plazo, la aparición temprana de la gluconeogénesis y el agotamiento muscular posterior pueden contribuir al desarrollo de encefalopatía hepática (Tsochatzis et al., 2014).

Como ya se describió en párrafos anteriores, el consumo de alcohol es un importante factor de riesgo en pacientes con enfermedades hepáticas tanto para la progresión de la fibrosis como para el desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular, por lo tanto, todos los pacientes con cirrosis, independientemente de su estado clínico deben abstenerse de consumir alcohol (Tsochatzis et al., 2014), esta medida puede reducir el riesgo de ingreso hospitalario agudo y mejorar la calidad de vida. Por otra parte, en varios centros hospitalarios, la abstinencia de alcohol independientemente de la etiología de la enfermedad hepática es obligatoria para que el paciente sea considerado para un trasplante hepático (Moriarty, 2010). Al igual que el consumo de alcohol, es imperioso que el paciente cirrótico deje de fumar, ya que esto puede prevenir la progresión de la enfermedad hepática y facilita la elegibilidad para el trasplante de hígado (Leithead et al., 2008).

La vacuna contra los virus de hepatitis A y B, virus de influenza y pneumococo deben ser administradas tan pronto como sea posible, porque su respuesta antigénica es menos efectiva conforme progresa la cirrosis (Tsochatzis et al., 2012).

Alimentos y bebidas ricos en antioxidantes pueden tener un papel preventivo en la cirrosis. El consumo de café se ha asociado con una disminución de la mortalidad (Freedman et al., 2012) y también con una reducción en la fibrosis durante las enfermedades hepáticas con diferentes etiologías y con una reducción en el riesgo de carcinoma hepatocelular (Larsson y Wolk, 2007; Torres y Harrison, 2013). Por otra parte, hay estudios que describen que la ingesta de chocolate negro ha reducido el gradiente de presión venosa hepática (HVPG) posprandial en la cirrosis a través de la vasodilatación y mejorando la hipotensión, un efecto similar se ha observado con la administración de ácido ascórbico (De Gottardi et al., 2012; Hernandez-Guerra et al., 2006).

Los pacientes con cirrosis deben ser tratados siempre que sea posible para detener la progresión de la enfermedad hepática subyacente; dicho tratamiento incluye inmunosupresión para la hepatitis autoinmune, flebotomía en la hemocromatosis y quelantes de cobre o zinc para la enfermedad de Wilson (Tsochatzis et al., 2014).

Los pacientes con hepatitis viral deben acceder al tratamiento antiviral. Todos los pacientes con cirrosis que sean positivos a HBsAg (antígeno de superficie de la hepatitis B) deben recibir una terapia oral con un potente antiviral (entecavir o tenofovir) independientemente de la carga viral (Papatheodoridis, et al., 2012). La terapia antiviral oral reduce la HVPG y retrasa la progresión hacia descompensación en los pacientes que responden al tratamiento (Manolakopoulos et al., 2009). En los pacientes con cirrosis por hepatitis C, sin ascitis, la respuesta virológica sostenida reduce significativamente la morbilidad y la mortalidad relacionada con el hígado, en incluso en un subgrupo se pacientes se presentó la reversión de la cirrosis (Morgan et al., 2010).

El trasplante hepático es una opción terapéutica en pacientes que presentan descompensación o carcinoma hepatocelular con cirrosis. La lista de espera para la asignación de órganos es larga, principalmente debida a la escasez de donantes. Las indicaciones y contraindicaciones para el trasplante se muestran en el siguiente cuadro (Tsochatzis et al., 2014).

Cuadro 1. Indicaciones y contraindicaciones para el trasplante hepático en pacientes con cirrosis

Indicaciones

Cirrosis con descompensación

Generalmente para pacientes con estado clínico 3 y superior, es decir, al menos con ascitis.

Carcinoma hepatocelular con antecedente de cirrosis

Muchos centros hospitalarios utilizan el criterio Milan para el listado: una lesión ≤ 5 cm o no más de tres lesiones ≤ 3 cm cada una sin invasión macrovascular y sin enfermedad extrahepática.

Contraindicaciones

Paciente activo en el uso de sustancias ilícitas

Pacientes en sustitución de fármacos como metadona generalmente no son excluidos.

SIDA

Infección única controlada por HIV no es una contraindicación. Coinfección por HIV y HCV en una contraindicación en algunos centros hospitalarios.

Enfermedad extrahepática

Tumores neuroendócrinos y hemangiendoteliomas son una posible excepción en algunos casos.

Sepsis descontrolada

El trasplante está contraindicado hasta que la infección sea controlada exitosamente.

Falla orgánica extrahepática (pulmones y corazón)

La ecocardiografía y si es necesaria la cateterización serán esenciales en el trabajo de trasplante de hígado; la presión pulmonar > 50 mmHg a pesar del tratamiento médico, es una contraindicación absoluta.

Trombosis esplácnica extensa que se extiende a la vena mesentérica superior

Contraindicación técnica

Las indicaciones se limitan a los pacientes con cirrosis establecida, por lo tanto, esta lista no debe considerarse como exhaustiva. El autor de éste cuadro (Tsochatzis et al., 2014) sugiere ver también los trabajos de Schuppan y colaboradores (Schuppan y Afdhal, 2008) y Dooley y colaboradores (Dooley et al., 2011).

1.1.6. Reversibilidad de la cirrosis

La regresión/reversión de la fibrosis y/o cirrosis se ha reportado recientemente cuando hay un arresto del proceso de la enfermedad viral o no viral (Chang et al., 2010; Chen et al., 2013a; Falize et al., 2006; Hammel et al., 2001; Pol et al., 2004; Wanless et al., 2000). Un grupo de lesiones histopatológicas de “cirrosis revertida” se han descrito en el “complejo hepático reparador” (Wanless et al., 2000), estas incluyen un septo delgado, incompleto y perforado a través del cual los hepatocitos son evidentes, hay crecimiento de hepatocitos en la vénulas terminales hepáticas y pequeños cúmulos de fibras gruesas de colágena en los sinusoides parenquimales (Figura 4).

Como ya se mencionó en el apartado de patofisiología, la fibrosis en las enfermedades crónicas hepáticas y la cirrosis, son el resultado de un proceso necroinflamatorio causado por un daño crónico y una excesiva acumulación de matriz extracelular producida por fibroblastos activados, es decir, por células estelares y fibroblastos portales (Guyot et al., 2006; Wanless, 2004). La suspensión de la fibrogénesis debida a la detención o remoción del agente fibrogénico y la fibrolisis con degradación de matriz extracelular por metaloproteinasas tisulares son consideradas como el mecanismo de reversión de la fibrosis (Iredale, 2007; Wanless, 2004). Los pequeños cúmulos de fibras gruesas de colágena aisladas no son consideradas equivalentes al septo fibrótico que se observa en la cirrosis (Desmet y Roskams, 2004; Wanless, 2004). El septo fibrótico es el resultado de la pérdida focal del parénquima hepático y el colapso lobular; estos además contienen cúmulos de colágena, células inflamatorias, remanentes de tejido dañado y más importantemente, canales vasculares y linfáticos (Ma y Brunt, 2012). El septo fibroso en cirrosis probablemente no sea reversible, especialmente cuando contienen derivaciones venosas protohepáticas (Desmet y Roskams, 2004; Wanless, 2004). En contraste, adicionalmente a la fibrosis, la cirrosis se caracteriza también por una severa disrupción de la arquitectura vascular y una disrupción de la arquitectura parenquimal lobular normal. Incluso cuando hay una completa resolución de los elementos conectivos tisulares de la fibrosis, las derivaciones vasculares embebidas en el septo fibrótico no serán reorganizadas y restauradas a los arreglos lobulares del estado normal (Ma y Brunt, 2012). Estudios recientes han demostrado que la reversión de la cirrosis resulta en la transformación de una cirrosis micronodular a una macronodular o en una cirrosis de septos incompletos (Desmet y Roskams, 2004; Issa et al., 2004; Wanless, 2004).

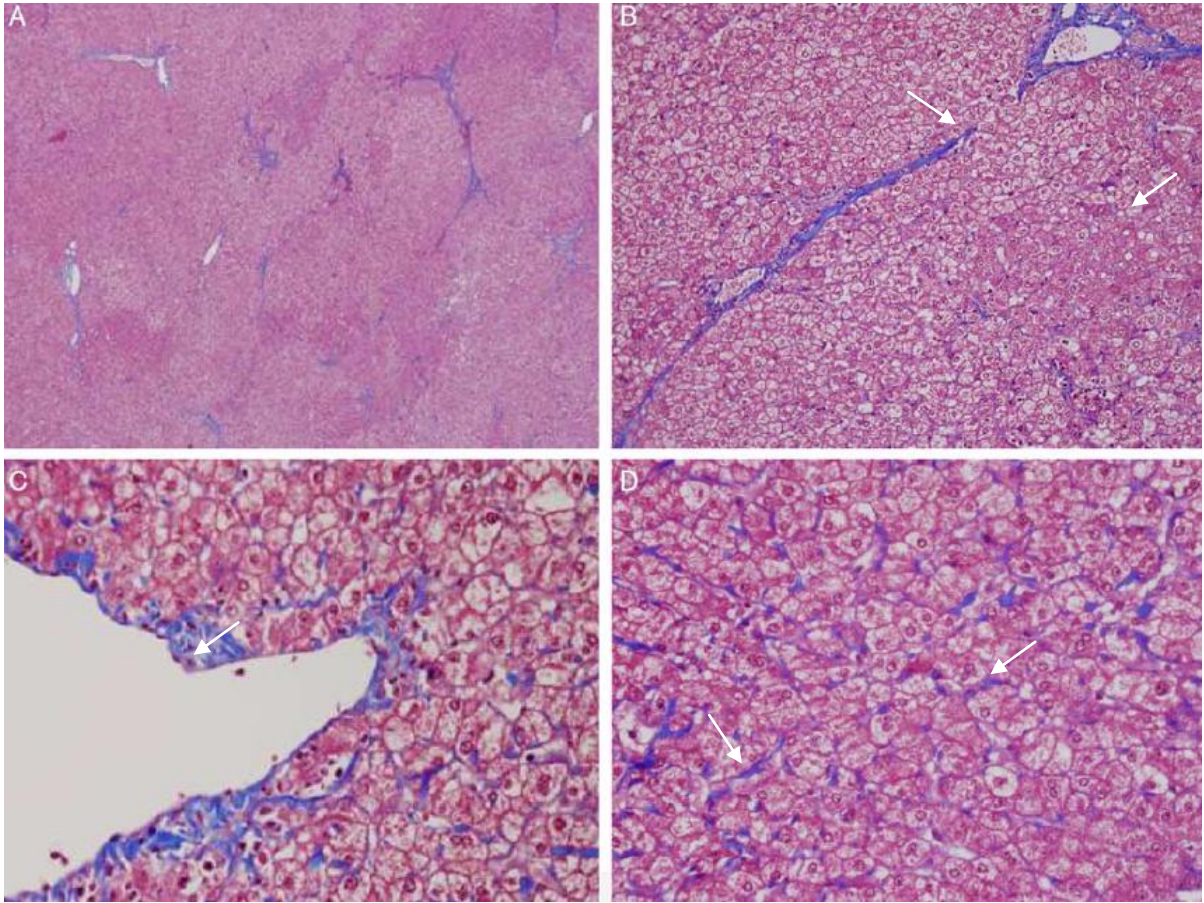


Fig. 4. Reversión de la fibrosis. A) Vista sin acercamiento de un corte hepático sin evidencia de cirrosis pero con regiones focales de fibrosis y modularidad vaga. B) El septo esta atenuado, delgado, incompleto y “perforado” y presenta penetración de hepatocitos; Se puede apreciar un nódulo parenquimal vago a la derecha del septo. C) Vena hepática prolapsada que contiene hepatocitos. D) Fibras gruesas de colágena pueden apreciarse en los sinusoides, esto representa presuntamente la reabsorción de la fibrosis. Las microfografías que se muestran están teñidas con tricrómica de Masson. Tomado de (Ma y Brunt, 2012).

En la década pasada, un gran número de estudios describen alteraciones epigenéticas en el hígado atribuibles al alcohol incluyendo la modificación de histonas, metilación de DNA e histonas derivado del sistema de donación de grupos metilo, S-adenosilmetionina (SAM), miRNA como modificadores post-trascipcionales y enzimas remodeladoras de cromatina como acetiltransferasas de histonas, desacetilasas de histonas y DNA metiltransferasas (Mandrekar, 2011) lo cual es indicativo de que la enfermedad hepática puede estar mediada por factores que regulan la expresión génica.

2. Regulación de la transcripción

El control de los programas de transcripción está mediado por tres principales mecanismos que actúan en conjunto (Figura 5). El primero se basa en los factores de transcripción que se unen a secuencias específicas y que regulan un conjunto particular de genes. El segundo involucra mecanismos que tienen que ver con la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de histonas que en su conjunto proveen la memoria epigenética que ayuda a estabilizar el estado de diferenciación de una célula y su progenie y el tercero está relacionado con la organización nuclear de la cromatina. A gran escala, el plegamiento de la cromatina puede afectar la expresión génica a través de localizar los genes en subcompartimentos nucleares específicos que son estimulantes o inhibitorios de la transcripción (Peric-Hupkes et al., 2010). Es por esto que los factores de transcripción y las modificaciones epigenéticas han sido extensamente estudiados en diferentes procesos, desde la diferenciación hasta las enfermedades.

La manera en la que la porción no-codificante del genoma puede ejercer un efecto sobre la expresión de los genes se ha descrito a partir de la caracterización de diversos elementos genéticos de regulación. Estos consisten de secuencias de DNA a las cuales se unen factores de transcripción con la finalidad de activar o reprimir la expresión de genes en cada tipo celular. En eucariontes la transcripción de genes que codifican para proteína se lleva a cabo por la enzima RNA polimerasa II (RNA pol II). Los elementos genéticos pueden actuar coordinando la acción de la RNA pol II en las diferentes fases de transcripción de los genes. Estos elementos pueden ser englobados en dos familias: a) los promotores de los genes y b) los elementos distales de regulación (*enhancers*, silenciadores, *LCRs* e *insulators*) (Valdes-Quezada, 2014)

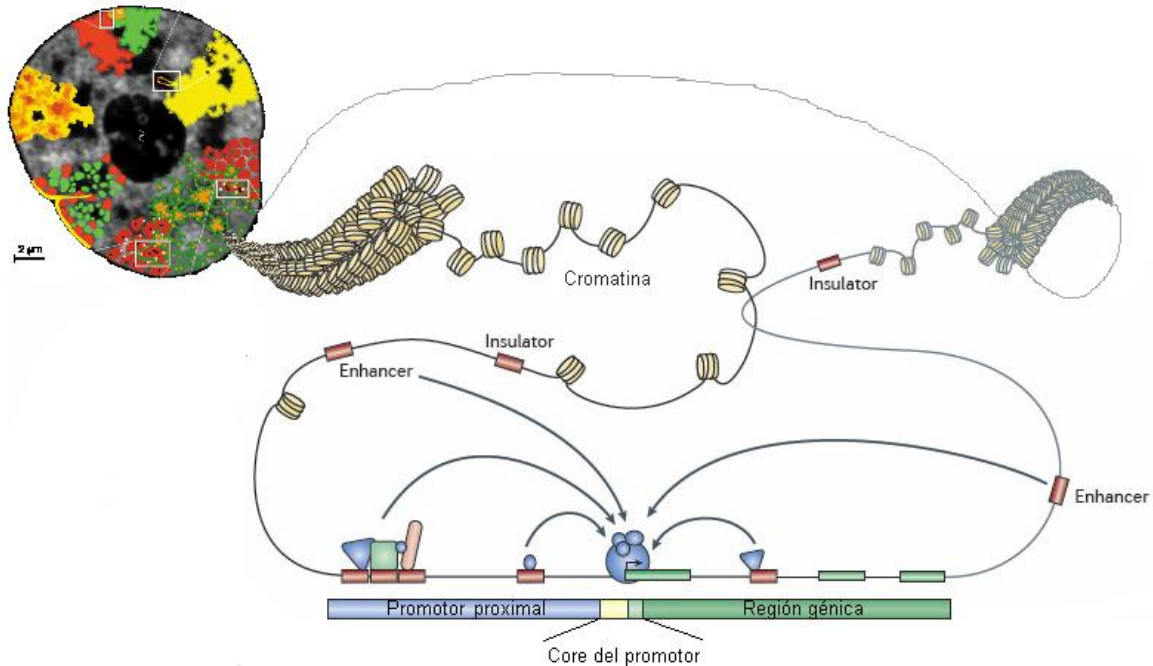


Fig. 5. Empaquetamiento del genoma eucarionte en cromatina. La acción coordinada entre los elementos de regulación, los factores de transcripción (círculos azules) y la manera en la que el DNA de la célula se encuentra organizado en cromatina tiene como finalidad la expresión regulada de los genes. Modificado de (Cremer y Cremer, 2001; Lenhard et al., 2012).

En el presente trabajo se hará referencia al segundo mecanismo de regulación de los programas de transcripción, es decir a la metilación del DNA y a las modificaciones postraduccionales de histonas y dichas marcas serán estudiadas en una primera instancia de forma global y posteriormente en los promotores de algunos genes como se detallará más adelante.

2.1. Los promotores de los genes

Un promotor se define como una secuencia de DNA que es suficiente para dirigir una correcta iniciación de la transcripción de un gen mediada por la RNA polimerasa. Así mismo se ha demostrado cómo la secuencia río arriba del sitio de inicio de la transcripción contribuye al posicionamiento del complejo de inicio de la transcripción (CIT), el cual favorece y facilita el reclutamiento de la RNA polimerasa (Valdes-Quezada, 2014). En general un promotor consiste de un conjunto de motivos de unión (secuencias de DNA) a factores nucleares conocidos como factores de transcripción (Escamilla-del-Arenal y Recillas-Targa, 2004).

En cuanto a su estructura, los promotores se encuentran constituidos por dos elementos: a) el elemento central o “core”, el cual sirve como sitio de reconocimiento para la maquinaria basal de la transcripción y el sitio de ensamblaje del CIT. Además define el sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) y la direccionalidad de la misma; b) el elemento proximal, el cual está río arriba del “core” del promotor (a distancias variables en pares de bases), cuya función es la de atraer combinaciones de factores de transcripción tanto generales como tejido específicos y además determina el tiempo y espacio en el cual un gen debe ser transcrito (Maston et al., 2006).

En términos de su composición a nivel de secuencia de DNA, se puede mencionar que además de contener las secuencias motivo para la unión de los factores de transcripción, el 70% de los promotores de los vertebrados se encuentran asociados a regiones ricas en el dinucleótido C-G (CpG) conocidas como islas CpGs (Saxonov et al., 2006). Estas islas pueden ser categorizadas en islas bajas, intermedias y altas, dependiendo de la abundancia de dinucleótidos CpGs. Los promotores con islas CpG altas están vinculados con múltiples sitios de inicio de la transcripción, controlando genes de expresión amplia o constitutiva y genes que se expresan en distintas etapas del desarrollo de un organismo. Por su parte, los promotores asociados a islas CpG intermedias e islas CpG bajas, se asocian con la regulación de genes tejido específico (Deaton y Bird, 2011). En la tabla 3 se presenta una clasificación de promotores propuesta por Saxonov y colaboradores (Saxonov et al., 2006).

Tabla 3. Tipos de promotores

Tipo de promotor	Función del gen	Propiedades comunes	Composición de CpGs
Tipo I (adulto)	Expresión tejido-específica en tejidos periféricos adultos	TSS bien definido, enriquecimiento de caja TATA. Nucleosomas aleatoriamente posicionados	Generalmente no son islas CpG
Tipo II (ubicuos)	Expresión amplia	TSS dispersos, configuración ordenada o regular de nucleosomas	Islas CpG carentes de cajas TATA

Continuación Tabla 3. Tipos de promotores

Tipo de promotor	Función del gen	Propiedades comunes	Composición de CpGs
Tipo III (regulación en el desarrollo)	Genes de expresión diferencialmente regulada, a menudo regulados en el desarrollo multicelular y la diferenciación	Represión mediada por Polycomb, enriquecimiento en la marca de histona H3K27me3	Islas CpG que se extienden hacia el cuerpo del gen

Tomada de (Valdes-Quezada, 2014).

En términos de la cromatina asociada a estos elementos de regulación, se han observado diferentes propiedades que regulan la acción de los promotores a distintos niveles. Asimismo, la presencia de metilación en los dinucleótidos CpGs mayoritariamente presente en los vertebrados, confiere una característica de regulación y conservación de los promotores (Valdes-Quezada, 2014). Estos aspectos serán abordados en las secciones de regulación epigenética y cromatina del presente trabajo.

3. Regulación epigenética

Las células del cuerpo son genéticamente idénticas pero son estructural y funcionalmente heterogéneas debido a la expresión diferencial de genes. Estas diferencias pueden surgir durante el desarrollo, la diferenciación celular o en la enfermedad (Mann y Mann, 2008), estos cambios están determinados por el conjunto de genes transcritos en un tiempo y sitio específico. La transcripción es dependiente de la accesibilidad de factores de transcripción a los genes y sus regiones regulatorias (Cadena-Del-Castillo, 2014). Derivado de estas observaciones, Conrad Hal Waddington en 1953 acuñó el término de epigenética a partir de la siguiente definición:

La epigenética se refiere al estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en el desarrollo de un organismo, desde el óvulo fertilizado hasta su senescencia, pasando por la forma adulta.

En la actualidad, gracias a una mejor comprensión del papel que ejerce la cromatina con respecto a la expresión génica en cada tipo celular se ha redefinido el concepto de epigenética de la siguiente manera:

Se consideran procesos de regulación epigenéticos todos aquellos que influyen en la expresión heredable de los genes sin que ocurran cambios en la secuencia del DNA (Allis et al., 2007).

3.1. La cromatina y su estructura

Desde hace mucho tiempo, se conoce que los eucariontes tienen estructurado su genoma en cromatina (Figura 6), en donde la unidad fundamental de ésta es el nucleosoma, el cual está conformado por un octámero de histonas (compuesto por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) (Turner, 2007). Un fragmento de 146 pares de bases (pb) de DNA se arregla alrededor de cada octámero (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002) y abarca 1.75 vueltas constituyendo el “core” del nucleosoma y dejando aproximadamente 50 pb libres entre nucleosomas (Felsenfeld y Groudine, 2003). Esta conformación permite, en asociación con otras proteínas, la compactación del genoma a múltiples niveles. La estructura de 10 nm, también conocida como “collar de perlas”, es el nivel primario de compactación. A su vez el collar de perlas tiene la capacidad de compactarse en niveles superiores de complejidad mediante varias proteínas, lo que confiere un grado de compactación del genoma de 5 a 10 veces lo cual es necesario para contener los casi 2 m de longitud que el genoma humano posee en el núcleo de una célula. Sin embargo esta compactación resulta insuficiente para empaquetar al genoma en los 30 a 50 μm de diámetro que en promedio posee el núcleo celular. Para lograr un mayor grado de compactación, se ha visto asociada una proteína, la quinta histona conocida como histona H1 (histona “linker”) a la región internucleosomal, que es necesaria para alcanzar el siguiente nivel de compactación, conocido como la fibra de 30 nm o solenoide (Felsenfeld y Groudine, 2003). Esto otorga un nivel de compactación de 50 veces o más. A su vez el solenoide puede formar asas de cromatina de 300 nm y estas empaquetarse aun más formando estructuras de mayor orden hasta constituir, por ejemplo los cromosomas metafásicos que representan el mayor nivel de estructuración (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002).

Funcionalmente el compactar el genoma en cromatina representa *per se* un impedimento para la realización de diversos procesos; por ejemplo, la compactación del genoma puede generar una reducida accesibilidad a ciertas secuencias en el DNA. Afortunadamente, la célula eucarionte desarrolló, en paralelo con los mecanismos de compactación, procesos que revierten de manera regulada dichos mecanismos (Fonseca-Guzmán, 2014). En la actualidad, mucha de la investigación en torno a la

cromatina se concentra en el estudio de las modificaciones covalentes y no covalentes del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas.y la influencia que tienen en conjunto con la organización del genoma en cromatina (Valdes-Quezada, 2014).

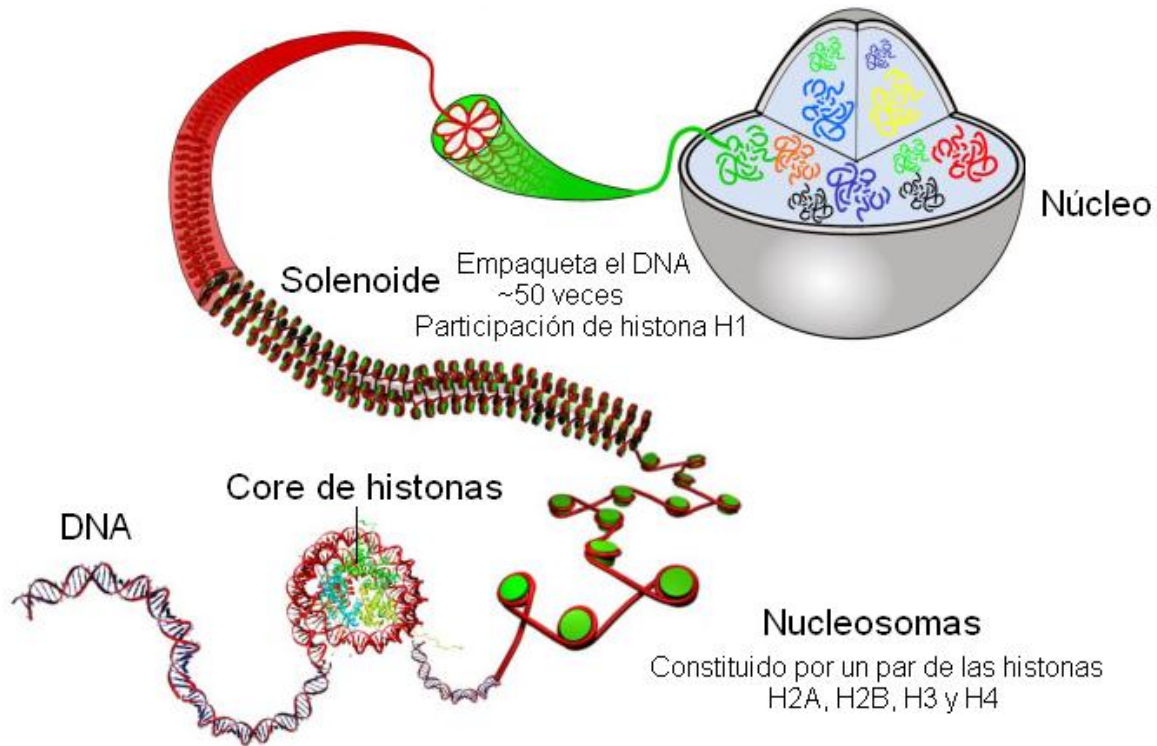


Fig. 6. Empaquetamiento del genoma eucarionte al interior del núcleo celular. Se muestran los distintos niveles de compactación del genoma en asociación con las histonas. Modificada de (Iyer et al., 2011)

La cromatina puede tener dos estados, eucromatina y heterocromatina. La eucromatina es aquella que está menos compacta, por lo tanto contiene los genes que se están expresando y es la primera en entrar al proceso de replicación, mientras que la heterocromatina es más compacta y de replicación tardía. Además, la heterocromatina puede ser constitutiva o facultativa, la primera es aquella que comprende principalmente los telómeros, secuencias repetidas y centrómeros al igual que el cromosoma X silenciado, mientras que la heterocromatina facultativa incorpora aquellos genes que no se están expresando pero que podrían expresarse en respuesta a un estímulo (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Dentro de los procesos epigenéticos que más correlacionan con la actividad génica y que se han estudiado mejor resaltan: la metilación del DNA, las modificaciones post-

traduccionales de histonas, los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, la organización/dinámica nuclear y los complejos represor y activador (Polycomb y Trithorax) y en años recientes también se ha observado la acción coordinada de RNAs no-codificantes modulando la estructura de la cromatina (Ruiz-Velasco-Leyva, 2014). A continuación se describen brevemente algunos de estos procesos epigenéticos.

3.1.1. Metilación del DNA

La metilación del DNA es probablemente la modificación epigenética más estudiada (Bird, 2002; Fullgrabe et al., 2011); es un proceso importante en la regulación epigenética. Consiste en la incorporación de un grupo metilo en la posición 5 de la citosina del dinucleótido CpG, generando la modificación conocida como 5-metilcitosina (5mC; Figura 7). Participa en la regulación de etapas tempranas del desarrollo, así como en la inmovilización de transposones, manteniendo una mayor estabilidad (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002; Escamilla-del-Arenal y Recillas-Targa, 2004). La incorporación del grupo metilo a los CpGs no modifica la secuencia primaria del DNA por lo que no se le considera una modificación genética. Sin embargo esta modificación covalente puede influenciar directamente en la actividad transcripcional de los genes (Klose y Bird, 2006)

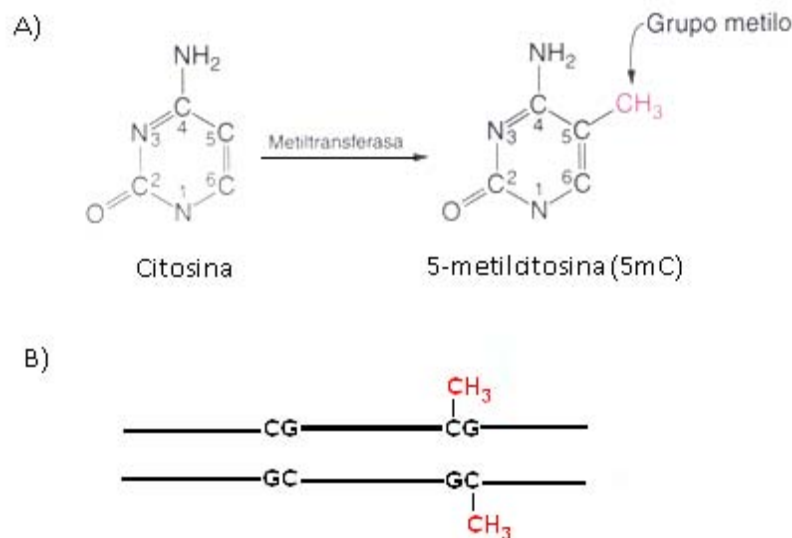


Fig. 7. Metilación del DNA en CpGs de eucariontes. A) La reacción está dada por la actividad enzimática de DNA metiltransferasas (Dnmt). B) Las citosinas en un contexto de dinucleótido CpG pueden ser selectivamente metiladas en el carbono 5 de la citosina. Tomado de (Griffiths et al., 2008)

La metilación del DNA puede regular la expresión génica por dos mecanismos:

- a) Por interferencia directa (impedimento estérico) en la unión de los factores de transcripción con secuencias blanco, evitando su activación.
- b) La unión de proteínas que reconocen DNA metilado, conocidas como proteínas de unión a CpGs metiladas (MBD, por sus siglas en inglés), que unen co-represores y éstos además reclutan desacetilasas de histonas, generando una cromatina altamente compacta (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002).

El proceso de metilación del DNA está dirigido por las enzimas denominadas DNA metiltransferasas (Dnmts, por sus siglas en inglés). La Dnmt1 es la encargada de metilar las CpGs en la horquilla de replicación a partir de un templado de 5mC preexistente por lo que se le considera una enzima de mantenimiento y una de las responsables de segregar la información epigenética en cada división celular (Figura 7). Las enzimas Dnmt3a y Dnmt3b tienen la capacidad de metilar CpGs que no se encuentren previamente metiladas, por lo que se les denomina enzimas *de novo* (Bird, 2002).

La distribución del DNA metilado a lo largo del genoma, muestra enriquecimiento en las regiones no codificantes, en elementos repetidos (Allis et al., 2007) e inactiva elementos móviles del genoma como los transposones y las secuencias de origen retroviral y por consecuencia tiene una función en el mantenimiento de la estabilidad del genoma evitando eventos de recombinación no deseados (Bird, 2002) mientras que en las islas CpG de genes activos no hay enriquecimiento de esta marca (Allis et al., 2007). También se ha observado que está involucrada en varios procesos como en la expresión monoalélica de genes improntados y en la inactivación del cromosoma X de hembras por compensación de dosis (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011; Klose y Bird, 2006). Además esta modificación participa en el silenciamiento de algunos genes de manera permanente en distintas etapas del desarrollo. Por ejemplo, al momento del nacimiento se lleva a cabo una fuerte oleada de metilación que contribuye al “apagado” de genes embrionarios que no serán expresados en la etapa adulta de un organismo (Escamilla-del-Arenal y Recillas-Targa, 2004) y es importante comentar que errores en la regulación de la metilación del DNA han sido relacionados ampliamente con cáncer y trastornos neurológicos (Wu y Zhang, 2010)

Las reacciones de transmetilación biológicas utilizan grupos metilo derivados de donadores de metilos de la dieta o de cofactores que acarrean unidades de carbono. Una vía central para varias de éstas reacciones es el ciclo de la metionina (Figura 8). Los sustratos para las reacciones de metilación son diversos, como pueden ser: DNA, RNA, proteínas o fosfolípidos. Además es importante mencionar que la proporción hepatocelular de SAM/SAH es crítica para controlar las reacciones de metilación (Kharbanda, 2007).

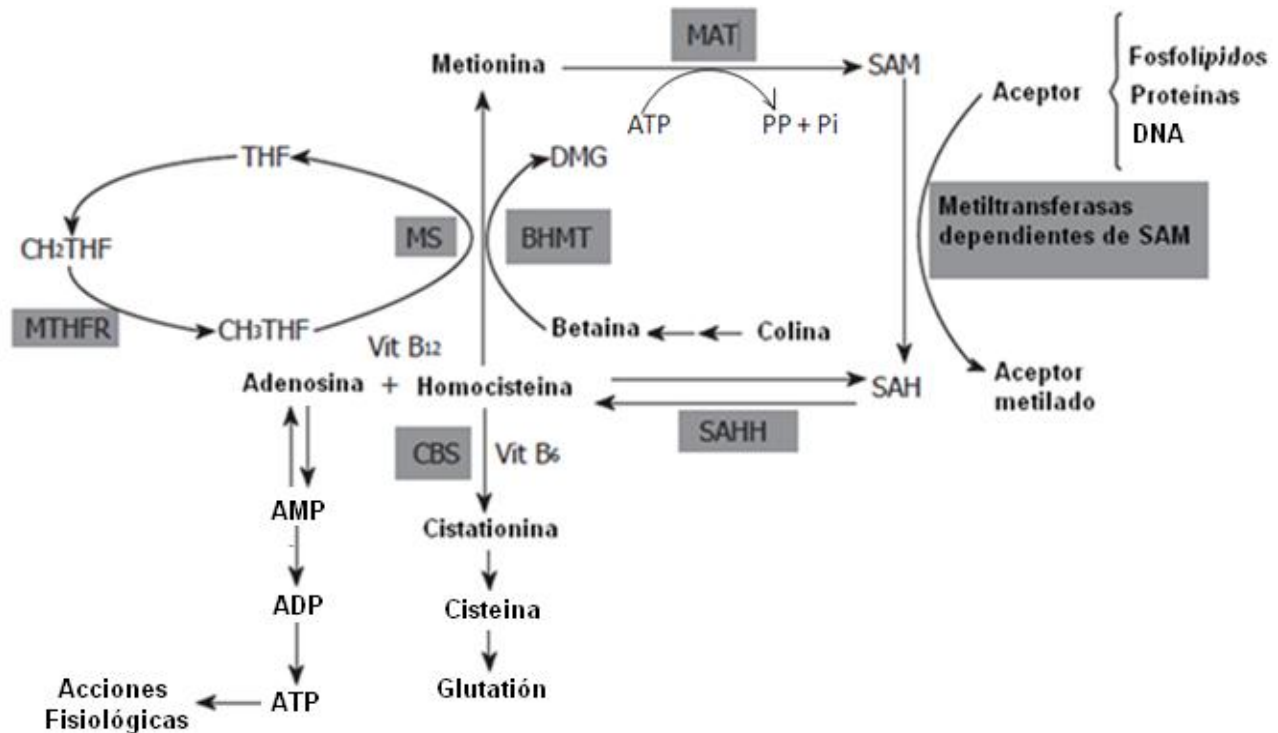


Fig. 8. Rutas metabólicas asociadas al ciclo de la metionina en el hígado. Ciclo de la metionina, ciclo del ácido fólico y transulfonación. Se destaca la importancia de las reacciones catalizadas por metiltransferasas que ocurren gracias a la circulación de los principales participantes: Metionina, S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilhomocisteína (SAH), Homocisteína y Adenosina, MTHFR (metilenterotetrahidrofolato reductasa), MAT (metionina adenosiltransferasa), MS (Metionina sintasa), BHMT (Betaina-homocisteína S-metiltransferasa), CBS (Cistationina-β-sintasa) y SAHH (S-Adenosilhomocisteína hidrolasa). Modificado de (Kharbanda, 2007).

3.1.1.1. Mecanismo de desmetilación activa del DNA

La metilación del DNA solía verse como una marca estable en el genoma que solamente podía perderse con las divisiones celulares, es por esto que la desmetilación inicialmente fue descrita mediante un mecanismo pasivo en el cual se requiere de la replicación del

DNA y la inactividad de las Dnmts, de tal forma que con cada división celular el DNA perdería gradualmente su metilación (Cadena-Del-Castillo, 2014).

Recientemente se describió una forma alterna de desmetilación, que se ha denominado como desmetilación activa (Figura 9). Para que este tipo de desmetilación ocurra es necesario que una enzima remueva el grupo metilo de la 5mC y aunque el proceso de desmetilación activa es frecuente y existen múltiples casos en los que ha sido descrito, a la fecha no se ha identificado ninguna DNA desmetilasa (Guo et al., 2011).

La desmetilación activa consiste en que las citosinas en células de mamífero pueden ser hidroxiladas hacia 5-hidroximetilcitosina (5hmC), la cual es especialmente abundante en tejidos como el cerebro y en células troncales pluripotentes embrionarias, pero también está presente en bajos niveles en sangre, pulmón, riñón y en músculo. Se ha postulado que la metilación y desmetilación del DNA puede ser bidireccional pero englobando varias rutas. Estos descubrimientos sugieren que la 5hmC puede servir como un intermediario para la remoción de la citosina metilada ya sea por dilución pasiva vía la presencia de 5hmC la cual impide la remetilación por DNMTs cuando la célula se divide, o un reemplazo activo de citosinas modificadas vía la reparación del DNA en ausencia de división celular; en estos procesos participan las familias enzimáticas de *ten-eleven translocation* (TET) y AID/APOBEC, es importante comentar que estas enzimas son bien conocidas por su papel en procesos como leucemia (TETs) y en la diversificación de anticuerpos (AID). Actualmente el consenso surgido a partir de estos estudios es que la remoción de la citosina metilada en células de mamífero puede ocurrir a través de la reparación del DNA, lo que muestra que la metilación del DNA no es fija sino más bien un proceso dinámico que requiere de regulación continua (Bhutani et al., 2011).

Las enzimas TET oxidan a la 5mC hacia 5hmC la cual puede ser procesada por la maquinaria de reparación por escisión de bases (BER por sus siglas en inglés) eliminándose así la 5mC (Dahl et al., 2011). El proceso de desmetilación activa continua y la 5hmC es desaminada por las desaminasas AID/APOBEC para transformarse en 5-hidroximetiluracilo (5hmU) y posteriormente es procesada por una DNA glucosilasa, como la timina DNA glucosilasa (TDG por sus siglas en inglés) (Guo et al., 2011). En este sistema la proteína Gadd45a también está involucrada ya que junto con la AID forma un complejo con la TDG (Cortellino et al., 2011).

La 5hmC no es la única modificación resultante de la acción de las enzimas TET sobre la 5mC, también es posible encontrar a otros dos productos, la 5-formilcitosina (5fC) y la 5-carboxicitosina (5caC), que también son parte de los sustratos del sistema BER para la desmetilación activa, sin embargo, aun faltan estudios para determinar si tienen alguna otra función celular. Los primeros estudios sugieren que estas tres son por si mismas parte de los mecanismos de regulación epigenética y a la fecha la más estudiada ha sido la 5hmC (Spruijt et al., 2013) y los estudios han mostrado que tiene un papel antagónico a la 5mC (Mellen et al., 2012).

Estos hallazgos recientes abrieron todo un nuevo campo de estudio respecto a la regulación de la cromatina, ya que es posible que cada una las especies de citosinas modificadas juegue un papel epigenético propio mismos que actualmente se encuentran en exploración por varios grupos a nivel mundial.

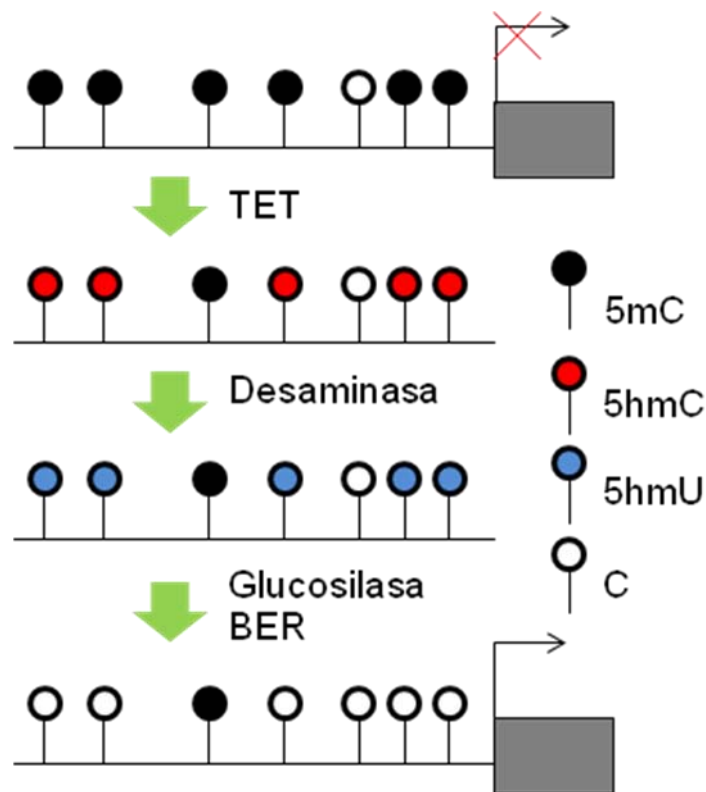


Fig. 9. La metilación del DNA es un proceso dinámico. El esquema muestra la cascada de reacciones sobre la 5mC durante el proceso de desmetilación activa hasta obtener una citosina sin modificar. 5mC, 5-metilcitosina; 5hmC, 5-hidroximetilcitosina; 5hmU, 5-hidroximetiluracilo; C, citosina; TET, *Ten-eleven translocation* y BER, Sistema de reparación del DNA por escisión de bases. Basado en (Ito et al., 2010), cortesía del Dr. Félix Recillas-Targa.

3.1.2. El código epigenético de las histonas

El genoma de los eucariontes se encuentra empaquetado en cromatina la cual es sujeta de múltiples niveles de regulación que por consecuencia permiten la ejecución de los diversos procesos ligados al genoma. Las histonas constituyen una parte fundamental de la estructura de la cromatina, son blancos de una gran variedad de modificaciones post-traduccionales (PTM por sus siglas en inglés) que permiten la formación de estados particulares y regulados de la estructura de la cromatina y además estas modificaciones pueden incorporar una marca heredable post-mitóticamente que es relevante para los procesos del desarrollo y la diferenciación celular así como del mantenimiento del estado diferenciado (Valdes-Quezada, 2014).

Se sabe que el DNA organizado en el nucleosoma no es accesible a la maquinaria transcripcional. Este efecto se ve favorecido cuando las lisinas del extremo amino terminal no sufren modificaciones, de hecho, las cargas positivas de estos residuos permiten la interacción electrostática con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA, generando una organización más cerrada y compacta de la cromatina, es decir, el empaquetamiento del genoma en cromatina tiene repercusiones directas en la actividad transcripcional, siendo necesaria su remodelación para llevar a cabo la expresión de los genes en un espacio y tiempo definido (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002).

Tanto el dominio globular como la región amino-terminal de las histonas son blancos de una serie de PTM. Dichas modificaciones incluyen a la metilación, la acetilación, la ubiquitinación, la ADP-ribosilación y la sumoilación de los residuos de lisina (K); también la metilación de los residuos de arginina (R); y la fosforilación de serinas y treoninas entre otras (Murr, 2010). Sin embargo, entre estas modificaciones la metilación/desmetilación y la acetilación/desacetilación, su establecimiento y papel en la regulación del genoma han sido las más estudiadas (Figura 10). Ante este escenario, se ha llegado a postular que la interdependencia existente entre las diferentes modificaciones puede ser un código de histonas que marcaría la ejecución de programas que podrían definir a cada tipo celular a través de patrones de modificaciones en las histonas específicos a lo largo de todo el genoma (Jenuwein y Allis, 2001).

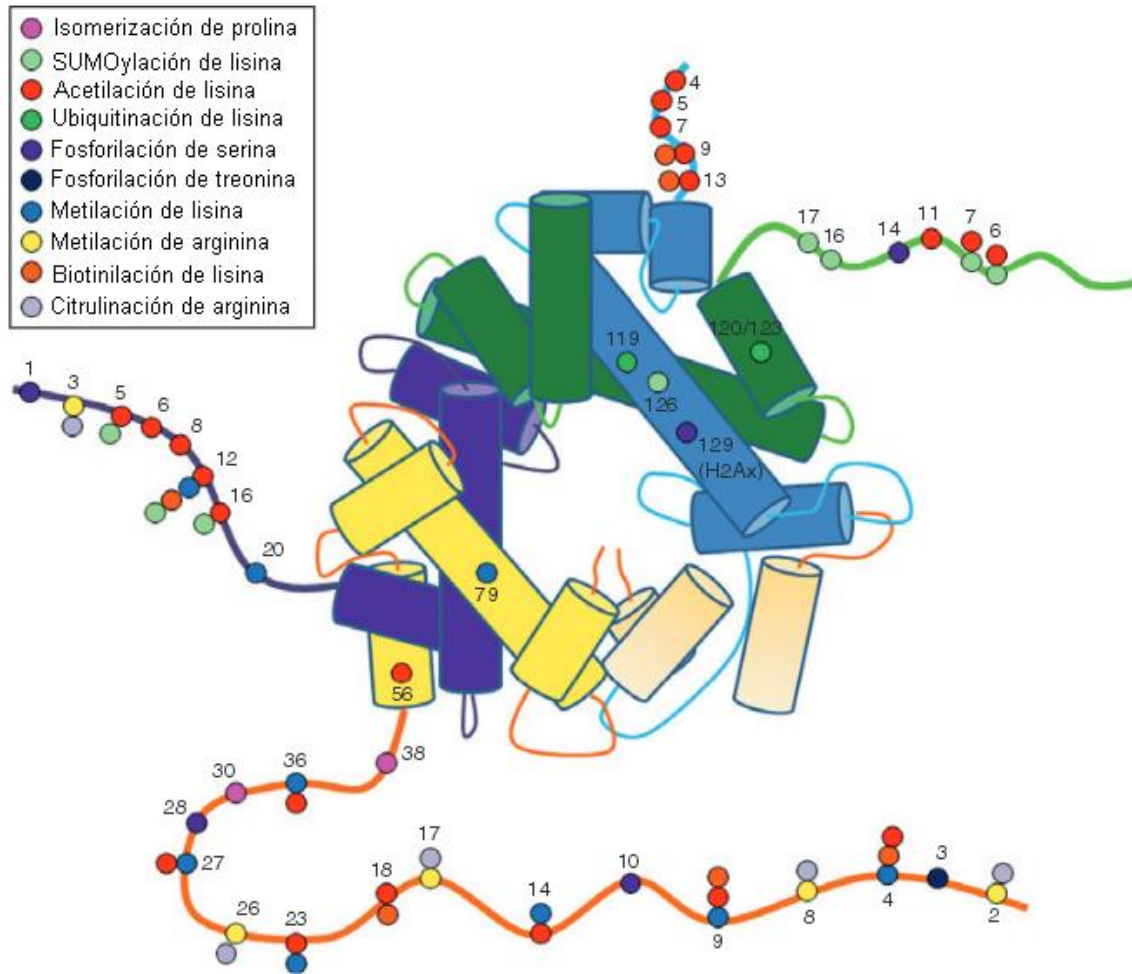


Fig. 10. Modificaciones post-traduccionales de histonas. En esta representación de un nucleosoma se muestra la estructura de los cuatro polipéptidos del core de histona. H2A azul claro; H2B verde; H3 amarillo y H4 azul oscuro. Modificado de (Murr, 2010)

3.1.2.1. La acetilación y desacetilación de las histonas

Como ya se comentó en párrafos anteriores, la asociación del DNA con el “core” de histonas se ve facilitada por la diferencia de cargas entre éstas moléculas, la acetilación de las histonas, neutraliza la carga positiva de las lisinas debilitando así la interacción del nucleosoma con el DNA y por lo tanto favoreciendo una mayor movilidad del nucleosoma exponiendo secuencias en el DNA para ser “leídas” y llevar a cabo su transcripción (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Se sabe que la acetilación está relacionada con la regulación de la transcripción génica. Esta relación se ha corroborado al observar que los complejos activadores de la

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

Como se describe en el párrafo anterior, la acetilación de las histonas es un proceso reversible y su remoción es regulada por la actividad de las enzimas HDAC. Estas enzimas están altamente conservadas a nivel evolutivo desde la levadura hasta el humano. Existen alrededor de 18 distintas HDACs en humanos las cuales pueden ser agrupadas en cuatro familias de acuerdo a su homología con las de las levaduras: Clase I, HDAC1, 2, 3 y 8 con homología a Rpd3; Clase II, HDAC4, 5, 6, 7, 9 y 10 con homología de Hda1; la clase III, Sirt1-7 con homología a Sir2 y la Clase IV, que incluye a HDAC11 (Wang et al., 2009). La desacetilación de histonas generalmente se asocia con represión génica al favorecer la formación de una cromatina compacta, las HDACs han sido identificadas como co-represores de la transcripción (Valdes-Quezada, 2014)

La manera de actuar de las HDACs es a través de complejos de represión como factores que reconocen secuencias de DNA, co-factores (co-represores) así como el reconocimiento de PTM específicas en las histonas. En particular, se sabe que las MBDs tienen la capacidad de interactuar con HDACs para ejercer su efecto de represión de la transcripción fomentando un estado hipoacetilado de la cromatina y por tanto compacto. De esta forma las MBDs como MeCP2, MBD2 y MBD4 pueden interactuar directamente

con HDACs o bien en asociación con los complejos co-represores (Bogdanovic y Veenstra, 2009).

3.1.2.2. La metilación y desmetilación de histonas

La presencia de metilación en los residuos de lisina y arginina en las regiones amino terminales de las histonas puede estar involucrada tanto en procesos de activación o represión génica dependiendo del residuo que se encuentre metilado. Un aspecto relevante es que a diferencia de la acetilación de histonas, la metilación no afecta las interacciones electrostáticas del nucleosoma y el DNA; la metilación de las histonas es una “marca” o “señal” que debe ser reconocida para llevar a la activación o represión génica. La metilación de dichos residuos puede presentarse en tres estados: la adición de un solo grupo metilo (mono-metilación, me1), dos metilos (dimetilación, me2) o bien tres metilos (trimetilación, me3) como se muestra en la figura 11 (Black et al., 2012).

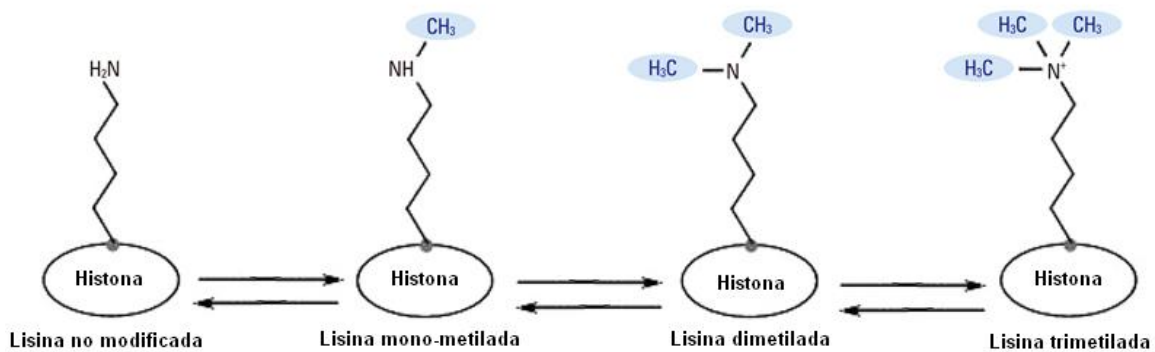


Fig. 11. Metilación de residuos de lisina en las histonas. La metilación de histonas es un proceso reversible ya que se han descrito desmetilasas de histonas. Modificada de (Paik et al., 2014).

La metilación de los residuos, en particular los de lisinas, se encuentra altamente regulada por la acción de las enzimas metil-transferasas de lisina (KMTs por sus siglas en inglés) y lo logran a través de un dominio de metilación de histonas conservado denominado SET. Las posiciones más estudiadas de metilación de histonas son las siguientes: la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 y la H3K20 (Greer y Shi, 2012).

En años recientes se ha descrito que la metilación de las histonas puede también ser revertida por un mecanismo de desmetilación mediado por la familia de enzimas desmetilasas de lisinas (KDMs por sus siglas en inglés) (Figura 12). Esta actividad de

desmetilación fue descrita por el grupo de Shi y colaboradores en 2004 al observar que la enzima LSD1 podía desmetilar histonas tanto *in vitro* como *in vivo* (Shi et al., 2004). Posteriormente, otras enzimas involucradas en este proceso fueron descubiertas, las cuales corresponden a KDMs con dominio Jumonji C (JmjC) de digoxigenasa dependiente de hierro (Tsukada et al., 2006)

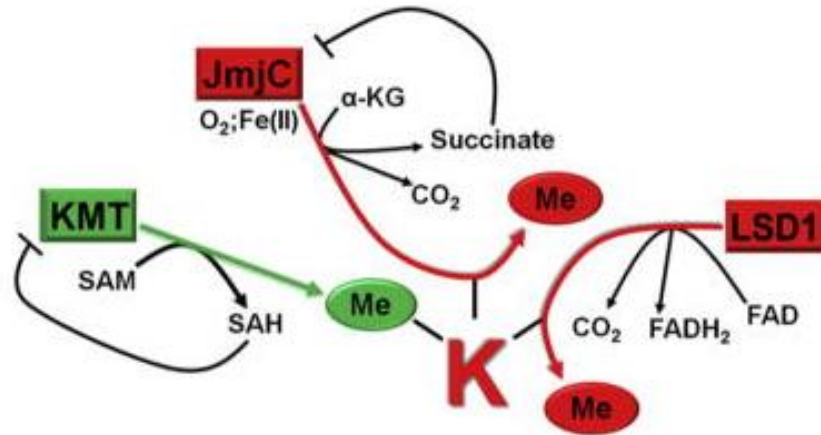


Fig. 12. Mecanismos de las KMTs y KDMs en la metilación y desmetilación de lisina. Se muestran tanto las enzimas involucradas en la metilación de la lisina (verde), en la desmetilación (rojo), sus donadores y derivados. Tomada de (Black et al., 2012).

La trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) es una marca epigenética crucial de heterocromatina y se ha asociado con la represión transcripcional. Un incremento de la metilación en la histona H3K9, conlleva al silenciamiento génico aberrante y se ha encontrado en diversos tipos de cáncer como en hígado, próstata, pulmón, colon y mama donde se ha observado la sobreexpresión de G9a, una HMT específica de la lisina 9 de la histona H3 (Fullgrabe et al., 2011).

De igual manera, la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), que se establece por el sistema *Polycomb*, está implicada en la formación de dominios de cromatina represiva. La marca en la histona H3K27me3 se extiende por grandes regiones que albergan una variedad de genes diana y regula negativamente la transcripción mediante la promoción de una estructura de cromatina cerrada. Se asocia frecuentemente al silenciamiento génico, especialmente en la represión de programas de diferenciación no deseada en la diferenciación de linaje. El homólogo 2 del potenciador zeste (EZH2) es la subunidad catalítica del complejo 2 de represión *polycomb*, el cual media esta modificación sobre la histona H3K27 (Fullgrabe et al., 2011).

Otra modificación asociada a cromatina cerrada es la metilación de la histona H4K20. En particular, la marca en la histona H4K20me3 se encuentra en regiones de heterocromatina constitutiva, así mismo, esta marca se enriquece en regiones de cromatina que contienen genes silenciados. La metilación de la histona H4K20 es compleja y es catalizada por diferentes HMTs, que incluyen Pr-Set7 y Suv4-20 (Suv4-20h1 y Suv4-20h2). El grueso de la monometilación de la histona H4K20 es catalizada principalmente por Pr-Set7. H4K20me1 sirve de sustrato para las enzimas Suv4-20 que son responsables de H4K20me2/3 (Fullgrabe et al., 2011).

En contraste con las modificaciones citadas en los párrafos anteriores, la di- y trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2/me3) se asocia con la capacidad transcripcional y la activación, los niveles más altos se observan próximos a los sitios de inicios transcripcionales de genes con elevada expresión. Una disminución de la metilación en la histona H3K4me2/me3 se observa en un rango de tejidos neoplásicos y puede servir como factor de pronóstico clínico. La metilación de la histona H3K4 se establece por SET1 y por HMTs en la leucemia de linaje mixto (MLL) y es removida por la desmetilasa 1 específica de lisina (LSD1) y por el dominio 1 rico en AT de jumonji (JARID1) que es miembro de la familia de desmetilasas de histonas (HDM) (Fullgrabe et al., 2011).

3.1.3. Resumen epigenética y cromatina

En los eucariontes la regulación de la expresión génica se encuentra estrechamente vinculada con el empaquetamiento del genoma en el núcleo. La organización del genoma en cromatina es capaz de determinar el momento y lugar en que se expresen ciertos genes a lo largo de la vida de una célula. Dentro de éstos mecanismos de regulación y de memoria epigenética, destacan la metilación del DNA que generalmente está asociada al silenciamiento génico y más recientemente se ha descrito que la desmetilación activa del DNA participa en procesos de activación. Por otra parte, las modificaciones que ocurren en la cromatina son otros de los componentes clave en los programas de regulación de la expresión génica y regularán diferentes procesos biológicos desde la capacidad pluripotencial hasta la diferenciación celular y se encontrarán alteradas en condiciones patológicas. Es por ello que conocer los procesos de regulación epigenética, además de los aspectos clínicos, bioquímicos y genéticos, es crucial para entender de manera integral el contexto fisiopatológico. En este sentido, una aportación del presente trabajo de tesis es la caracterización global, a nivel de tejido hepático completo, de algunas modificaciones epigenéticas que ocurren en el proceso cirrótico inducido con CCl₄, del

cual no se cuenta, hasta donde tenemos conocimiento, con una descripción a este nivel y además se revelaron modificaciones en la cromatina mediadas por el tratamiento con un fármaco hepatoprotector. A continuación se describen algunos de los procesos epigenéticos que se encuentran alterados en la fibrosis hepática.

3.2. Epigenética en la fibrosis hepática

Una pregunta que aun no tiene respuesta en el campo de la hepatología es ¿Por qué solo una pequeña minoría de los pacientes cirróticos progresan a estados sintomáticos severos, mientras que la mayoría permanecen relativamente saludables? Cuando esta pregunta se resuelva, el manejo de los pacientes se verá genuinamente transformado gracias a los avances que existan para determinar el pronóstico de la enfermedad, la estratificación de pacientes y la terapéutica. Existen indudablemente factores genéticos, los cuales han sido más evidentes gracias a los estudios de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés). Sin embargo aun se carece de explicaciones genéticas robustas para la variabilidad poblacional en la progresión de la enfermedad del hígado hacia cirrosis, carcinoma hepatocelular y falla orgánica. Un análisis más profundo de GWAS podría arrojar luz sobre las bases mecánicas de la progresión diferencial de la patología, como podría ser el descubrimiento de polimorfismos que condicionen la fibrosis y la generación de tumores. Pero adicionalmente, existe una gran variedad de influencias epigenéticas en el fenotipo celular y en la enfermedad. Estas señales epigenéticas actúan en todo el genoma para influir en la expresión genética y en el comportamiento celular, son altamente dinámicas, responden al microambiente celular y exhiben una considerable diversidad molecular en los distintos niveles tanto celular, como tisular y en el organismo (Mann, 2014)

La trans-diferenciación de las HSC hacia un fenotipo de miofibroblastos profibrogénicos es esencial en la fibrogenesis. La trans-diferenciación requiere una remodelación epigenética global para conducir hacia la supresión de factores de diferenciación adipogénicos y generar *de novo* la expresión de reguladores del fenotipo de miofibroblasto y la entrada al ciclo celular. Para adoptar el fenotipo de miofibroblasto, las HSC necesitan superar barreras dependientes de energía por lo que se ha descrito a la autofagia, un mecanismo por el cual la célula recicla sus componentes intracelulares para generar energía, como un proceso crítico para la activación de las HSC (Hernandez-Gea et al., 2012). Inhibidores moleculares que actúan a nivel epigenético como la 5-azadesoxicitidina (5AzadC) que inhibe a la Dnmt1 así como la 3-desazaneplanocina A

(dZNep) que inhibe a EZH2, inhiben la activación de HSC tanto *in vitro* como *in vivo* (Mann et al., 2010; Mann et al., 2007).

Estudios del grupo de Mann y colaboradores han descrito una vía epigenética que se activa para dirigir la transdiferenciación de HSC (Mann et al., 2010), brevemente, ratones carentes de MeCP2 son protegidos de la fibrosis hepática y las HSC al estar deficientes de *Mecp2* muestran defectos en el fenotipo fibrogénico incluida una reducción en la expresión de colágena I, TIMP-1 y α -SMA. MeCP2 opera dos mecanismos simultáneos para asegurar el silenciamiento epigenético del receptor nuclear PPAR γ y la transdiferenciación de HSC. Puede unirse directamente a regiones regulatorias ricas en CpG en el promotor de PPAR γ y recluta enzimas modificadoras de la histona H3K9me3 que suprimen la transcripción inicial. Además MeCP2 se requiere también para la expresión de EZH2 y la marca de la histona H3K27me3 en la región codificante del gen río abajo lo que impide la elongación de la transcripción. Estos dos mecanismos ayudan a explicar la capacidad de 5AzadC y dZNep para inhibir la transdiferenciación de HSC. Más recientemente, el mismo grupo describió como MeCP2 puede promover la transcripción de múltiples genes profibrogénicos a través del control en la expresión de ASH1, la metiltransferasa de la histona H3K4/H3K36 (Perugorria et al., 2012).

Cambios en la metilación del DNA durante la activación de las HSC se han reportado en *loci* específicos como en el supresor de tumores PTEN y en Patched 1 (PTCH1); en ambos casos los genes se hipermetilan y esto correlaciona con la disminución en su expresión en los miofibroblastos (Yang et al., 2013b). Un estudio reciente del laboratorio de Diehl donde se evaluaron 69,247 dinucleótidos CpG diferencialmente metilados en biopsias de hígado provenientes de pacientes con NAFLD agrupados en enfermedad avanzada contra intermedia (Murphy et al., 2013), reportó que 76% de los sitios CpG modificados se hipometilan en la enfermedad avanzada mientras que el 24% presentaron hipermetilación y hasta el momento, el mecanismo por el cual ocurren estos cambios en la metilación del DNA asociados a NAFLD no se ha estudiado. Los datos del metiloma de DNA se conjuntaron con datos del transcriptoma de las mismas biopsias, esto condujo al descubrimiento de varios genes fibrogénicos clave que estaban hipometilados y se sobreexpresaban en NAFLD avanzada.

Por otra parte es muy probable que RNAs no codificantes de todos los tamaños y actividades desempeñen funciones fundamentales en la determinación del fenotipo de las HSC y la fibrosis hepática. Numerosos miRNAs que regulan la proliferación, la apoptosis,

señalización por la vía de TGF β 1 y la expresión de colágena han sido descritos como reguladores del fenotipo de las HSC y la progresión de la fibrosis y aun están por conocerse investigaciones sobre las funciones de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) (Chen et al., 2013b).

4. Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs)

Los PPARs, así como los receptores más estudiados de estrógenos, glucocorticoides u hormonas tiroideas, pertenece a la misma familia de factores de transcripción, que comprende 49 miembros. Poseen la estructura canónica de los dominios de un receptor nuclear, con cada dominio (de unión a DNA, de unión a ligando, de trans-activación) modulando el potencial regulatorio génico. Se han identificado tres isoformas: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3). El PPAR α fue el primero en ser clonado a partir de roedores como un receptor nuclear activado por agentes que producen la proliferación peroxisomal en el hígado. Sin embargo este efecto no se ha observado en humanos. Los PPARs son activados por ligando, como la mayoría de los receptores nucleares. Los ligandos endógenos de PPAR son los ácidos grasos y sus derivados como los leucotrienos y las prostaglandinas. Se ha propuesto que los PPARs actúan como “lipoestáticos” ya que se encargan de monitorear las señales lipídicas (Dufour y Clavien, 2010).

Los PPARs actúan en la regulación de genes en diferentes estados, incluyendo la activación por ligando, uniéndose al DNA, disminuyendo corepresores o reclutando co-activadores. La unión a DNA requiere de la formación de un heterodímero de PPAR y RXR (receptor X de ácido retinoico: receptor para 9-*cis* ácido retinóico, NR2B) y la unión de este a su elemento de secuencia específica en la región reguladora de los genes diana, la cuál es llamada elemento respuesta a PPARs (PPRE) (Figura 13). Para activar la transcripción, los PPARs requieren de co-factores, algunos de los cuales tienen actividad remodeladora de cromatina, como la acetil transferasa de histonas (HAT) p300. Para regular genes diana específicos en un tejido dado, se requiere la coexpresión de PPARs y un conjunto definido de sus co-reguladores en la misma célula (Dufour y Clavien, 2010).

Adicionalmente a este control clásico de la expresión genética dependiente de ligando, la actividad transcripcional de PPARs es finamente modulada por modificaciones post-

transcripcionales incluyendo la fosforilación y la sumoilación (SUMO1; un pequeño modificador tipo ubiquitina) (Dufour y Clavien, 2010).

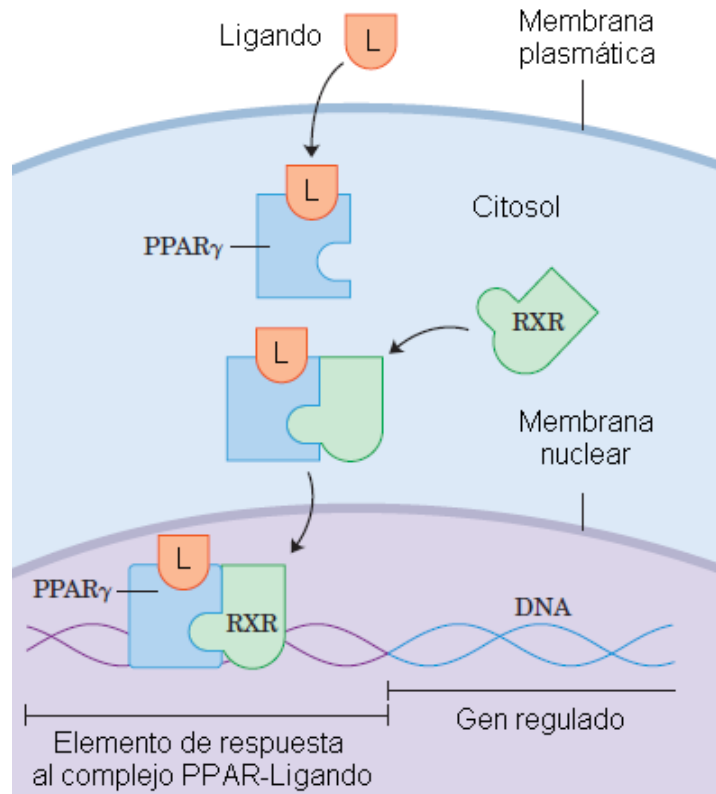


Fig. 13. Mecanismo de acción de PPARs. Los PPARs son factores de transcripción que cuando se unen a su ligando, forman un heterodímero con el receptor nuclear RXR. El dímero se une a una región específica de DNA conocida como elemento de respuesta, estimulando la transcripción de genes regulados por dicha secuencia. (Modificado de (Nelson y Cox, 2008).

La integración metabólica de los PPARs en el humano (Figura 14) es la siguiente: PPAR γ , se expresa principalmente en el hígado y tejido adiposo. Está involucrado en la activación de genes que son necesarios para la diferenciación de fibroblastos en adipocitos y con genes que codifican para proteínas necesarias para la síntesis de lípidos y su almacenamiento en adipocitos. PPAR γ es activado por las tiazolidinedionas, fármacos que son usados para el tratamiento de la diabetes tipo 2. PPAR α se expresa en el hígado, riñón, corazón, esqueleto, músculo y tejido adiposo marrón. Los ligandos que activan la transcripción de este factor incluyen eicosanoides, ácidos grasos libres, y los fármacos de la clase de los fibratos como el fenofibrato (TriCor) y el ciprofibrato (Modalin), que son utilizados para tratar la enfermedad coronaria a través de la elevación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la disminución de triacilglicerolos sanguíneos. En los hepatocitos,

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

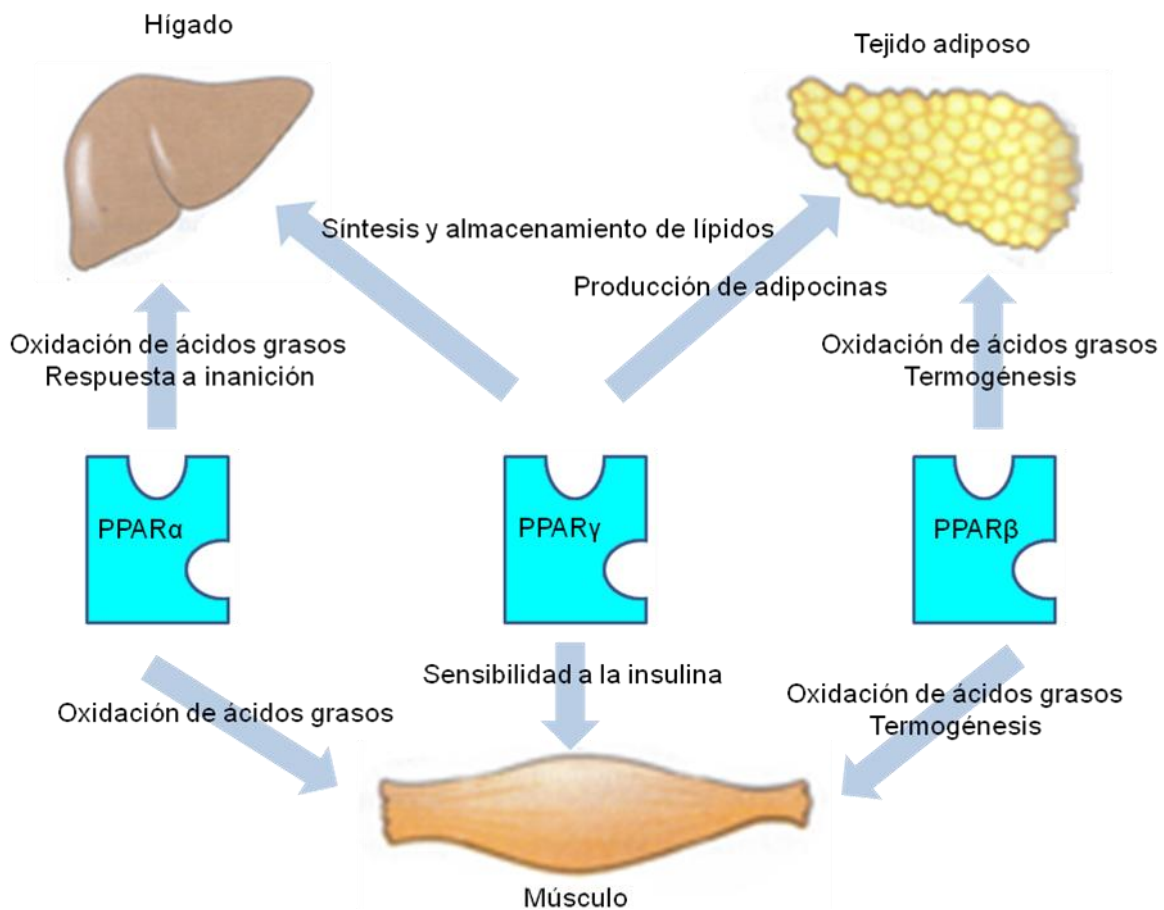


Fig. 14. Integración metabólica de PPARs. Las tres isoformas de PPARs regulan la homeostasis de lípidos y glucosa a través de la coordinación de la activación de genes a nivel hepático, muscular y de tejido adiposo. (Modificado de (Nelson y Cox, 2008).

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

reparación de tejidos y desarrollo embrionario. En el hígado PPAR β/δ se expresa en células estelares pero es pobremente expresado en células parenquimales. PPAR γ se encuentra principalmente en tejido adiposo, donde regula la adipogénesis y la integridad del tejido adiposo. En el hígado PPAR γ se presenta en niveles muy bajos, pero sus niveles incrementan significativamente durante la acumulación de lípidos tanto en células parenquimales como en estelares (Dufour y Clavien, 2010).

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

4.1. Mecanismos transcripcionales de PPAR γ en adipocitos y macrófagos

La expresión de *Pparg* en tejidos no adiposos es generalmente muy baja, sin embargo, se ha reportado que cuando PPAR γ adiposo es removido, ocurre una compensación al incrementar la expresión del gen en el músculo e hígado (Koutnikova et al., 2003).

PPAR γ se une a su elemento de respuesta (PPRE) en su gen blanco lo que promueve la formación de un dímero con el receptor de ácido retinóico X (RXR) (Figura 15). Es generalmente aceptado que en la ausencia de ligando, PPAR γ se asocia con proteínas corepresoras incluyendo SMRT y NCoR, que además parecen estar implicados en el reclutamiento de desacetilasas de histonas en el PPRE. Cuando el agonista se une al receptor, estos corepresores se disocian del complejo y un conjunto de familias proteínas coactivadoras como p300/Proteína de unión a CREB (CBP) y SRC/p160 son reclutadas al complejo de PPAR γ , resultando en su activación transcripcional. Se ha reportado que este cambio de corepresores a coactivadores es mediado por TBL1 (transducina β tipo 1) y su proteína relacionada TBLR1 (Perissi et al., 2004). Esto sugiere que la activación transcripcional de PPAR γ es dinámica y altamente coordinada. Sin embargo, el repertorio de interacciones puede ser significativamente diferente de un tipo celular a otro o de un *locus* de gen a otro (Sugii y Evans, 2011).

Adicionalmente se ha reportado que PPAR- γ forma un complejo represor que contiene a la proteína retinoblastoma (pRb) y a una desacetilasa de histonas HDAC3 (Fajas et al., 2002). Como HDAC3 se ha encontrado en el complejo junto con NCoR y SMRT (Guenther et al., 2001), se ha especulado que la presencia de estos corepresores facilita la actividad represora de pRb/HDAC3 (Sugii y Evans, 2011). Durante la diferenciación de

adipocitos blancos, la fosforilación de pRb disocia el complejo represor pRb-HDAC3 (Yu et al., 2005). Esto puede permitir a las proteínas coactivadoras como p300/CBP asociarse a PPAR γ para apoyar en su actividad adipogénica (Sugii y Evans, 2011). La actividad de PPAR γ también depende de componentes de los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF, de las subunidades BAF60c y BRG1 ATPasa (Debril et al., 2004).

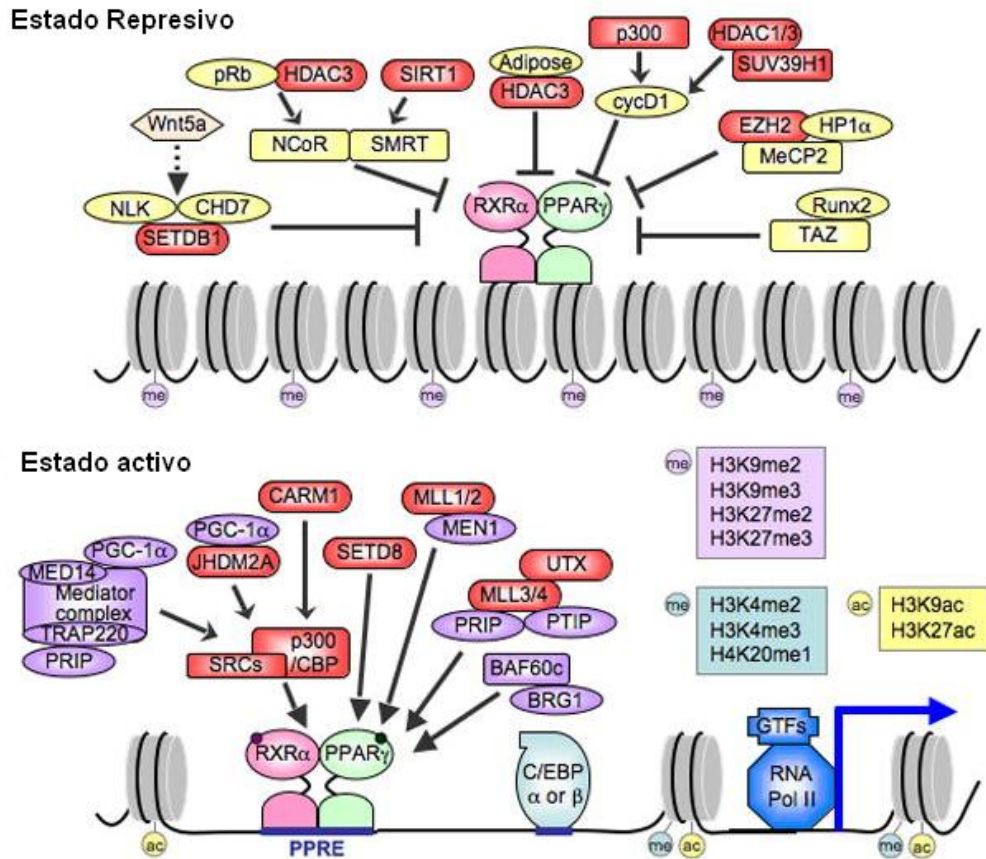


Fig. 15. Representación esquemática de las cascadas transcripcionales de PPAR γ y modificaciones de la cromatina en los estados represivo (diagrama superior) y activo (diagrama inferior) en adipocitos. De las proteínas mostradas en rojo se sabe que poseen actividades enzimáticas epigenéticas y posiblemente afectan la metilación (me) y la acetilación (ac) de histonas alrededor de los sitios de unión de PPAR γ . Las marcas represoras de histonas que se observan asociadas a PPAR γ incluyen H3K9me2, H3K9me3, H3K27me2 y H3K27me3, mientras que las marcas de activación incluyen H3K4me2, H3K4me3, H4K20me1, H3K9ac y H3K27ac. El estado represivo se caracteriza por la unión de corepresores y marcas metiladas represivas, mientras que el estado activado está indicado por la unión de coactivadores y marcas metiladas y acetiladas de activación. El estado activo también está caracterizado por la unión de agonistas de PPAR γ y el reclutamiento de la proteína C/EBP en sitios proximales permitiendo el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II y los factores generales de la transcripción. Tomado de (Sugii y Evans, 2011).

En macrófagos, se ha propuesto que las tiazolidinedionas (TZDs), una clase de fármacos que actúan como sensibilizadores de insulina y son ligandos altamente afines a PPAR γ , se unen al receptor lo que provoca que una pequeña fracción de PPAR γ sea SUMOilada y esta modificación lleva a la disociación hacia monómero del heterodímero RXR:PPAR promoviendo una nueva superficie de interacción con los complejos represores NCoR y SMRT. Este monómero SUMOilado luego se asocia, vía un proceso independiente de unión a DNA, a los promotores de genes inflamatorios para reprimir su actividad transcripcional (Pascual et al., 2005). Se ha demostrado, por otra parte, que PPAR γ SUMOilado en complejo con NCoR es reclutado por sitios AP1 a través de la interacción con c-Jun para reprimir genes inducibles por TLR4 (Sugii y Evans, 2011).

Estudios de genoma completo basados en inmunoprecipitaciones de la cromatina (ChIP) han mostrado que la mayoría de los sitios de unión de PPAR γ identificados en macrófagos son de elementos clásicos DR-1 y se encuentran adyacentes a los de C/EBP β y/o al factor de transcripción hematopoyético específico PU.1 que es lo opuesto a C/EBP α en adipocitos (Lefterova et al., 2010).

4.2. Resumen epigenética en la fibrosis hepática y PPAR γ

La mayoría de los estudios en el campo de la fibrosis hepática se han centrado en el estudio de las HSC y su activación ya que son las células responsables de la producción de los componentes de matriz extracelular que conducen al estado cirrótico. Uno de los principales participantes en el proceso fibrogénico es el receptor nuclear PPAR γ , el cual disminuye considerablemente durante la transdiferenciación de HSC hacia miofibroblastos, este receptor se ha descrito como un represor transcripcional del *Col1a1*, por lo que su disminución favorecería el proceso fibrótico. La investigación en torno a éste receptor nuclear se ha centrado en su papel durante la diferenciación de adipocitos, sin embargo recientemente se ha descrito su papel en macrófagos promoviendo el silenciamiento de genes inflamatorios. Es importante destacar que dentro de los complejos protéicos donde se encuentra PPAR γ tanto en su estado represor como en el activador, participan diferentes modificadores de la cromatina los cuales estarán regulando su compactación para favorecer o reprimir los genes blanco de regulación del receptor nuclear. El campo de investigación sobre PPAR γ es amplio y los esfuerzos por entender sus funciones son variados, incluyéndolo como blanco terapéutico de enfermedades como la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico e incluso el cáncer. En éste trabajo de tesis se evalúa su papel antifibrogénico en un modelo de inducción de

cirrosis con CCl_4 desde el punto de vista de las modificaciones epigenéticas que regulan su expresión.

III. ANTECEDENTES

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

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

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

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

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

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

El efecto de la adenosina se ha probado en modelos agudos de hepatotoxicidad inducida por la administración de etanol o tetracloruro de carbono (CCl₄) observándose una disminución en los efectos tóxicos evidenciados por una prevención de la necrosis celular y la infiltración de grasa en el hígado. Además, también se han probado los efectos del IFC-305 en un modelo de hepatotoxicidad crónica como la cirrosis, la cual se induce experimentalmente por el tratamiento con CCl₄ en ratas. Estos estudios en el modelo de prevención de cirrosis con la administración simultánea del tóxico y del derivado de adenosina, mostraron una disminución de la fibrosis inducida por el tóxico al inhibir en un 50% la acumulación de colágena en el tejido hepático, como resultado de un aumento en la actividad colagenolítica del hígado, observándose una normalización del metabolismo de colágena e induciendo un aumento en la proliferación hepática del hígado cirrótico (Chagoya-de-Sánchez et al., 2005).

En un modelo de reversión de cirrosis inducido con CCl₄ el IFC-305 tiene efectos hepatoprotectores evidentes a nivel de fenotipo (Rodríguez-Aguilera, 2012), los cuales fueron observados en el momento de la disección hepática (Figura 16A), en el hígado cirrótico se observa una arquitectura hepática distorsionada, nódulos de regeneración y acumulación de bilirrubina, mientras que en el hígado de ratas con el tratamiento con IFC-305 se observa una arquitectura similar al tejido control. El fármaco es capaz de disminuir las fibras de colágena a las 5 semanas de tratamiento después de la inducción de la cirrosis, observándose en tinciones de tricrómica de Masson, una recuperación paulatina de la arquitectura normal del hígado (Figura 16B) (Pérez-Cabeza-de-Vaca, 2012). Estos

efectos se acompañaron de una mejoría significativa de la función hepática recuperándose hacia valores semejantes de los animales controles (Tabla 4) (Perez-Carreón et al., 2010)

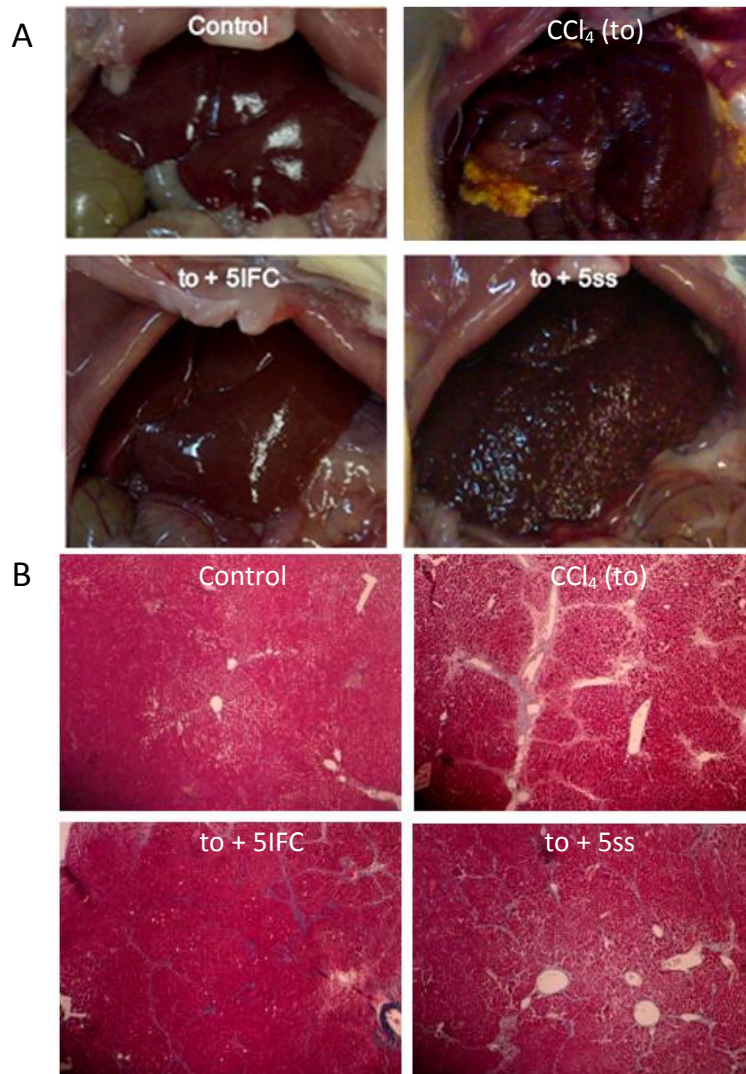


Fig. 16. Características fenotípicas de los hígados de rata en los diferentes estados del modelo de inducción de cirrosis con CCl₄. A) Fotografías de los hígados al momento de la disección, se observa el efecto hepatoprotector del IFC-305 al evitar la distorsión de la arquitectura hepática. B) Cortes de hígado teñidos con tricrómica de Masson. Esta tinción permite observar las fibras de colágena tipo I de color azul, los citoplasmas y estructuras oxidadas en rojo y el núcleo más denso. Se observa que en cirrosis(to) y to + 5ss existe alta deposición de fibras de colágena y una distribución desordenada de los cordones de hepatocitos, en comparación con el control y el tratamiento con IFC-305 (to+5IFC) en donde se observa un parénquima más ordenado y en el caso de to+5IFC que las fibras de colágena son más pequeñas respecto a to+5ss. Tomado de (Pérez-Cabeza-de-Vaca, 2012).

Tabla 4. Parámetros serológicos de la función hepática en rata. Tomado de (Perez-Carreón et al., 2010)

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

Promedio ± DEM 5 ratas/grupo; Alanina aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST) *Diferencia significativa comparada contra el grupo control. **Diferencia significativa comparada contra to + 5ss ó to + 10ss. (ss: solución salina)

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

Las enfermedades crónicas del hígado representan una importante causa de morbilidad y mortalidad. Enfermedades recurrentes o crónicas y las vías de remodelado de tejido inflamado pueden originar una fibrosis severa y un eventual estado de cirrosis. La activación de las células estelares juega un papel importante durante la regulación de la regeneración hepática (Dufour y Clavien, 2010). En las áreas dañadas, durante la fibrogénesis, ocurre la transición de células estelares quiescentes a miofibroblastos proliferativos a través de la acción de citocinas y estrés oxidante; este cambio de fenotipo, está caracterizado por la pérdida de las gotas lipídicas que contienen ácido retinóico en éstas células, y una elevada expresión de componentes de matriz extracelular como las proteínas colágena I y III, actina α de músculo liso (α -SMA) y desmina. La colágena tipo I constituye el 40-50% del total de las proteínas colágena en el hígado sano e incrementa a 60-70% en el hígado cirrótico. La colágena tipo I, es una proteína heterotrimérica compuesta de dos polipéptidos $\alpha 1(I)$ y uno $\alpha 2(I)$, codificados por dos genes diferentes que se encuentran sobre expresados durante la fibrogénesis hepática. Al tratar HSCs activadas con un ligando para PPAR γ o al transfectar estas células con un plásmido que contenga el gen que codifica a PPAR γ , se ve disminuída la expresión basal de la actividad del promotor de procolágena $\alpha 1(I)$ la cual es altamente dependiente de la región flanqueadora 5' en las 2.2 kb proximales. Tsukamoto y colaboradores (Yavrom et al., 2005) demostraron que en el promotor proximal a -133 pb en la región flanqueante 5' de

$\alpha 1(I)$ protocolágena es dónde PPAR- γ ejerce su efecto inhibitorio, el cual esta mediado por la habilidad de ésta proteína para suprimir la unión de NF- κ B y su trans-activación facilitada vía la inhibición de la proteína p300, que es una acetilasa de histonas; es decir, PPAR γ suprime la activación de células estelares a través de la regulación negativa de colágena y componentes de la matriz extracelular. Por el contrario, en un modelo de CCl₄ para inducir un daño agudo al hígado, la activación de PPAR- β/δ induce la proliferación de células estelares durante la fibrosis temprana y potencializa la expresión de marcadores fibróticos (Hellemans et al., 2003)

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

Al estudiar el transcriptoma de muestras de hígados de ratas a las que se les indujo cirrosis con CCl₄ se observaron 414 diferentes genes desregulados, mientras que al administrar el hepatoprotector IFC-305 a ratas cirróticas los genes alterados se reducen a 263 (Tabla 5 y Figura 17) (Perez-Carreón et al., 2010).

Tabla 5. Modificaciones en el perfil expresión genética global en hígados cirróticos así como el efecto del IFC-305 en este modelo (Perez-Carreón et al., 2010)

Muestra	Sobreexpresados	Subexpresados	Total
CCl ₄ (to)	85	88	173
to + 5ss	86	91	177
to + 10ss	118	72	190
to + 5IFC	83	84	167
to + 10IFC	93	63	156

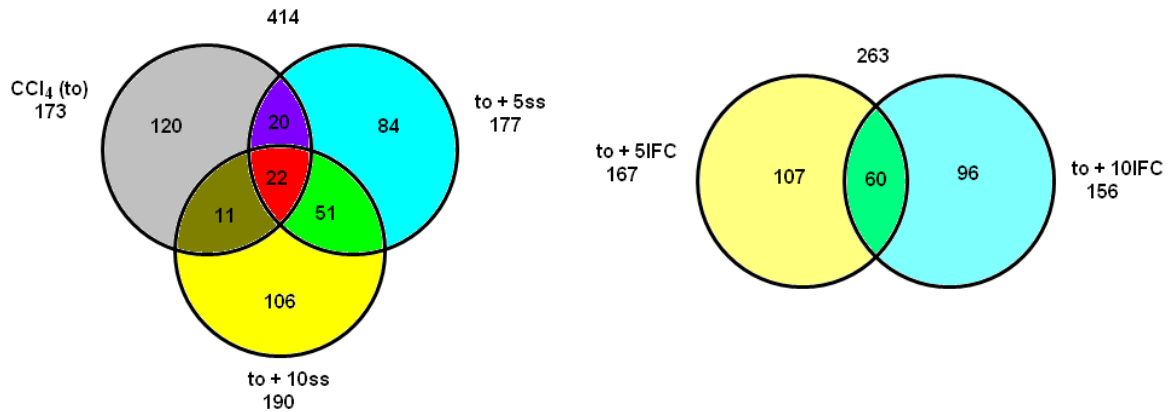


Fig. 17. Modificaciones en el perfil expresión genética global en hígados cirróticos (izquierda) así como el efecto del IFC-305 en este modelo (derecha). CCl₄ (to): Ratas tratadas con CCl₄ durante 10 semanas, estado cirrótico; to+5ss: Ratas cirróticas tratadas con solución salina durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis; to+10ss: Ratas cirróticas tratadas con solución salina durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis; to+5IFC: Ratas cirróticas tratadas con IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis; to+10IFC: Ratas cirróticas tratadas con IFC-305 durante 10 semanas después de la inducción de cirrosis (Perez-Carreón et al., 2010).

Dos genes modulados a nivel de transcripción por el IFC-305 son: *Col1a1* y *Pparg* (Perez-Carreón et al., 2010) (Figura 18A) y este comportamiento se observa también a nivel de proteína (Rodríguez-Aguilera, 2012) (Figura 18B). Por otra parte, se ha demostrado que PPAR γ disminuye la actividad fibrogénica en células estelares a través de la bajo-regulación de la procolágena α 1(I) y otros componentes de la matriz extracelular (Yavrom et al., 2005); además el IFC-305 bloquea la activación de células estelares a miofibroblasto, observándose un aumento en la expresión del gen *Pparg*, y una disminución de las proteínas fibrogénicas (Figura 19) (Velasco-Loyden et al., 2010).

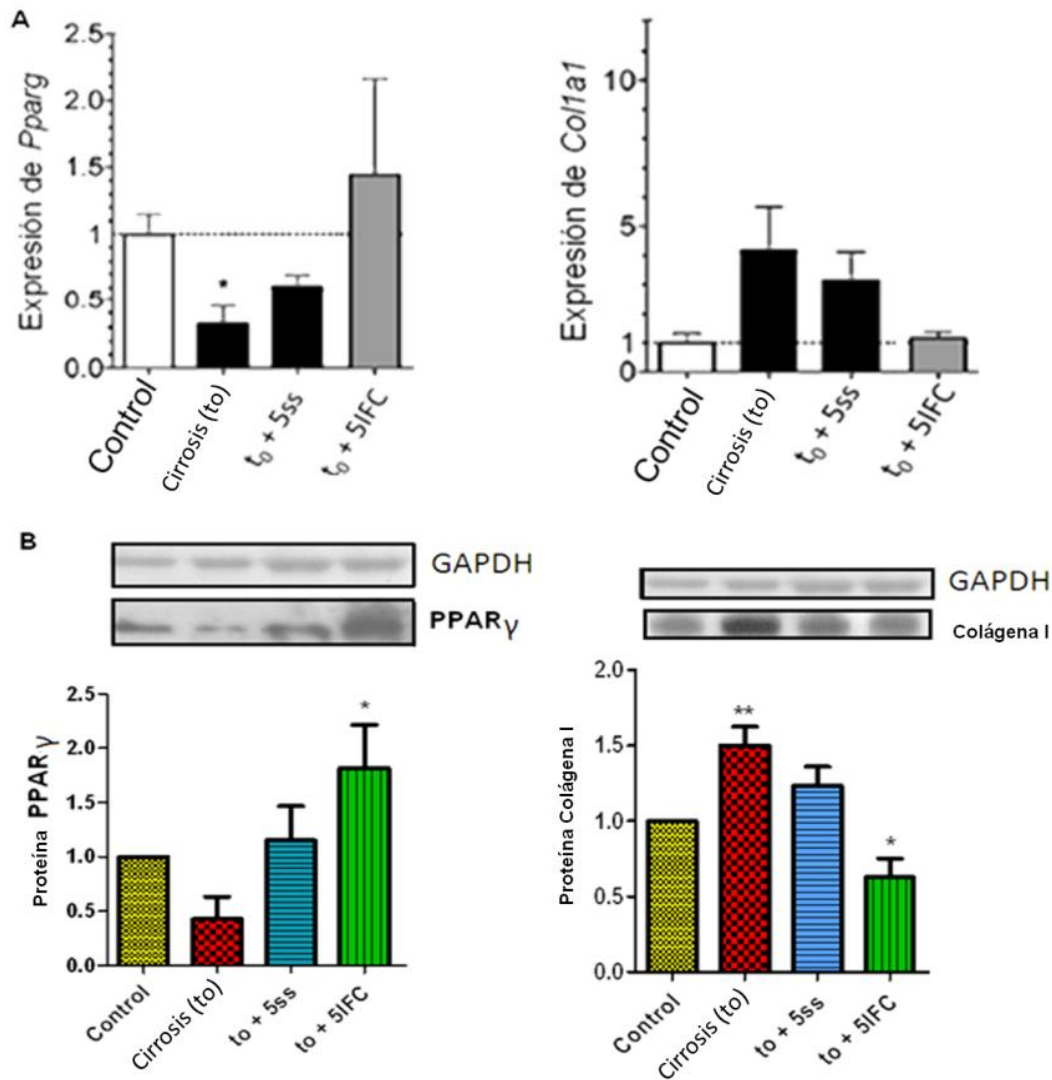


Fig. 18. Efecto del IFC-305 sobre PPAR γ y Colágena I en hígados cirróticos. A) El mRNA de *Pparg* y *Col1a1* fue cuantificado y referido a los niveles del hígado control. Los valores de expresión arbitrarios fueron normalizados con el nivel genético de rRNA 18s eucariótico control. Los datos representan el promedio \pm DEM de 5 ratas/grupo. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparado con el grupo NL. Tomado de (Perez-Carreón et al., 2010). B) Efecto del IFC-305 sobre la cantidad de las proteínas PPAR γ y colágena I en el hígado cirrótico. Se muestra el análisis densitométrico promedio de 4 ratas/grupo \pm DEM. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra los grupos cirrosis (to) y to + 5ss; ** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo control. Modificado de (Rodríguez-Aguilera, 2012).

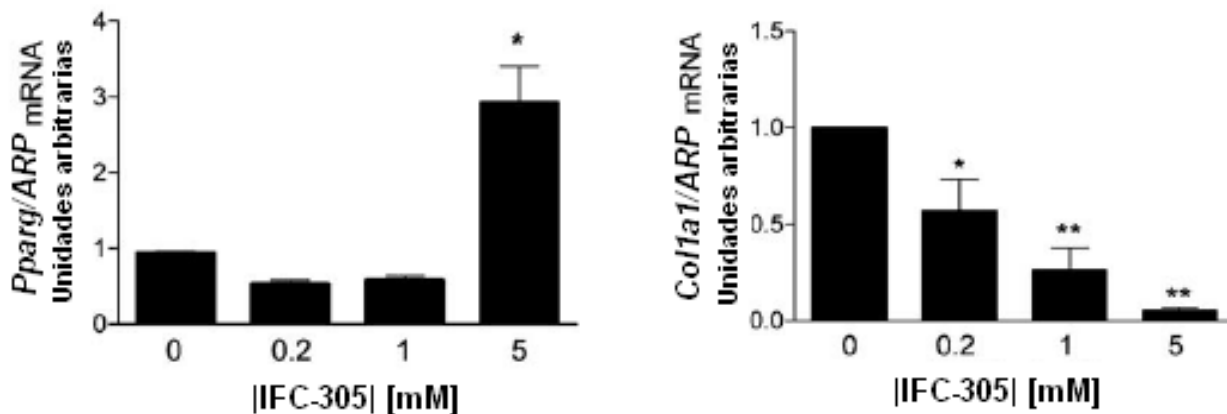


Fig. 19. Efecto del IFC-305 sobre células estelares hepáticas. El IFC-305 regula la expresión de marcadores profibrogénicos y antifibrogénicos en un cultivo de HSCs de 7 días. A las 24 después del aislamiento, las células fueron incubadas con las concentraciones indicadas de IFC-305 por 7 días, cambiando el medio cada día. A la izquierda se muestran dos gráficos con el análisis de qPCR de la expresión de *Pparg* y *Col1a1*; los datos fueron normalizados con la expresión de RNAm del gen de la proteína ácida ribosomal (*ARP*) y están expresados como el valor promedio \pm DEM de tres experimentos diferentes. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$ contra células a las que no se adicionó IFC-305. A la derecha se muestra un gráfico que resume dicho efecto del IFC-305 sobre HSCs. Modificado de (Velasco-Loyden et al., 2010).

En un primer esfuerzo por entender si la regulación de los genes alterados durante el proceso cirrótico por la administración del IFC-305 estaba relacionada con mecanismos epigenéticos, se evaluó de manera global la metilación del DNA genómico, ya que el compuesto base del fármaco, la adenosina, participa directamente en el ciclo de la metionina (Figura 8) en el cual se genera el principal donador de grupos metilo del organismo (SAM) y se encontró que el hepatoprotector genera un incremento del DNA metilado si se administra durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis con CCl_4 (Figura 20a). Por otra parte, Mato y colaboradores (Varela-Moreiras et al., 1995) demostraron por el método de incorporación de grupos metilo *in vitro* que la administración de CCl_4 a ratas induce una hipometilación del DNA genómico (Figura 20b), en la literatura se ha propuesto que la hipometilación contribuye a la carcinogénesis a través del favorecimiento de la recombinación mitótica, provocando deleciones, translocaciones y rearrreglos cromosómicos, lo cual se conoce colectivamente como inestabilidad genómica (Hamilton, 2011). Con estos dos datos es posible decir que el hepatoprotector disminuye la inestabilidad genómica producida durante la cirrosis.

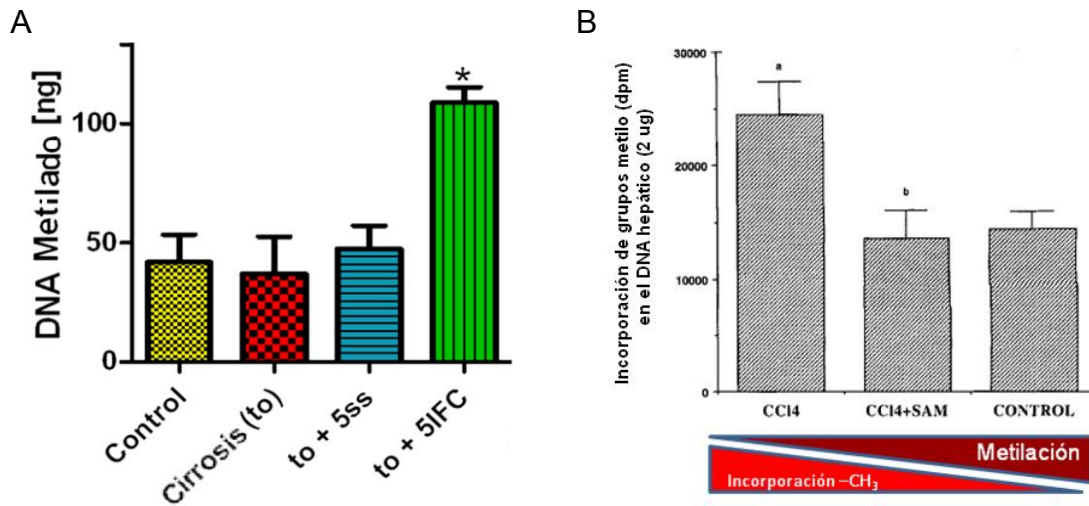


Fig. 20. Cantidad de DNA metilado en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄. A) El DNA metilado se midió a través de un ensayo de ELISA para detectar la presencia de 5mC en el modelo estudiado y el efecto del IFC-305 encontrando que la administración del hepatoprotector produce un incremento en la cantidad de DNA metilado. Los datos representan el promedio \pm DEM de 3 ratas/grupo. Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo control. Modificado de (Rodríguez-Aguilera, 2012). B) Metilación del DNA hepático aislado de ratas control y administradas con CCl₄ y CCl₄+SAM. La metilación se expresa como dpm grupos [³H-metil] incorporados en 2 ug de DNA hepático aislado. Los resultados se representan como el promedio \pm DEM de 5 animales/grupo. (a) Diferencia significativa ($p < 0.01$) del grupo control; (b) Diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los dos grupos tratados con CCl₄. Modificado de (Varela-Moreiras et al., 1995).

Es por esto que el equipo de la Dra. Chagoya se encuentra interesado en determinar si la regulación de genes alterados en cirrosis esta mediada por modificaciones epigenéticas atribuibles a las acciones farmacológicas del compuesto IFC-305.

IV. JUSTIFICACIÓN

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

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

Se han descrito los efectos hepatoprotectores del IFC-305 a nivel bioquímico, histológico y transcripcional en un modelo de cirrosis inducido con CCl_4 (Perez-Carreón et al., 2010), sin embargo los mecanismos de acción por los cuales el fármaco ejerce esta acción se desconocen; para determinar si parte del mecanismo de acción de éste compuesto involucra la regulación de la expresión de *Col1a1* a través de su represión por PPAR γ , se estudiarán las modificaciones epigenéticas en los promotores de ambos genes.

VI. HIPÓTESIS

La reversión de la cirrosis por la administración de IFC-305, esta mediada en parte, por modificaciones epigenéticas en los promotores de *Pparg* y *Col1a1*, lo cual permite un incremento de la proteína PPAR γ que ejerce su actividad represora sobre colágena I.

VII. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión de PPAR γ y Colágena I en cirrosis está regulada por modificaciones epigenéticas en los promotores de sus genes y si el mecanismo hepatoprotector del IFC-305 involucra la modificación de dichas marcas.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el estado de metilación de los promotores de los genes *Pparg* y *Col1a1*, involucrados en el proceso fibrogénico, a lo largo del modelo de cirrosis inducida con CCl_4 y su reversión por la administración de IFC-305 así como en el modelo de activación de HSC en cultivo.
2. Estudiar del estado de hidroximetilación (5hmC) global del DNA genómico en el modelo de cirrosis inducida con CCl_4 y el efecto del IFC-305 así como en el modelo de activación de HSC en cultivo.
3. Determinar de manera global las modificaciones postraduccionales de histonas en el modelo de cirrosis inducida con CCl_4 y el efecto del IFC-305 en sobre dichas modificaciones así como en el modelo de activación de HSC.
4. Estudiar la deposición de marcas de histonas asociadas a cromatina transcripcionalmente activa e inactiva en el promotor de *Pparg* en el modelo de cirrosis estudiado así como el papel que juega el IFC-305 en la regulación de la incorporación de marcas de histonas.
5. Determinar la posible interacción de la proteína PPAR γ en el promotor del gen *Col1a1* por efecto del IFC-305 durante el modelo de inducción de cirrosis como posible mecanismo de acción del fármaco.

IX. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Sustancias químicas

El CCl_4 utilizado fue de la compañía Merck México (Merck 1.02222.2500). El IFC-305, se preparó en el laboratorio de acuerdo a la patente UNAM 207422 y se obtuvo como un sólido blanco con las siguientes propiedades: masa molar de 400.34 g/mol, intervalo de fusión de 216-218°C, soluble en agua.

2. Obtención de material biológico

Para cubrir con los objetivos planteados en el presente trabajo se utilizó un modelo de inducción de cirrosis con tetracloruro de carbono (CCl_4) en rata para determinar los cambios epigenéticos que se producen con la enfermedad en el hígado completo así como el efecto a dicho nivel por la administración del hepatoprotector IFC-305, es importante comentar que este modelo, a diferencia de lo que ocurre en el humano, progresa hacia carcinoma hepatocelular con muy baja frecuencia, por lo que únicamente permite evaluar el estado cirrótico. Por otra parte, tomando en cuenta que durante la cirrosis, las células que producen la fibrosis por la acumulación de matriz extracelular son las células estelares, se utilizaron cultivos primarios de éstas células, los cuales se obtuvieron de ratas control y se estudió la activación hacia miofibroblastos, la cual ocurre espontáneamente al cultivar las células durante 7 días y se compararon las modificaciones observadas en el hígado con las halladas en los cultivos celulares.

2.1. Tratamiento de animales e inducción de cirrosis con CCl_4

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

libres y probablemente el evento inicial sea el daño a la membrana mitocondrial (Varela-Moreiras et al., 1995).

Se indujo cirrosis a ratas Wistar macho de 100-110 g a través del tratamiento crónico con CCl_4 (Figura 21). Se les administró a los animales una solución de CCl_4 (CCl_4 :aceite vegetal 1:6) por vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 0.04 g/kg de peso, tres veces por semana durante 10 semanas. Las ratas cirróticas se dividieron en tres grupos: Ratas cirróticas (CCl_4 (to)) a las que se les administró durante 10 semanas el tóxico y fueron sacrificadas 24 h después de suspendida la administración de CCl_4 ; dos grupos fueron tratados intraperitonealmente, uno con solución salina durante 5 semanas (to + 5ss) y a un segundo se le administró IFC-305 a una dosis de 50 mg/kg de peso, tres veces por semana durante 5 semanas (to + 5IFC) y se incluyó un grupo adicional de animales sin tratamiento (Control). Los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico y se recuperó el hígado, se fraccionó y congeló en nitrógeno líquido y fue preservado a -70°C . Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a las guías institucionales de uso y manejo de animales de laboratorio.

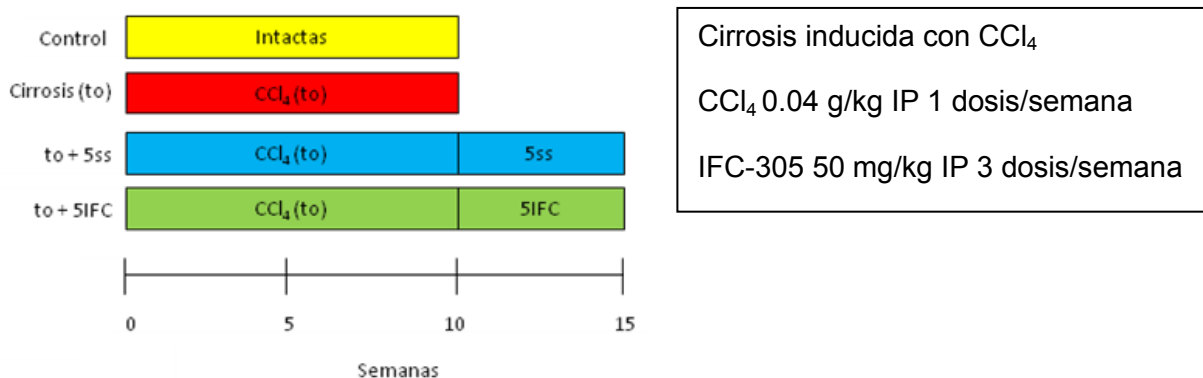







Fig. 21. Grupos experimentales para evaluar el efecto del IFC-305 en el modelo de cirrosis inducido por CCl_4 .

1.1. Aislamiento y cultivo de células estelares hepáticas

Las HSC se aislaron de ratas Wistar (>600 g de peso) a través de la digestión enzimática *in situ* con colagenasa/pronasa y un gradiente de densidad por ultracentrifugación con Accudenz® (Accurate Chemical) como se ha descrito previamente (Velasco-Loyden et al., 2010). La tabla 6 describe brevemente el procedimiento de aislamiento.

Tabla 6. Aislamiento de células estelares hepáticas de rata.

1		2		3	
	≥ 600g 0.63mg/100g peso pentobarbital		Dissección y exposición de vena porta		Inserción de cánula en vena porta
4					
		Perfusión con GBSS sin Ca ²⁺ 5 min			
		Digestión con pronasa 180 mg en GBSS-Ca 18 min Digestión con colagenasa 6 mg en GBSS-Ca 10 min			

Continuación Tabla 6. Aislamiento de células estelares hepáticas de rata.



Macerado de hígado con
DNasa 0.09ug/uL
37°C 180 rpm 10 min



Filtrado

Centrifugación a 700 rpm 1 min con DNasa, recuperar SN
Centrifugación 2500 rpm 10 min con DNasa, recuperar SN



Nicodenz 8.2%
3 mL a cada tubo

~9 mL de homogenado a cada tubo
Equilibrar tubos



Ultracentrifugación
Rotor SW40 Ti

Continuación Tabla 6. Aislamiento de células estelares hepáticas de rata.

11



12



Recuperación de HSC en medio
DMEM *Low Glucose* sin suero
Centrifugación 1800 rpm 8 min

Resuspender en 10 mL de DMEM SFB 10%
Conteo de células
Siembra

Se analizaron cuatro condiciones durante la transdiferenciación (Figura 22): 3 horas (3 h); un día (1 d), siete días (7 d) y siete días con IFC-305 (7d + IFC). Las HSC fueron cultivadas en platos de plástico con medio DMEM (Invitrogen) que contiene suero fetal bovino (SFB) al 10% (Multicell Wisent Inc.), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL. Para el caso de 7d + IFC, después de 24 h de haber sido aisladas, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM-SFB 10% con 5 mM de IFC-305 y se continuó el cultivo por 6 días más. En todos los casos los medios fueron cambiados cada tercer día.

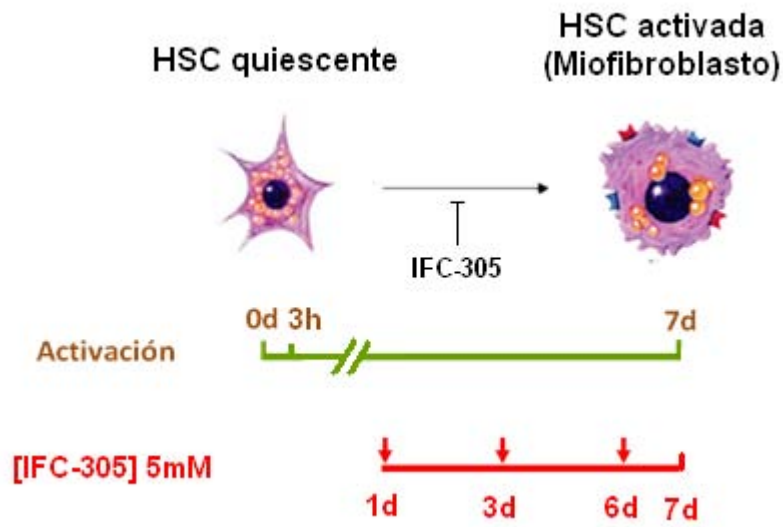
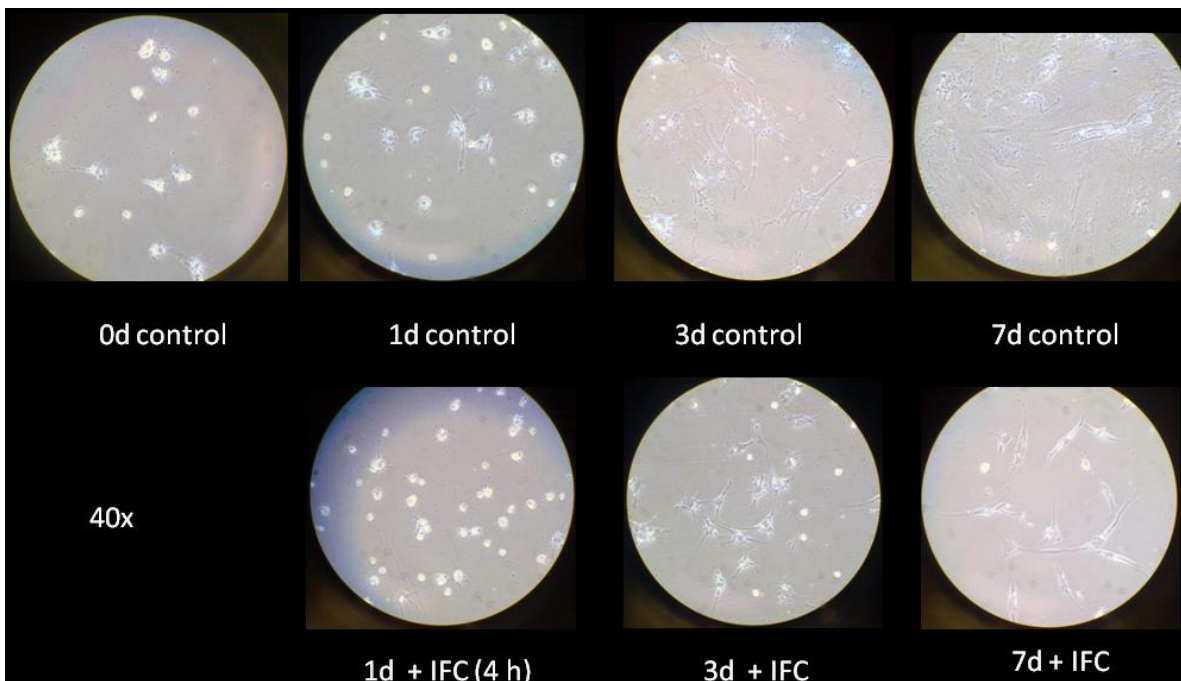


Fig. 22. Grupos experimentales para evaluar el efecto del IFC-305 en el modelo de activación de HSCs *in vitro*.

La siguiente tabla muestra el fenotipo de las HSC a lo largo del modelo estudiado.

Tabla 7. Fenotipo celular durante el modelo de activación de HSC



X. MÉTODOS

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

El ensayo en el que se basa este *kit* es la prueba inmunoabsorbente ligada a enzimas (ELISA), cuyo principio es el siguiente: Para detectar el antígeno, en éste caso la 5-metilcitosina, el anticuerpo purificado específico para el antígeno se enlaza químicamente a una enzima. Las muestras que se van a probar se colocan en recipientes de plástico a los cuales se unen de manera inespecífica; los sitios de unión residuales sobre el plástico se bloquean al añadir proteínas que no son de interés para el análisis. A continuación se añade el anticuerpo marcado a los recipientes en condiciones a las cuales se evita unión inespecífica, de modo que solo la unión al antígeno de interés haga que el anticuerpo marcado se retenga sobre la superficie. El anticuerpo marcado no unido se elimina de todos los recipientes por medio de lavado, y el anticuerpo unido se detecta por medio de una reacción colorimétrica dependiente de enzima. Este análisis permite que las placas de plástico se lean en espectrofotómetros multicanal lo que acelera el análisis (Murphy et al., 2008). En algunos casos, como en el ensayo utilizado para la determinación cuantitativa de los niveles de metilación en el DNA genómico, la enzima se une a un anticuerpo secundario, que reconocerá el anticuerpo unido al antígeno de interés.

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

Procedimiento

- **Unión del DNA al pozo**

1. Se agregaron a cada pozo 100 µg de DNA diluido en solución de unión a DNA. Se aseguró de que la solución cubriera el fondo del pozo inclinando la placa de un lado a otro. La solución de unión a DNA (sin DNA) se utilizó como blanco.
2. Se cubrió e incubó a 37°C por 60 min.
3. Se agregaron 150 µL de solución de bloqueo directamente a cada pozo.
4. Se cubrió e incubó a 37°C por 30 min.

5. Se removió el DNA y la solución de bloqueo de cada pozo.
6. Se lavó tres veces con 150 μ L de amortiguador de lavado 1x.
- **Captura de DNA metilado**
7. Se diluyó el anticuerpo de captura 1:1000 en amortiguador de lavado 1x.
8. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo de captura diluido a cada pozo.
9. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente por 60 min.
10. Se removió el anticuerpo de captura diluido del pozo.
11. Se lavó cuatro veces con 150 μ L de amortiguador de lavado 1x.
12. Se diluyó el anticuerpo de detección 1:1000 en amortiguador de lavado 1x.
13. Se agregaron 50 μ L de anticuerpo de detección diluido a cada pozo.
14. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente por 30 min.
15. Se removió el anticuerpo de detección del pozo.
16. Se lavó cinco veces con 150 μ L de amortiguador de lavado 1x.
- **Detección**
17. Se agregaron 100 μ L de solución reveladora a cada pozo.
18. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente alejado de la luz por 1-10 min. Se monitoreó la reacción por el cambio de color. La solución viró a azul.
19. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de 96 pozos.
20. Se calculó el nivel de metilación global relativa.

2. Análisis del estado de metilación de los promotores de *Pparg* y *Col1a1*

Se extrajo el DNA de acuerdo al protocolo de separación de DNA genómico de mamífero (Strauss, 2001), y se trataron por el método de conversión de DNA genómico con bisulfito de sodio (Clark et al., 2006). Brevemente, 3 mg/18 μ L de DNA genómico en agua fueron desnaturalizados a 95°C por 5 min, en seguida se enfriaron en hielo por 2 min y se incubaron con 0.3 M de NaOH a 37°C por 15 min. Para proteger de la oxidación a la solución de bisulfito de sodio a utilizar, el DNA fue tratado con una solución de hidroquinona (0.5 M). Posteriormente se adicionó el bisulfito de sodio (1.7 M, pH 5) y se incubó en oscuridad a 50°C durante toda la noche utilizando aceite mineral para evitar la evaporación de los volúmenes. Para retirar el exceso de sales el DNA se purificó con columnas Wizard (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Posteriormente el DNA purificado se trató con NaOH 0.3 M por 30 min a 37°C y se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para recuperar el DNA convertido.

Para la amplificación del DNA convertido, se diseñaron oligonucleótidos especiales (Tabla 6) para regiones de los promotores de los genes *Pparg* y *Col1a1*, estos oligos poseen la característica de hibridar específicamente con el DNA convertido (en la sustitución de las citosinas por uracilos como resultado del tratamiento). Para las PCRs se utilizó la polimerasa *Hot-Start Taq* (Qiagen).

Los productos de PCR se purificaron mediante geles de agarosa, se cortaron las bandas y posteriormente se recuperó el DNA con el kit *QiaexII Gel Extraction* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El DNA se sub-clonó en el vector pGEM T-easy® (Promega) con el que se transformaron bacterias competentes DH5α Top 10 para generar un gran número de copias del plásmido para su análisis por secuenciación Sanger de por lo menos 10 clonas independientes por cada condición de los modelos.

Tabla 6. Lista de Oligonucleótidos para el análisis del estado de metilación

Para <i>Pparg</i> Región 1	
Sentido BSPparg1-F	5'-GGTTATGGGTATTTGTTTGAGG-3'
Antisentido BSPparg1-R	5'-ATCAAAAATAACTTCTCAACCC-3'
Para <i>Pparg</i> Región 2	
Sentido BSPparg2-F	5'-GGGTTGAGAAGTTATTTTTTGAT-3'
Antisentido BSPparg2-R	5'-TAAAAAAACCTAAAATAACTCCAC-3'
Para <i>Col1a1</i>	
Sentido BSCol1a1FP2-F	5'-GAGGGT TTAGTT ATATTTAGTGAT-3'
Antisentido BSCol1a1FP2-R	5'-CAAACCTCCACTTCTAAAATCTAC-3'

3. Dot blot de DNA

A partir de DNA genómico de los diferentes tratamientos del modelo de cirrosis estudiado, se evaluará mediante la técnica de dotblot la presencia de 5hMeC a lo largo del modelo, así como el efecto de IFC-305 sobre dicha marca.

Se cargaron 400 ng de DNA genómico sonicado proveniente del tejido hepático del modelo de CCl₄, así como una muestra de DNA genómico de cerebro de ratón (control + para 5hmC) y DNA plasmídico (control – para 5hmC) en una membrana HybondN⁺ (GE Healthcare). Posteriormente, el DNA se fijó a la membrana mediante su exposición a la luz UV en el equipo Stratalinker 1800 (Stratagene). La membrana se bloqueó con leche al 5% en PBS-tween al 0.1% a temperatura ambiente durante 2 h, en seguida se incubó durante toda la noche con anti-5hmC (Active Motif 39769) a una dilución de 1:10000 con leche al 5% en PBS-tween 0.1%. Transcurrida la incubación la membrana se lavó con PBS-tween 0.1% y se incubó con anti-conejo-HRP 1:20,000 (Santa Cruz Biotechnology) en PBS-tween 0.1% durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se lavó la membrana con PBS-tween 0.1% y se reveló utilizando el sustrato *SuperSignal West Pico* (Thermo Scientific) y su exposición a películas fotosensibles.

4. Western blot de histonas

Se prepararán manualmente homogenados de tejido de los diferentes estados del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ utilizando soluciones con diferente concentración de glucosa para separar los núcleos del resto de compartimientos celulares.

Brevemente, se homogenizaron 14 g de hígado en 28 mL de solución B (HEPES 10 mM, MgCl₂ 5mM y KCl 25 mM), se filtra el homogenado en una gasa, se lleva a 42 mL con solución B, se agregaron 4.9 mL de solución C (HEPES 10 mM, MgCl₂ 2 mM, sacarosa 2.4 M) y se adicionan 90 mL de solución D (HEPES 10 mM, MgCl₂ 2 mM, sacarosa, 2.3 M) y se mezcla por inversión. En seguida se colocan 7.5 mL de la solución D en tubos para ultracentrífuga y se adicionan 7.5 mL del homogenado. Se centrifuga a 24,200 rpm por 30 min a 4°C en el rotor SW-28, se recupera el botón y se resuspende vigorosamente en solución A (HEPES 10 mM, MgCl₂ 2 mM, sacarosa 0.25 M) en proporción 1:1. En seguida se centrifuga a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C en el rotor SS-34 y el botón se resuspende en el mínimo volumen de solución A.

Se determinó la concentración de proteínas nucleares por el método de Bradford (Bio-Rad®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se realizaron alícuotas de las muestras. Se adicionó amortiguador de muestra Laemmli (concentración final: Tris 6.25 mM, pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 1.25%, azul de bromofenol 0.1%) a las muestras para realizar la electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrada de PVDF, para el western blot se incubó la membrana con anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C seguida de una incubación con anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano por 2 h a temperatura ambiente. La detección se realizó utilizando el sustrato West Femto (Thermo Scientific®) y se reveló en placas fotográficas. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-H4 hiperacetilada (1:1000, Millipore) y anti-H4 (1:1000 Millipore). El hospedero para todos los anticuerpos es conejo. El anticuerpo secundario será anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology).

5. Inmunofluorescencia

Las HSC se aislaron como se describió en párrafos arriba y se cultivaron para el proceso de activación en medio con o sin IFC-305 en placas de 12 pozos donde se colocaron cubreobjetos de 18 mm de diámetro. Una vez transcurridos los diferentes tiempos de cultivo (3 h, 1 d, 7 d y 7d +IFC) los cubreobjetos con las HSC adheridas se lavaron 3 veces con PBS 1x, después se fijaron con paraformaldehído 4% durante 5 min, se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS 1x y subsecuentemente se incubaron en solución de bloqueo (tritón X-100 1% y BSA 1% en PBS 1x) por 20 min. Para eliminar el tritón se lavó 1 vez con solución de bloqueo (sin tritón) (1% de BSA en PBS 1x). Las células se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo para anti-H4 hiperacetilada (1:400, Millipore 06946) y en PBS 1x para anti-5hmC (1:400, Active Motif 39769). A la mañana siguiente se incubaron por 1 h a temperatura ambiente y una vez más se realizaron 3 lavados con PBS 1x y en seguida se incubó con anticuerpo secundario (1:400, anti-conejo Alexa-fluor Invitrogen) en solución de bloqueo o PBS 1x de acuerdo con el anticuerpo primario. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS 1x y se montaron los cubreobjetos redondos en cubreobjetos rectangulares con 15 µL de medio de montaje para fluorescencia con DAPI (Vectashield H-1200)

6. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Para determinar las modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas a cromatina transcricionalmente activa o inactiva presentes en los promotores de los genes estudiados así como la determinación de la deposición de PPAR γ en el promotor de *Col1a1* se realizó el ensayo de ChIP con 200 mg de tejido del modelo de cirrosis inducida con CCl₄, el tejido congelado se fragmentó en trozos muy pequeños y se entrecruzó con formaldehído al 1% en agitación durante 10 min, en seguida se detuvo el entrecruzamiento agregando glicina 125 mM y nuevamente se incubó en agitación por 10 min. El tejido se lisó con un amortiguador con SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM e inhibidores de proteasas y se homogenizó en tubos Potter estériles en hielo. Posteriormente se sonicaron hasta obtener fragmentos de 500 a 800 pb (este intervalo es corroborado por electroforesis en gel de agarosa al 1%), en seguida se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford y se realizó una electroforesis de proteínas para corroborar la cuantificación y utilizar 800 μ g de proteína por cada inmunoprecipitación. Las muestras se diluyen 5 veces en la solución de dilución (Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tris-HCl 20 mM pH 8 con inhibidores de proteasas). Con el fin de reducir el ruido de fondo, la cromatina se incubó con perlas de agarosa acopladas a la proteína A y G (GE Health care) previamente bloqueadas en solución de dilución con BSA 0.5% y 100 mg/mL de DNA de esperma de salmón por 12 h a 4°C; se removieron las perlas y la muestra se dividió en volúmenes equivalentes a 800 μ g de proteínas y se incubó con 4 μ g del anticuerpo de interés (anti-H4 hiperactilada Millipore® 06946, anti-H3K27me3 Abcam® AB6002 y anti-PPAR γ Abcam 41928) a 4°C en un agitador giratorio durante toda la noche. Posteriormente se agregaron 30 μ L de perlas de agarosa acopladas a proteína A y G bloqueadas y se incubó por 2 h a 4°C. Se recuperaron las perlas y se lavaron 4 veces con solución de lavado (Tritón X-100 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tris-HCl 20 mM pH 8 con inhibidores de proteasas) y posteriormente un lavado con solución de lavado final (Tritón X-100 1%, SDS 0.1%, NaCl 500 mM, EDTA 2 mM pH 8, Tris-HCl 20 mM pH 8 con inhibidores de proteasas). Posteriormente las perlas se incubaron en un agitador rotatorio con solución de elución (SDS 1% y NaHCO₃ 100 mM), se recuperó la fracción soluble y se repitió el proceso con solución de elución, posteriormente se juntaron las fracciones solubles de cada condición y se agregaron 12 μ L de solución para revertir el entrecruzamiento (NaCl 2 M, Tris-HCl 0.4 M pH 7.5, EDTA 0.1 M pH 8 y RNasa 10 μ g) y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente se agregaron 20 μ g de proteinasa K y se incubó a 65°C toda la noche.

El DNA inmunoprecipitado se purificó con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se analizó por qPCR. Para este propósito se utilizaron los oligonucleótidos descritos por el grupo de Mann y colaboradores (Mann et al., 2010) para el promotor de *Pparg* y los descritos por el grupo de Tsukamoto para *Col1a1* (Yavrom et al., 2005).

7. Análisis estadístico

Los valores son expresados como el promedio \pm DEM del número de experimentos realizados (indicado en cada pie de gráfico). El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de *t student* pareada. Las diferencias con un valor de *p* por debajo de 0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

XI. RESULTADOS

1. El IFC-305 previene la hipermetilación durante la activación de HSC

Para determinar el grado de metilación del DNA genómico global en el modelo de activación de HSC, en primera instancia se verificó la integridad de los DNAs genómicos recuperados cargando 3 μL de cada muestra en un gel de agarosa al 1% (Figura 23). Se observa que la integridad del DNA es adecuada ya que la banda observada se encuentra por arriba de las 12 kb y no se observa gran cantidad de fragmentos de DNA en barrido.

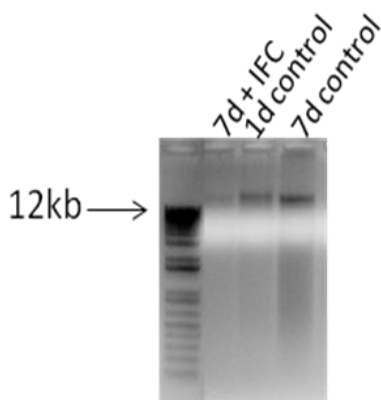


Fig. 23. Integridad de las muestras de DNA genómico utilizadas para el ensayo de cuantificación de la metilación global. Se presenta un gel representativo de las diferentes muestras del modelo de cirrosis inducida con CCl_4 . En las tres muestras se observa un barrido constituido por fragmentos de DNA menores a las 12 kb, siendo más evidente en 7 d control, sin embargo, es posible observar que la mayor cantidad del DNA se encuentra por arriba de las 12 kb, lo cual es indicativo de una integridad adecuada.

En seguida se realizó una curva de DNA metilado, a partir del estándar que proporciona el kit de ELISA utilizado y se obtuvo una pendiente de 0.004054 ng^{-1} y una ordenada al origen de 0.34043 y un coeficiente de correlación de 0.9823 (Figura 24).

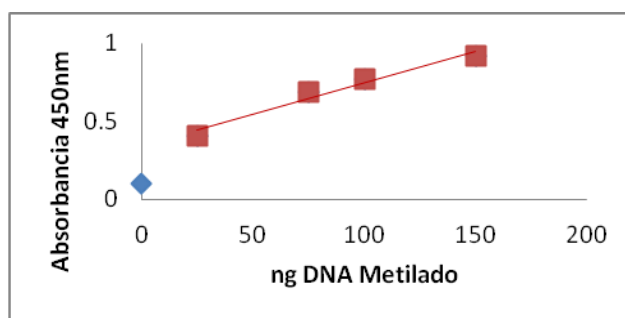


Fig. 24. Curva estándar de DNA metilado utilizada para evaluar la metilación global con el *Kit Imprint Methylated DNA Quantification*.

Los resultados (Figura 25) revelan que la activación de HSC durante 7 días (7d control) provoca un incremento en la cantidad de DNA metilado lo cual es consistente con reportes del laboratorio donde se observó la disminución de la expresión de genes

adipogénicos y el incremento de la expresión de genes profibrogénicos en HSC (Velasco-Loyden et al., 2010) y que llevarían a un fenotipo cirrótico en el contexto del tejido.

El tratamiento continuo con IFC-305 durante la activación de las HSC durante 7 días (7d + IFC) reveló una cantidad de DNA metilado muy similar a 1 d control, lo que puede sugerir que el IFC-305 mantiene la cantidad de DNA metilado de una célula quiescente, impidiendo así su activación.

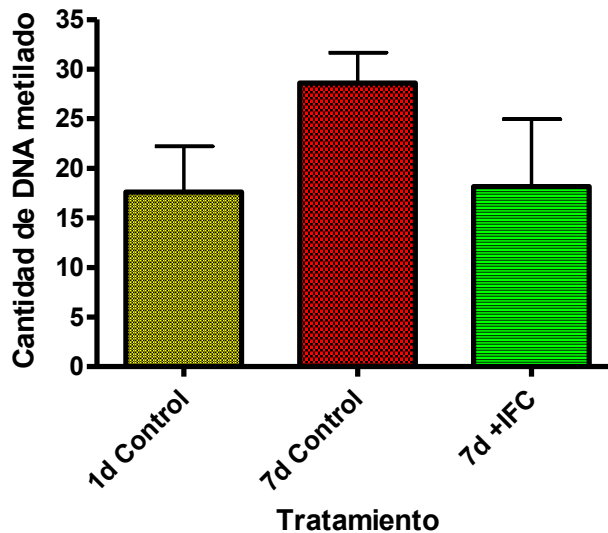


Fig. 25. Cuantificación de la metilación global de DNA genómico en el modelo de activación de HSC *in vitro*. Los datos representan el promedio \pm DEM de 3 cultivos provenientes de ratas independientes/grupo.

2. Estado de metilación de los promotores de *Pparg* y *Col1a1*

La detección de 5-metilcitosina (5mC) utilizando la conversión química de DNA con bisulfito de sodio previa a la secuenciación, fue descrita por primera vez por Frommer *et al.* en 1992 (Frommer et al., 1992) y optimizado por Clark *et al.* en 1994 (Clark et al., 1994). Desde entonces la secuenciación genómica con bisulfito se ha convertido en un estándar para el análisis de la metilación del DNA, ya que este método define el estado de metilación de cada residuo de citosina en la secuencia blanco, con una resolución de una molécula. La clave para la determinación de la metilación de DNA con el protocolo de bisulfito se basa en la selectiva reacción química del bisulfito de sodio con citosina contra residuos 5mC. La reacción es altamente específica para una sola hebra y no puede llevarse a cabo en DNA de doble cadena. La desaminación de la citosina por el bisulfito de sodio y la subsecuente PCR involucra cinco pasos críticos: desnaturalización del DNA en cadenas sencillas; reacción del bisulfito con el doble enlace 5-6 de la citosina para

originar un derivado de citosina sulfonada; desaminación hidrolítica del derivado sulfonado de citosina para originar un derivado de uracilo sulfonado; remoción del grupo sulfonato por el subsecuente tratamiento alcalino para dar origen a un uracilo; y la amplificación por PCR donde los uracilos son amplificados a timinas y las 5mC a citosinas. Para determinar la metilación con una resolución de un solo nucleótido, el producto de PCR puede ser secuenciado directamente o clonado y secuenciado. La metilación del DNA en la región diana de PCR está determinada por la citosina restante que está presente en la secuencia (Clark et al., 2006).

Para analizar la relación entre la expresión de *Pparg* y *Col1a1* y su entorno epigenético, se evaluó el estado de metilación de DNA de ambos promotores con el ensayo de conversión con bisulfito de sodio.

La región que se decidió analizar para el promotor de *Pparg* corresponde a una zona dentro de una isla CpG donde se ha encontrado interacción de proteínas de unión a DNA metilado como MeCP2 y MBD2 además de la presencia de la proteína de heterocromatina 1 (HP1 α) por el grupo de Mann y colaboradores (Mann et al., 2010) en miofibroblastos provenientes de HSC activadas. En el tejido completo (Figura 26) no se encontraron cambios de metilación a lo largo del modelo de cirrosis ni por efecto del IFC-305, en todas las condiciones analizadas la región se observa desmetilada.

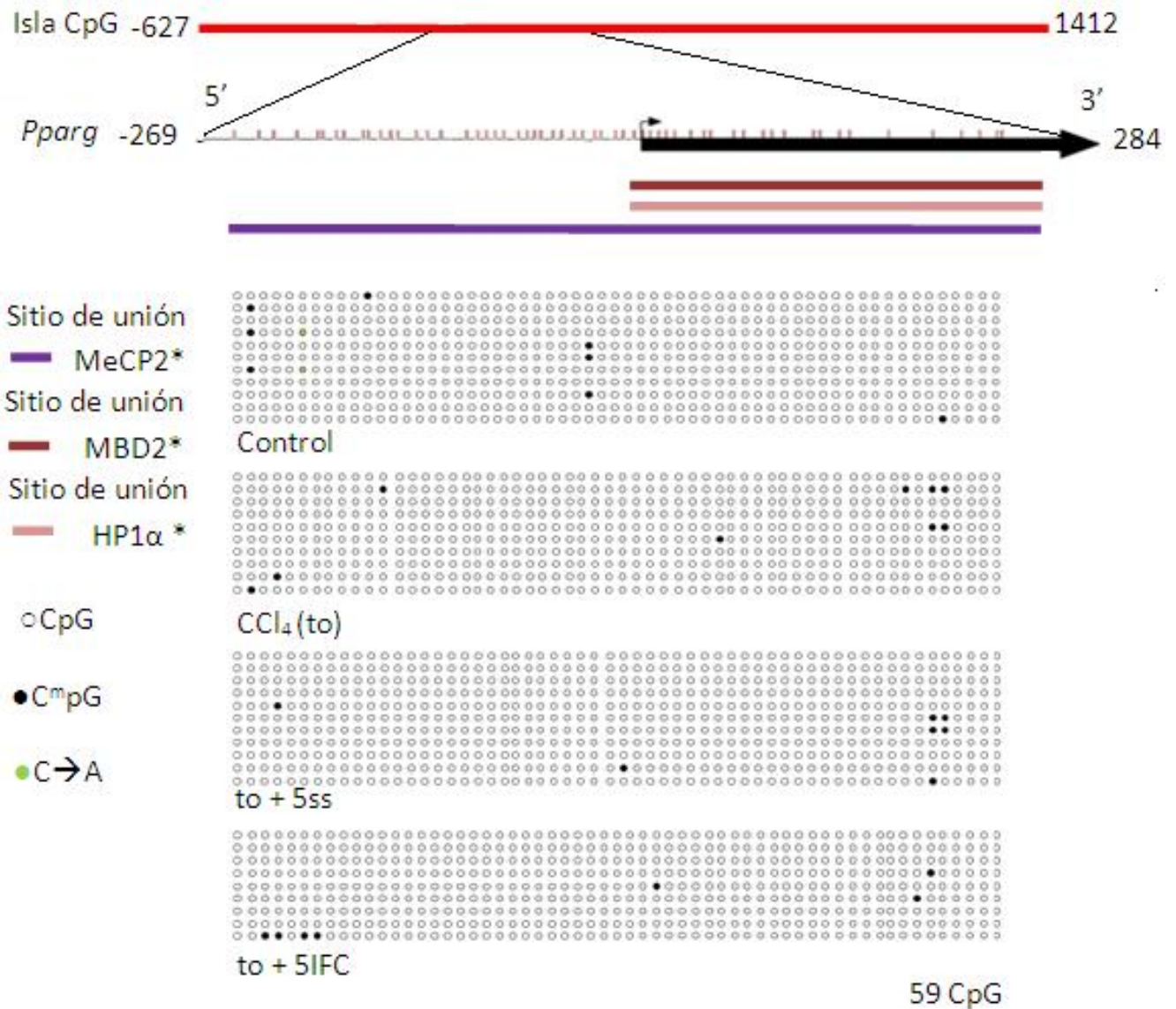


Fig. 26. Estado de metilación del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Pparg*. Dibujo esquemático de la región analizada del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Pparg* que representa el estado de metilación por medio de la técnica de bisulfito de sodio en hígados de ratas del modelo de cirrosis inducido con CCl₄. *Sitios de unión de modificadores de la cromatina en miofibroblastos. Mann J., *et al.* 2010

Considerando que la isla CpG se extiende dentro de la región codificante del gen y que la presencia de las proteínas de unión a DNA metilado así como de HP1α se extiende más allá del TSS, se decidió evaluar una región de 523 pb dentro del primer exón del gen (Figura 27) contigua a la región ya analizada. Al igual que la región río arriba, no se encontraron cambios de metilación debida a la cirrosis ni por la administración del IFC-305 y en general la zona analizada parece estar desmetilada. Al comparar la secuencia obtenida de la secuenciación Sanger y la informada en la base de datos

RatGenome Database, se encontraron cambios de base de citosina por adenina (círculos verdes en la figura 27) así como de citosina por guanina (círculos amarillos en la figura 27), sin embargo al secuenciar clonas con DNA no convertido de la misma región no se encontraron estos cambios con lo que es posible descartar la presencia de polimorfismos en las ratas evaluadas y es posible atribuirlos a una deficiente amplificación por la



polimerasa utilizada debido a la complejidad de la región estudiada.

Fig. 27. Estado de metilación de extremo 5' (segunda región) del primer exón de *Pparg*. Dibujo esquemático de la región analizada del extremo 5' del primer exón de *Pparg* que representa el estado de metilación por medio de la técnica de bisulfito de sodio en hígados de ratas del modelo de cirrosis inducido con CCl₄. *Sitios de unión de modificadores de la cromatina en miofibroblastos (Mann et al., 2010).

Ya que en el tejido hepático completo la población celular más abundante es de hepatocitos y que las HSC responsables de la generación de la fibrosis por el silenciamiento de PPAR γ , representan únicamente el 8%, es posible que los cambios de metilación en dicha región estén ocurriendo únicamente en las HSC y que estos cambios

quedarán diluidos por la gran cantidad de hepatocitos, por lo que se decidió evaluar el estado de metilación del promotor de *Pparg* en un modelo de activación de HSC *in vitro*.

Contrario a lo esperado, al analizar el estado de metilación en el promotor y en la región 5' del primer exón de *Pparg* directamente en las HSC y su proceso de activación, no se encontraron cambios debido a la transdiferenciación hacia miofibroblastos (Figura 28) ni por la suplementación del medio de cultivo con IFC-305. Se observa que la región analizada se encuentra desmetilada.

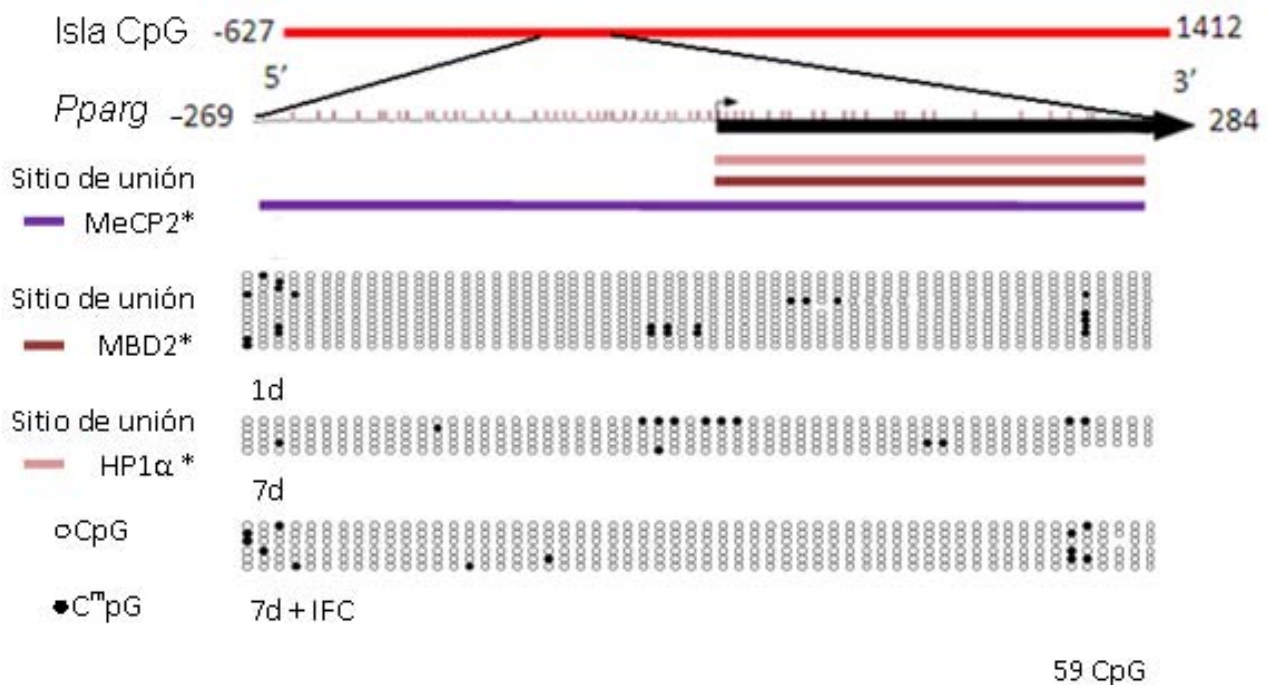


Fig. 28. Estado de metilación del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Pparg*. Dibujo esquemático de la región analizada del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Pparg*. Evaluación del estado de metilación por medio de la técnica de bisulfito de sodio y secuenciación en hígados de ratas del modelo de activación de HSC, los datos fueron obtenidos de un conjunto de DNA proveniente 3 cultivos de ratas independientes. *Se muestra los sitios de unión de modificadores de la cromatina en miofibroblastos. Mann J., et al. 2010.

Los resultados revelan que tanto a nivel de hígado completo como en la activación de HSC, el promotor del gen *Pparg* no se encuentra metilado (Figuras 26-28), lo cual no correlaciona con los niveles de expresión del mensajero hallados en el laboratorio (Perez-Carreón et al., 2010; Velasco-Loyden et al., 2010) ni con la cantidad de proteína que se encontró en el modelo de cirrosis (Rodríguez-Aguilera, 2012). Esto a su vez sugiere que

las modificaciones post-traduccionales de histonas podrían ser las responsables de las variaciones de la expresión en dicho gen.

En cuanto al análisis del estado de metilación del promotor de *Col1a1* (Figura 29), se obtuvieron 10 clonas para los estados control y CCl₄ (to) y 8 para to + 5ss, para el caso de to + 5IFC, se realizó una reacción adicional de poliadenilación con la enzima *Dream Taq* al producto amplificado con *Hot Star Taq*, lo cual facilitó la ligación en el vector y la posterior clonación en las células competentes, de esta forma se obtuvieron 14 clonas con este tratamiento.



Fig. 29. Estado de metilación del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Col1a1* a lo largo del modelo de cirrosis con CCl_4 . Dibujo esquemático de la región analizada del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Col1a1*. Se muestra una representación del estado de metilación por medio de la técnica de bisulfito de sodio en hígados de ratas del modelo de cirrosis inducido con CCl_4 . La estrella indica un sitio sensible a mutación en la región proximal CCAAT en FP-1, la mutación de estos tres nucleótidos resulta en la pérdida completa de la actividad del promotor comparado contra el WT. #Región proximal a -133 pb donde PPAR γ inhibe al promotor de *Col1a1*. *Basado en (Yavrom et al., 2005).

Es posible observar en la figura 29 que la 3°, 6°, 13°, y 19° CpG en dirección 5' → 3' se encuentran metiladas en el hígado control y que dicha metilación se pierde para la 3° y 19° en cirrosis mientras que para la 6° y la 13° ocurre hasta el estado to + 5ss. Por otra parte, para to + 5IFC se encontró un incremento en la metilación de las CpGs en torno al TSS.

Los porcentajes de metilación en las CpGs más dinámicas del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ se muestran en la tabla de la figura 30. Al promediar el porcentaje de metilación de dichas CpGs de cada condición del modelo, es posible observar que el comportamiento del estado de metilación en el promotor de *Col1a1* disminuye en el estado cirrótico y esta disminución continua a pesar de que se suspenda la administración del CCl₄, mientras que el tratamiento con el hepatoprotector IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis recupera un estado de metilación similar al del hígado control (Figura 30).

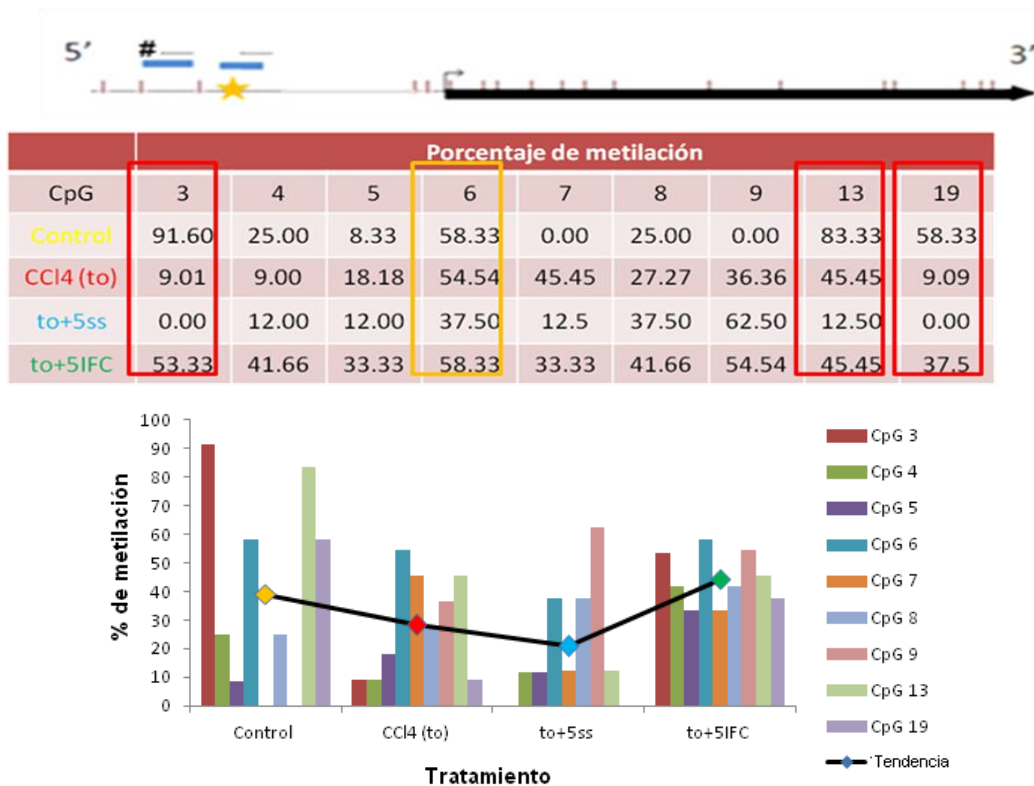


Fig. 30. Porcentaje de metilación de las CpGs analizadas en el promotor de *Col1a1* en el modelo de cirrosis inducida con CCl₄. Se muestra el porcentaje de metilación de las CpGs con mayor número de cambios de metilación a lo largo del modelo de estudio. La línea de tendencia se calculó promediando el porcentaje de metilación de las CpGs de cada condición.

Por su parte, los resultados con los que se cuenta hasta el momento sobre el estado de metilación en el promotor de *Col1a1* (Figura 31) muestran que las CpGs más dinámicas en el tejido completo (3°, 6°, 13° y 19°) se mantienen con una metilación estable a lo largo del proceso de activación de HSC en cultivo, sin embargo al analizar las CpGs en torno al TSS (Figura 30) es posible observar que la 4° y 8° CpGs muestran una tendencia a la desmetilación mientras que esta marca se mantiene si el medio es suplementado con IFC-305. Por otra parte, resalta que la CpG 20 gana metilación en las HSC activadas mientras que el IFC-305 previene este cambio.

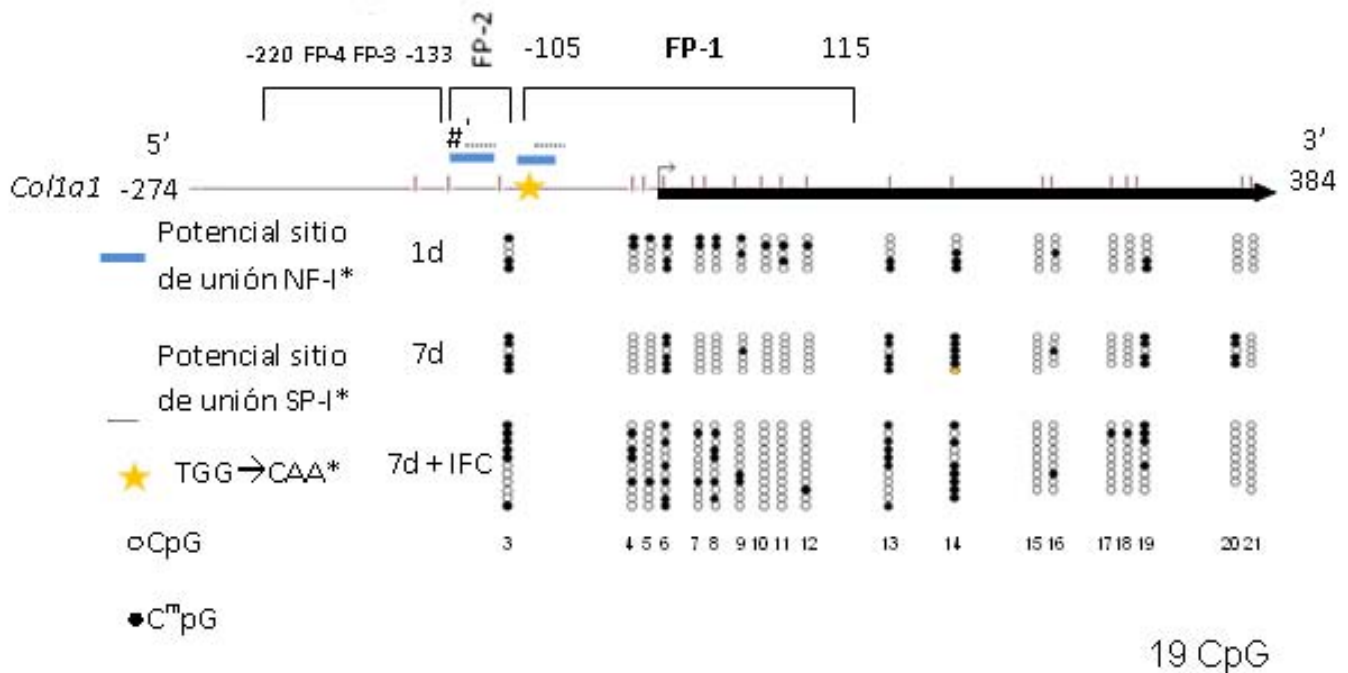


Fig. 31. Estado de metilación del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Col1a1* en el modelo de activación de HSC. Dibujo esquemático de la región analizada del promotor y del extremo 5' del primer exón de *Col1a1*. Los datos fueron obtenidos de un conjunto de DNA proveniente 3 cultivos de ratas independientes. Se presenta con una estrella el sitio de mutación en el sitio proximal CCAAT en FP-1. La mutación de estos tres nucleótidos resulta en la pérdida completa de la actividad del promotor comparado contra el WT. #Región proximal a -133pb donde PPAR γ inhibe al promotor de *Col1a1*. Modificado de *(Yavrom et al., 2005).

3. El IFC-305 evita la pérdida global de 5hmC en el hígado de ratas cirróticas

Utilizando la técnica de extracción de DNA genómico siguiendo el protocolo de Strauss, 2001, se obtuvieron muestras de DNA con una integridad adecuada (Figura 32), pureza adecuada con una relación 260/280nm superior a 1.8, así como una concentración de DNA entre 1800-4800 ng/ μ L.

Para verificar la integridad de las muestras a utilizar, se cargaron 3 μL de cada una en un gel de agarosa al 1% y se realizó la electroforesis, la mayoría de las muestras presentó una integridad adecuada al encontrarse la mayor parte del DNA en la parte superior del gel (Figura 32), las muestras con una integridad no adecuada como la tercera de la condición CCl_4 (to) de la figura 32 se descartaron para este estudio.

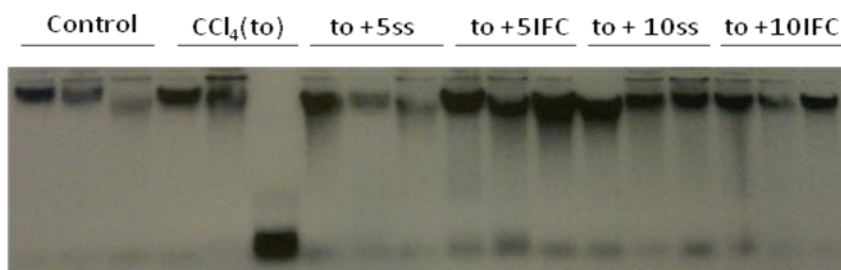


Fig. 32. Análisis de la integridad de las muestras de DNA genómico del modelo de cirrosis inducida con CCl_4 . Se muestra un gel de agarosa al 1% representativo de las muestras de DNA evaluadas.

Para favorecer la correcta interacción del anticuerpo anti-5hmC a utilizar, se prepararon diluciones de 100 ng/ μL de DNA genómico y se sonicaron con dos pulsos de 15s con una amplitud de 15%. 5 μL de cada dilución se cargaron en un gel de agarosa al 1% (Figura 33).

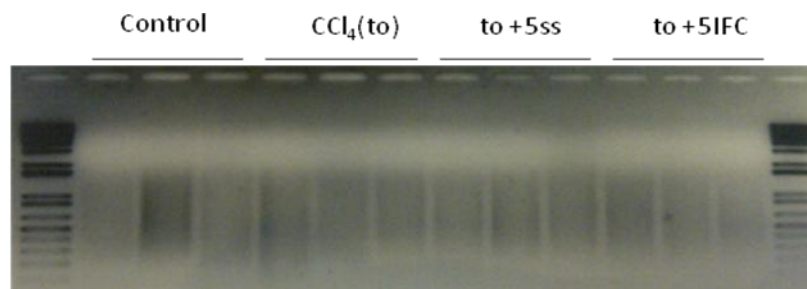


Fig. 33. Fragmentos de DNA después de sonicar. Se muestra un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA utilizadas para el ensayo de dot blot. Se observa que se obtuvo una población heterogénea de fragmentos de DNA que van desde los 200 pb hasta las 5000 pb, lo cual facilitará la reacción antígeno-anticuerpo.

Se realizaron ensayos de dot blot que revelaron que durante el estado cirrótico hay una disminución de 5hmC mientras que con el tratamiento con IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis hay una aparente recuperación de los niveles de dicha marca (Figura 34). El comportamiento de 5hmC correlaciona con el incremento de 5mC por efecto del IFC-305 (Rodríguez-Aguilera, 2012), esto es posible porque ambas

determinaciones son en un contexto global y este enriquecimiento puede presentarse en diferentes regiones del genoma.

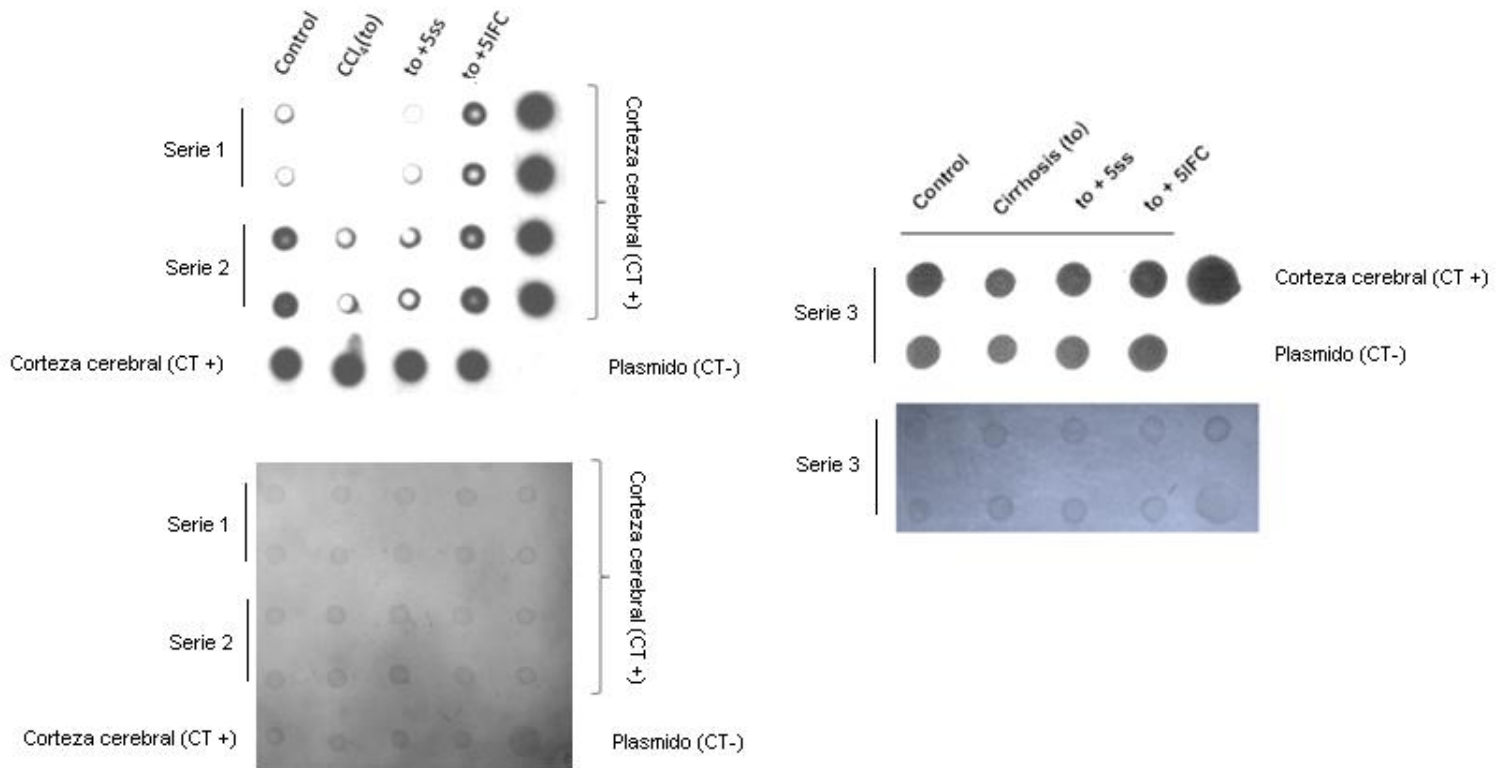


Fig. 34. Análisis cronológico de la 5hmC a través del modelo de cirrosis inducida con CCl_4 . Se muestran dos películas fotográficas con tres series DNA genómico de hígado de 3 ratas independientes, cargadas por duplicado, sobre la membrana Hybond. Se utilizaron 400 ng de DNA genómico del modelo así como de corteza cerebral de ratón como control positivo y de plásmido libre de 5hmC como control negativo. Debajo de cada película se muestra la membrana teñida con azul de metileno que tiñe el DNA y funciona como control de carga en este ensayo.

4. El IFC-305 evita el incremento de 5hmC global durante la activación de HCS

5. Considerando que durante el proceso de activación de HSC se encontró un incremento en la metilación global del DNAG y que se observó una clara tendencia a mantener un grado de metilación similar al de las células quiescentes por la presencia del IFC-305 en los medios de cultivo, se decidió estudiar de manera global la cantidad de 5hmC en este modelo. Los ensayos de inmunofluorescencia con los que se cuenta a la fecha (Figura 35) muestran una comportamiento de 5hmC similar al descrito por la 5mC, es decir, durante la activación hay una ganancia de la marca desde el día 1 de cultivo hasta el día 7 mientras que la

presencia del hepatoprotector mantiene la cantidad de 5hmC en un nivel equivalente al de las células de 1 día de cultivo.

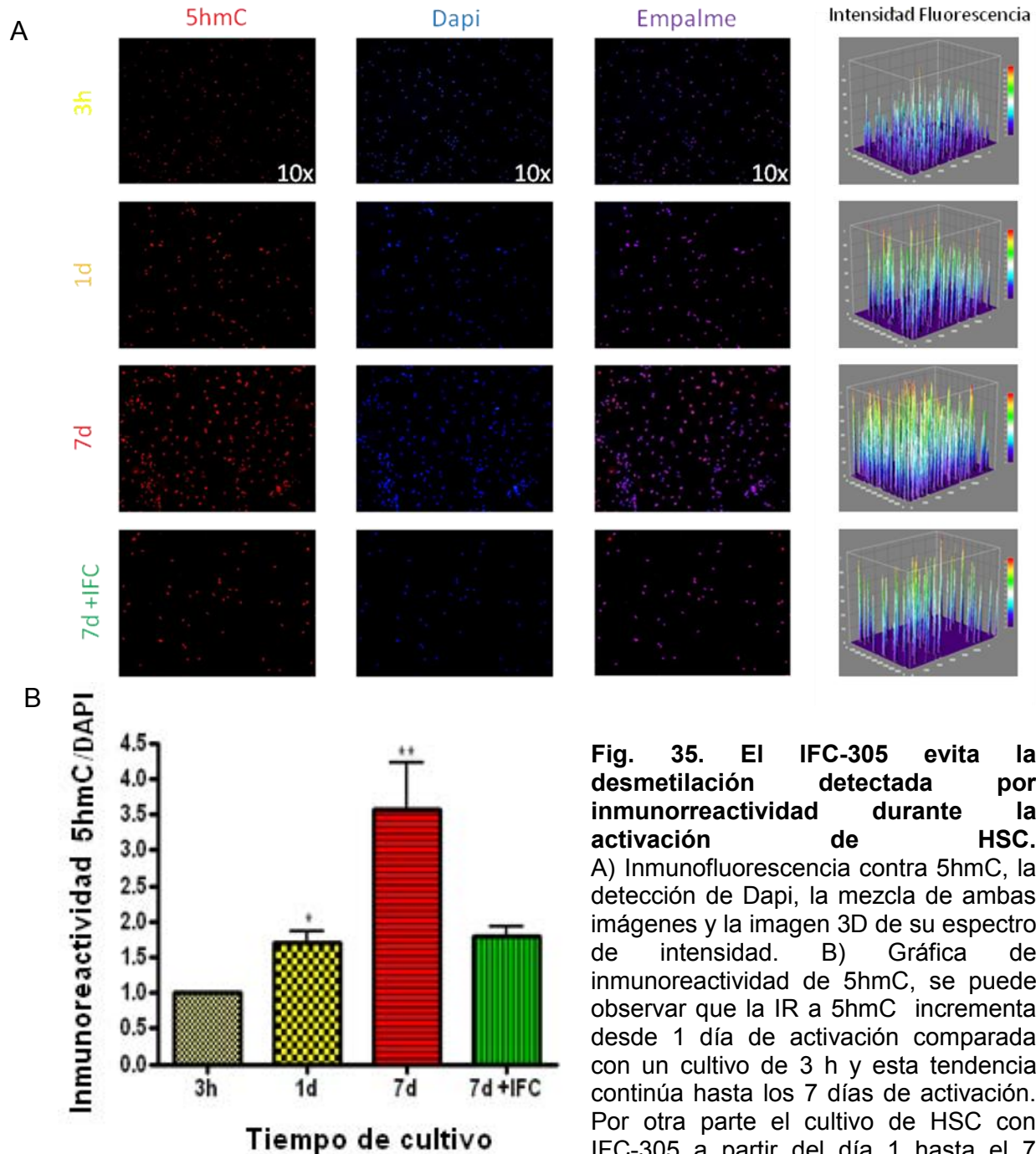


Fig. 35. El IFC-305 evita la desmetilación detectada por inmunoreactividad durante la activación de HSC.

A) Inmunofluorescencia contra 5hmC, la detección de Dapi, la mezcla de ambas imágenes y la imagen 3D de su espectro de intensidad. B) Gráfica de inmunoreactividad de 5hmC, se puede observar que la IR a 5hmC incrementa desde 1 día de activación comparada con un cultivo de 3 h y esta tendencia continúa hasta los 7 días de activación. Por otra parte el cultivo de HSC con IFC-305 a partir del día 1 hasta el 7 presenta una IR similar a 1 día de

activación. Se muestra el análisis de 3 imágenes por cada tratamiento de 2 cultivos independientes. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo 3 h.** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo 1 d.

6. La hiperacetilación de la histona H4 perdida en la cirrosis es restaurada por la administración de IFC-305

Las proteínas usualmente poseen cargas netas negativas o positivas, dependiendo de la mezcla de aminoácidos cargados que contengan. Si un campo eléctrico se aplica a una solución con moléculas de proteínas, éstas migrarán en una proporción que depende de su carga neta y de su tamaño. La aplicación más utilizada y que se basa en ésta propiedad es la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS). Se utiliza como matriz inerte un gel de poliacrilamida de poro muy pequeño a través del cual las proteínas migrarán. Las proteínas se colocan en una solución con un detergente que les confiere cargas negativas, el dodecil sulfato de sodio (SDS). Éste detergente se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas provocando la linealización de las cadenas polipeptídicas; las proteínas son liberadas de sus asociaciones con otras proteínas o lípidos y permanecen solubles en la solución con detergente. Adicionalmente se añade un agente reductor como el β -mercaptoetanol para romper los puentes disulfuro en las proteínas para que todos los polipéptidos que conforman proteínas de varias subunidades puedan analizarse independientemente (Alberts et al., 2008).

Una vez obtenidas las proteínas nucleares se realizó la cuantificación por el método de Bradford (Figura 36) y se obtuvo una pendiente de 0.00049047 mL/ μ g, una ordenada al origen de 0.38351885 y un coeficiente de correlación de 0.98455244.

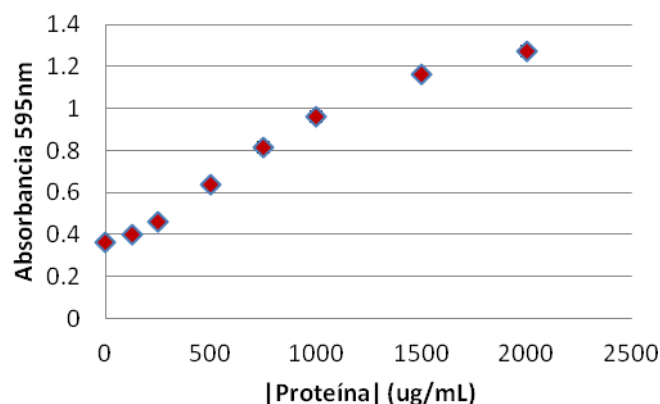


Fig. 36. Curva estándar de proteína. Se muestra el promedio de tres curvas \pm DEM

Tomando en cuenta que los tejidos de los que se obtuvieron proteínas nucleares habían sufrido algunos procesos de congelación y descongelación, se decidió verificar que las

proteínas estuvieran en buen estado; por lo que se realizó su separación mediante geles de PAGE-SDS y su posterior tinción con azul de Coomassie (Figura 37). En la figura se aprecian un número similar de proteínas en cada uno de los carriles lo que nos indica que no hubo una degradación diferencial entre tejidos de distintos tratamiento.

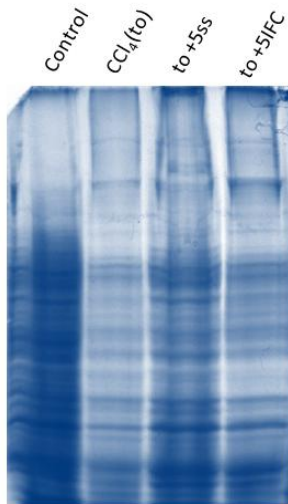


Fig. 37. Detección de las proteínas totales en gel de PAGE-SDS. La figura muestra un gel representativo de poliacrilamida-SDS al 15%, el cual se tiñó con azul de Coomassie. Se utilizaron 16 µg de proteínas nucleares.

Considerando que las histonas tienen un peso molecular bajo (10-15 kDa), para realizar el western blot se preparó un gel de SDS-PAGE al 20% para separar las proteínas de bajo peso y la transferencia se realizó a 100 V durante 30 min. Una vez transferidas las proteínas a la membrana de PVDF, se tiñó esta con rojo de Ponceau y el gel con azul de Coomassie (Figura 38).

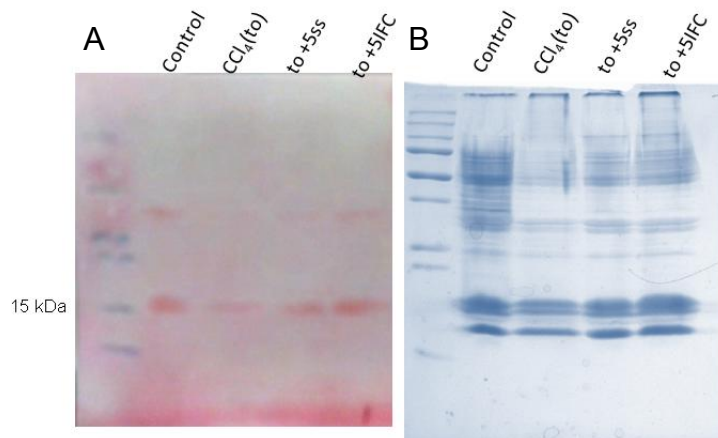


Fig. 38. Tinción de proteínas transferidas. A). Membrana de PVDF representativa de las proteínas nucleares transferidas teñida con rojo de Ponceau. B). Tinción con azul de Coomassie de las proteínas nucleares remanentes en el gel transferido.

En la Figura 38 se observa la presencia de proteínas alrededor de los 15 kDa que es la zona donde se esperarían las histonas. Por otra parte, en la tinción de proteínas

remanentes en el gel, si bien se observa una gran cantidad de proteínas de bajo peso molecular en alrededor de los 15 kDa, la mayor parte de proteínas retenidas son de alto peso molecular. Es importante comentar que se evaluó el procedimiento, transfiriendo durante 1 h y en este caso las proteínas de bajo peso molecular se transfirieron más allá de la membrana.

Con estas condiciones se procedió a realizar los western blots, en un primer momento, para la marca de hiperacetilación de la histona H4; Los resultados obtenidos de los western blots (Figura 39) muestran que durante el estado cirrótico (Cirrosis (to)) hay una pérdida de la hiperacetilación de la histona H4 mientras que el tratamiento con IFC-305 (to + 5IFC) restituye la deposición de la marca a niveles similares a los del control.

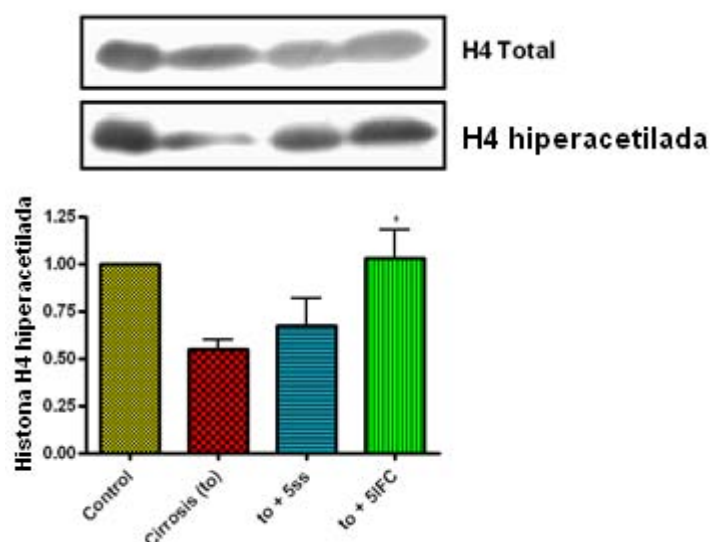


Fig. 39. La disminución en la deposición de la hiperacetilación de la histona H4 en cirrosis es contrarrestada por la administración de IFC-305. Se muestra el análisis densitométrico promedio de 3 ratas/grupo \pm DEM. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo CCl_4 (to).

7. El IFC-305 mantiene el grado de acetilación de la histona H4 control durante la activación de HSC

Una vez establecido que durante la activación de HSC hay un incremento tanto de 5mC (Figura 25) como de 5hmC (Figura 34) y que el IFC-305 mantiene un estado equivalente al quiescente en ambas marcas, se prosiguió a la evaluación de la marca de hiperacetilación de la histona H4 (Figura 40), encontrando que en las primeras horas de la activación, hay una tendencia a la disminución en la inmunoreactividad de acetilación de la histona H4 (1d) mismo que se incrementa alrededor de 7.5 veces una vez que la célula

se ha transformado a miofibroblasto (7d) mientras que si el medio es suplementado con IFC-305, la inmunoreactividad de la hiperacetilación de la histona H4 permanece en un nivel equivalente al cultivo de 3 h.

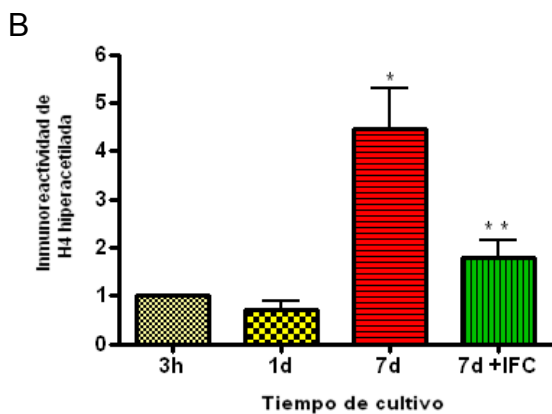
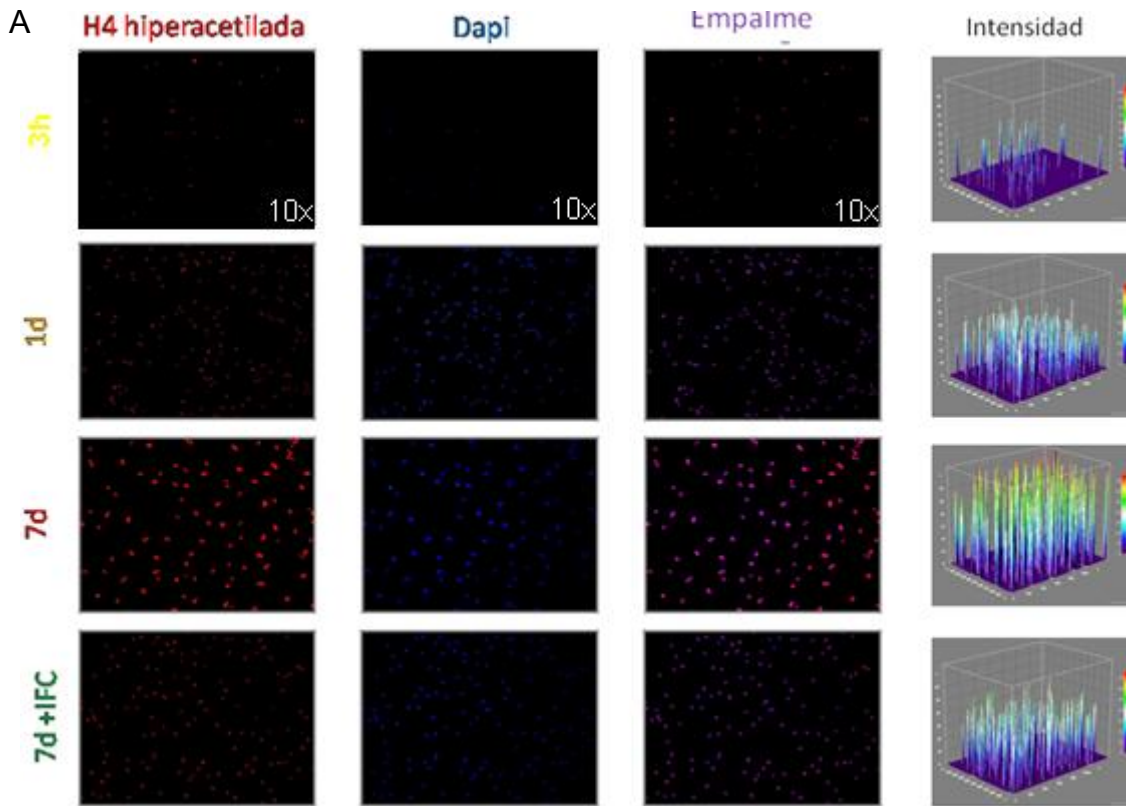


Fig. 40. El IFC-305 impide el incremento de la hiperacetilación de H4 detectada por inmunoreactividad durante la activación de HSC. A) Inmunofluorescencia contra H4 hiperacetilada, la detección de Dapi, la mezcla de ambas imágenes y la imagen 3D de su espectro de intensidad. B) Gráfica de inmunoreactividad de H4 hiperacetilada, se puede observar que la IR a H4 hiperacetilada es menor a 1 día de activación comparada con un cultivo de 3 h y que la IR incrementa a los 7 días de activación. Por otra parte el cultivo de HSC con IFC-305 a partir del día 1 hasta el 7 presenta una IR similar a 1 día de activación. Se presenta el análisis de 3 imágenes por cada tratamiento de 3 cultivos independientes. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo 1 d. ** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo 1 d y 7d.

y que la IR incrementa a los 7 días de activación. Por otra parte el cultivo de HSC con IFC-305 a partir del día 1 hasta el 7 presenta una IR similar a 1 día de activación. Se presenta el análisis de 3 imágenes por cada tratamiento de 3 cultivos independientes. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo 1 d. ** Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo 1 d y 7d.

8. El IFC-305 favorece una cromatina abierta en el promotor de *Pparg* en hígados de ratas cirróticas

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

Como se menciona en el párrafo anterior, para cuantificar el enriquecimiento o disminución de marcas de cromatina, es necesario contar con secuencias control de dichas marcas, es por esto que nos dimos a la tarea de buscar regiones de cromatina cerrada y regiones de cromatina abierta en el genoma de la rata para diseñar oligonucleótidos sobre estas secuencias o bien identificar publicaciones que describieran dichos cebadores. Para la región de cromatina transcripcionalmente inactiva nos guiamos por un artículo del grupo del Dr. Recillas (Hernandez-Hernandez et al., 2008) que describe un par de oligonucleótidos para secuencias satélite de rata, las cuales por definición están confinadas a dominios centroméricos o subteloméricos (Hernandez-Hernandez et al., 2008) y por lo tanto son regiones de DNA no codificante que deberán estar enriquecidas de marcas de cromatina cerrada; por otro lado se diseñaron oligonucleótidos sobre el

promotor del gen *Gapdh* de rata, cuya proteína se expresa de manera constitutiva y no presenta cambios a lo largo del modelo estudiado por lo que se utilizó como control de carga al evaluar la cantidad de proteínas en el modelo estudiado (Rodríguez-Aguilera, 2012).

La secuencia de la región promotora del gen *Gapdh* fue obtenida de *Rat Genome Database* (<http://rgd.mcg.edu/>), en negritas se indican los oligonucleótidos diseñados, se obtuvo la secuencia reversa y complementaria del oligo *reverse* y junto con la secuencia *forward* se mandaron sintetizar a Sigma-Aldrich.

Gapdh

5'-ggcactgcacaagaagatgcggtgtctctagaacagggaggagcagagagcaccagggagggtgcagtcctgattataggaactggatggtggggggagctgatgacgcgcgccccgctcccgcctcggctcatccagctccagctcaagggcgcagaggcctgagctacgtgcaccc**gtaaagccgcgagtagctg-3'**

Una vez recibidos los oligonucleótidos, se inició la estandarización de las condiciones para la qPCR que permitirá cuantificar la deposición de marcas de cromatina abierta o cerrada en las histonas del promotor de *Pparg*.

Se realizaron cambios al protocolo estandarizado por el Dr. Carlos Guerrero-Hernández (Comunicación Personal) el cual se utilizó para determinar cualitativamente las modificaciones post-traduccionales de histonas durante el trabajo Estudio de las Modificaciones Epigenéticas por el Hepatoprotector IFC-305 en cirrosis (Rodríguez-Aguilera, 2012), en los siguientes párrafos se describen de manera general la estandarización del protocolo utilizado.

- **Estandarización de la técnica de ChIP a partir de tejido**

Considerando que los tejidos a utilizar en estos ensayos no serían frescos sino provendrían de tejidos congelados, se decidió evaluar en una primera instancia un par de tejidos hepáticos de rata control, uno aislado en el momento de iniciar la ChIP y otro congelado en las mismas condiciones que las muestras experimentales para determinar si el congelamiento comprometía o modificaba la deposición de marcas de cromatina a analizar.

Aproximadamente 200 mg de ambos tejidos se fraccionaron en pedazos muy pequeños los cuales se colocaron inmediatamente en tubos eppendorf con PBS con inhibidores de proteasas. Se adicionó formaldehído para realizar el entrecruzamiento de las proteínas con el DNA y posteriormente la reacción se detuvo con glicina. Posteriormente los tejidos fueron homogenizados de forma manual en tubos Potter con pistilo de teflón.

Una vez homogenizados ambos tejidos se sometieron a 15 pulsos en un sonicador con 35% de amplitud y se obtuvieron fragmentos de cromatina de entre 200 – 600 pb (Figura 41).

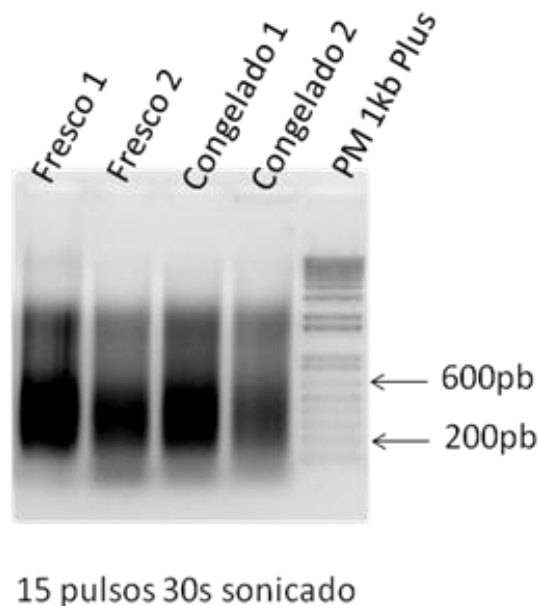


Fig. 41. Evaluación de fragmentos de cromatina. La imagen muestra un gel de agarosa al 1% donde se pueden observar los que la población de fragmentos de cromatina resultada del proceso de sonicado se encuentran principalmente entre 200-600 pb.

Se cuantificaron las proteínas de la cromatina con el método de Bradford y se verificó esta cuantificación cargando cada cromatina en un gel de SDA-PAGE al 12% junto con un control de 70 µg de proteínas (Figura 42).

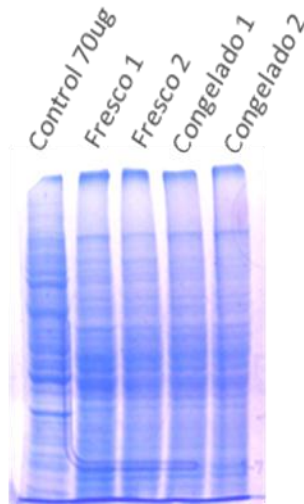


Fig. 42. Determinación de proteínas en las muestras de cromatina. Se muestra un gel de poliacrilamida – SDS al 12% donde se cargó el equivalente a 70 μg de proteínas de acuerdo a la cuantificación por Bradford de cada muestra de cromatina.

Se observa que las muestras frescas y congeladas son consistentes con la apariencia del control de 70 μg de proteínas. Ya establecido que las cromatinas contaban con las características adecuadas (Figuras 41 y 42) para realizar el ensayo de ChIP, se prosiguió el protocolo utilizando el equivalente a 800 μg de proteína por cada inmunoprecipitación.

Una vez recuperado el DNA de la ChIP, se verificó que en este nuevo material los oligonucleótidos controles para cromatina abierta (pGAPDH) respondieran a concentración de templado (Figura 43) y que se diera el enriquecimiento esperado de la histona H4 hiperacetilada (H4ac) y la ausencia de amplificado en H3K9me3 en una PCR de punto final.

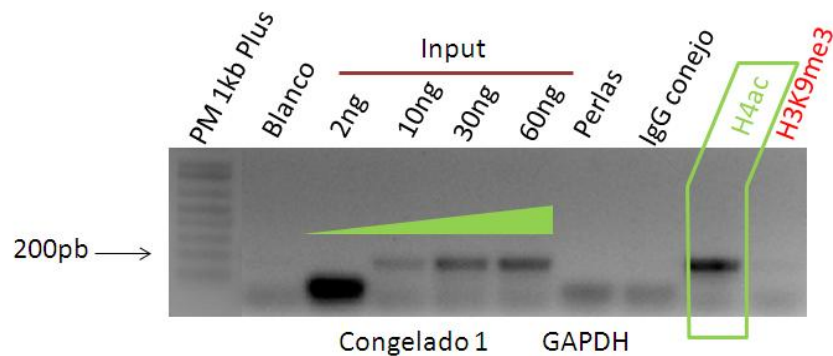


Fig. 43. Curva de amplificación en respuesta a la cantidad de templado de los oligonucleótidos pGAPDH y verificación del enriquecimiento de H4ac en esta región.

En la Figura 43 se observa una linealidad del producto de PCR dependiente de la cantidad de templado así como el enriquecimiento de la marca de hiperacetilación de la histona H4, esto es consistente con la expresión de este gen *housekeeping*.

En seguida se realizó una PCR de las muestras de CHIP recuperadas del tejido fresco y del tejido congelado con oligos para el promotor de *GAPDH* (Figura 44).

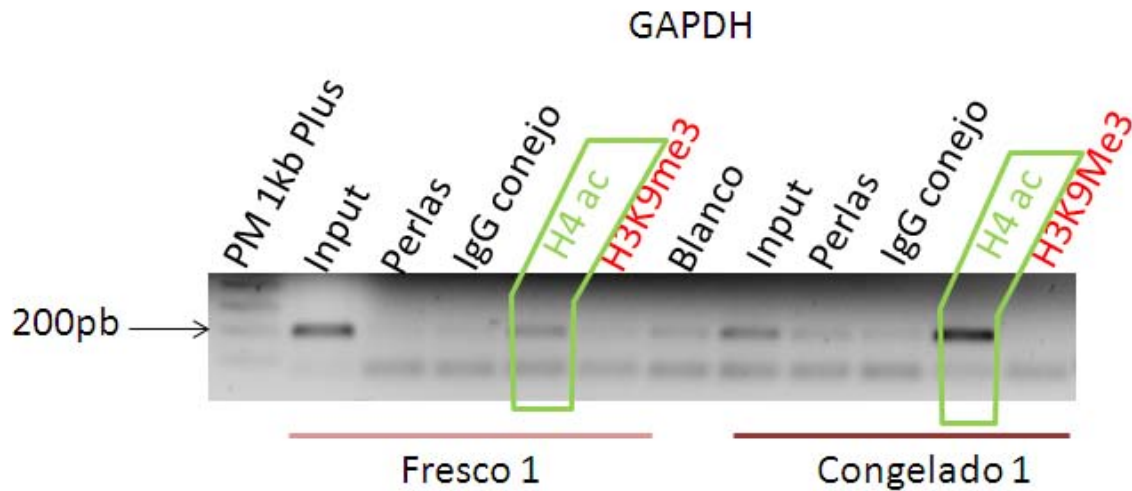


Fig. 44. Enriquecimiento de H4 hiperacetilada tejido hepático control fresco y congelado. En la imagen se muestra un gel de agarosa al 1% donde se cargaron los productos de PCR de las ChIPs de tejido fresco y congelado. Se observa enriquecimiento de la marca de hiperacetilación de la histona H4 (H4ac) tanto en el control fresco como en el congelado.

En la figura 44 se observa que la preservación a -70°C de los tejidos no compromete el resultado evaluación en la deposición de marcas de histonas, ya que entre ambos tejidos no se observa diferencias en la amplificación por PCR de punto final. De este ensayo se puede concluir que es posible realizar los ensayos de CHIP sobre muestras congeladas ya que dicho proceso no afecta la estabilidad de las marcas de histonas.

A continuación se trasladó el ensayo a PCR de tiempo real y se determinó la eficiencia de amplificación de cada oligonucleótido (*Sat*, *pGapdh* y *pPparg*).

Se realizaron diluciones seriadas a partir de un *input* (control positivo de CHIP) para obtener concentraciones de 30 10 y 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y se realizó la qPCR de la siguiente manera.

[Oligonucleótidos]: 0.5 mM
[Mg²⁺]: 3 y 4 mM
T alineamiento: 60°C
1x de SyBR Green (Invitrogen)

Se encontró que la condición donde mejor se daba la amplificación era a 3 mM de MgCl₂ por lo que se realizó una curva de *input* con más puntos (59.5, 29.75, 14.88 y 7.44 ng/μL), se realizó la qPCR con 3 mM de Mg²⁺. A continuación se presentan las curvas de disociación y los geles de agarosa 1% de los fragmentos de *Pparg*, *Satélite (Sat)* y *Gapdh*.

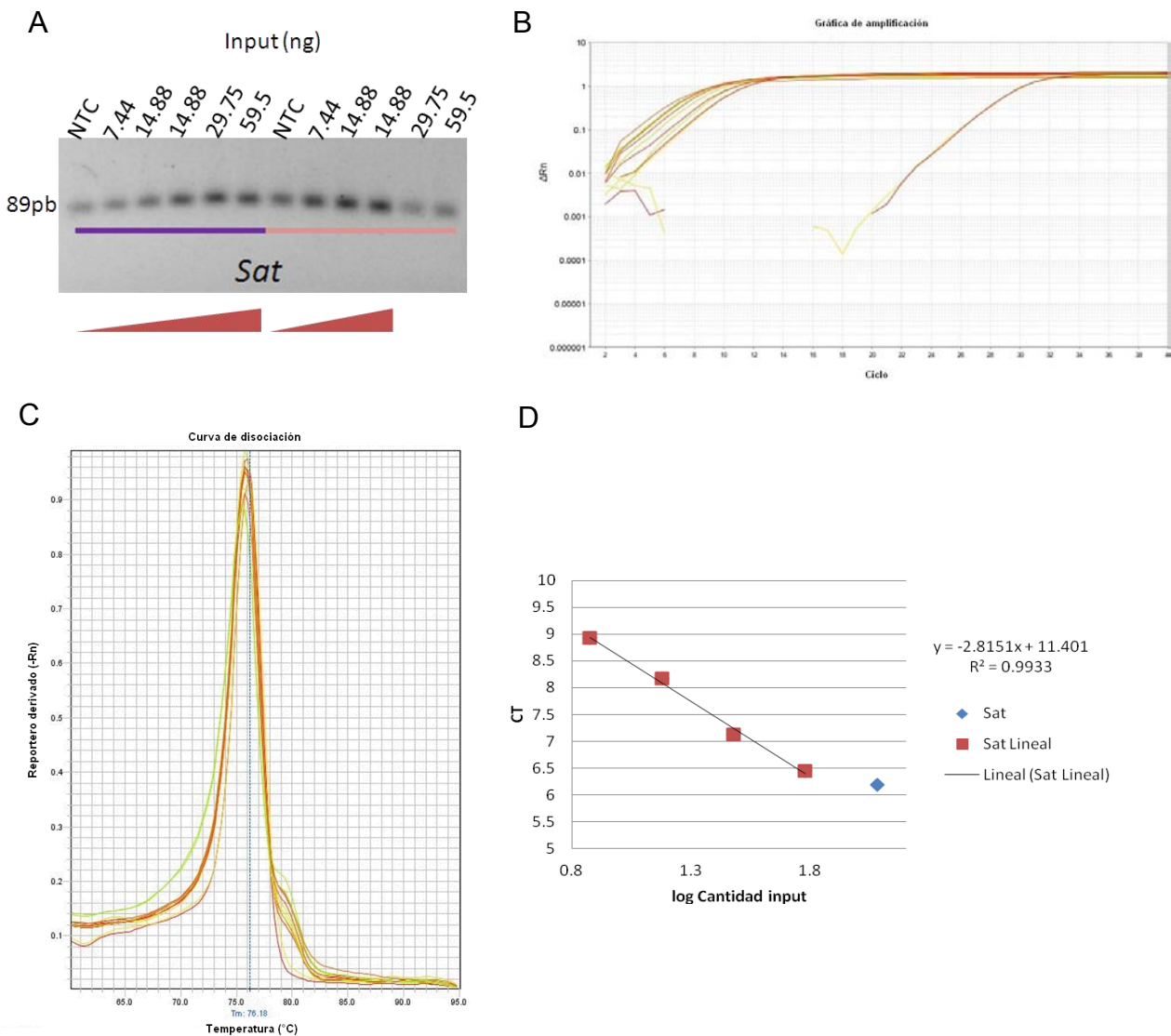


Fig. 45. Determinación de la eficiencia de oligonucleótidos de la región satelital. A) Productos de PCR. B) Gráfica de amplificación de la qPCR, C) Curva de disociación de los productos de PCR. D) Gráfica para determinar la eficiencia de amplificación.

Los productos de PCR para los oligos de la región satelital (Figura 45A) muestran una relación lineal en respuesta a la cantidad de input, en la gráfica de amplificación (Figura 45B) se observa que a menor cantidad de templado la amplificación ocurre a un CT más tardío, la curva que se encuentra a un CT de 24 corresponde al control sin templado (NTC) por lo que a pesar de haber producto no interfiere con la determinación ya que los CT de los input son a un CT mucho más temprano. En la curva de disociación (Figura 45C) se observa un solo pico lo que indica que los productos de PCR tienen la misma identidad. Al determinar la eficiencia, encontramos que esta es cercana al 100% (Figura 45D) al tener una pendiente cercana a -3.3 .

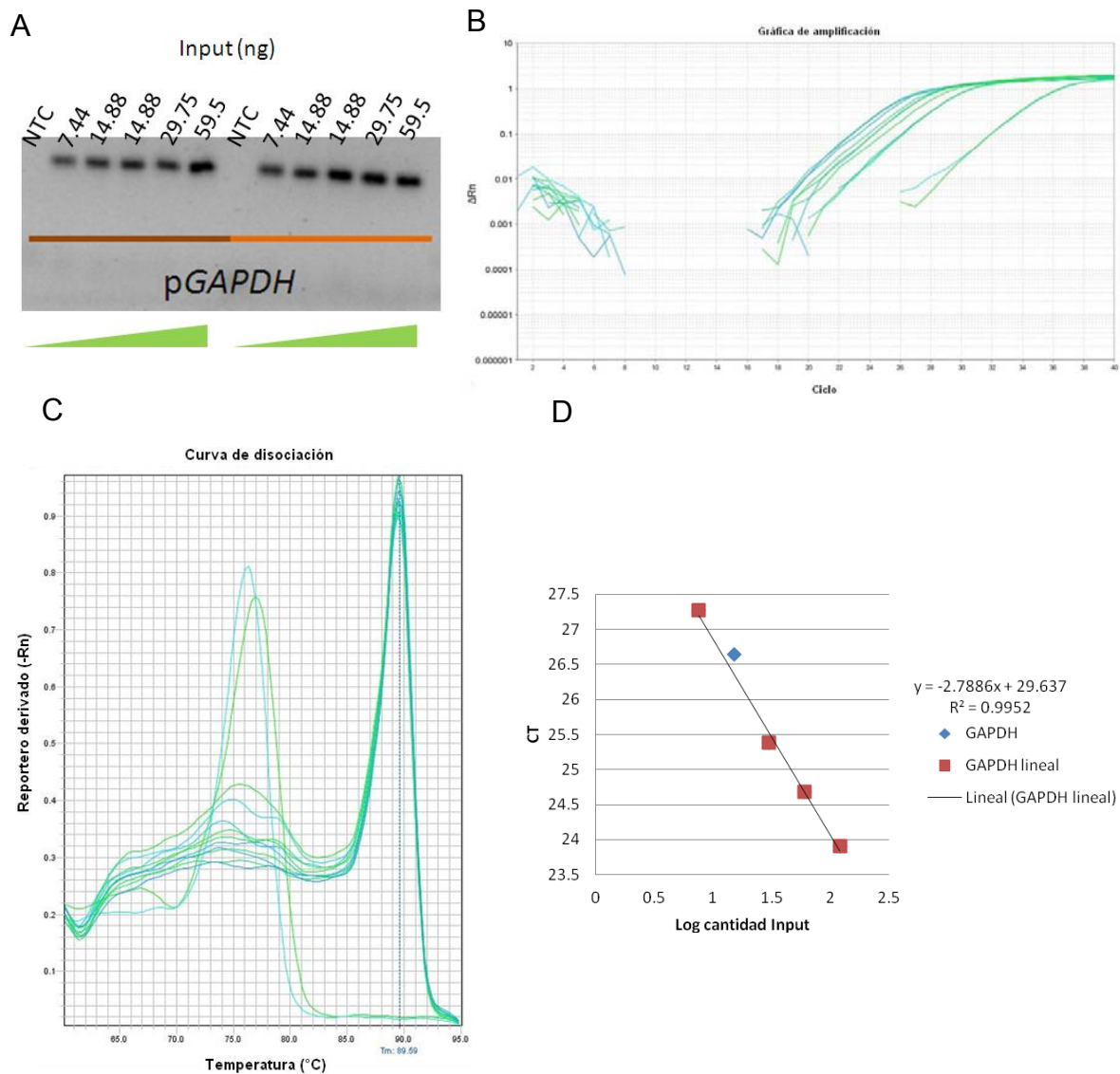


Fig. 46. Determinación de la eficiencia de oligonucleótidos de *GAPDH*. A) Productos de PCR. B) Gráfica de amplificación de la qPCR. C) Curva de disociación de los productos de PCR. D) Gráfica para determinar la eficiencia de amplificación.

Los productos de PCR para el promotor de *GAPDH* (Figura 46A) muestran una relación lineal en repuesta a la cantidad de input, en la gráfica de amplificación (Figura 46B) se observa que a menor cantidad de templado la amplificación ocurre a un CT más tardío. En la curva de disociación (Figura 46C) se observan dos picos, uno correspondiente a los productos de PCR (derecha) y un segundo que corresponde a los NTC (izquierda), ya que los NTC presentaron este pico a una temperatura de disociación muy diferente a la de los productos esperados, se considera que no interfiere en el análisis. Al determinar la eficiencia, encontramos que esta es cercana al 100% (Figura 46D).

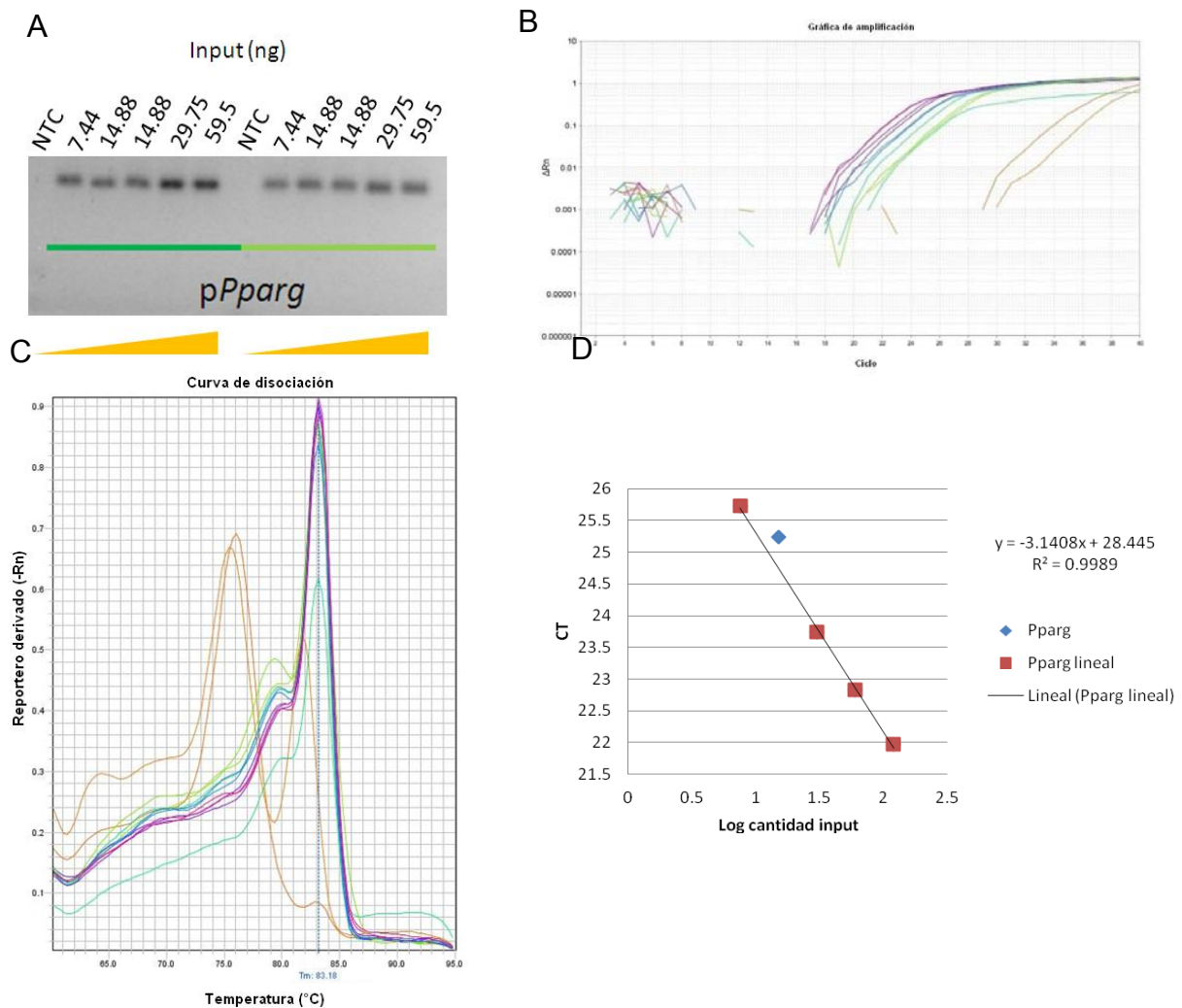


Fig. 47. Determinación de la eficiencia de oligonucleótidos de *Pparg*. A) Productos de PCR. B) Gráfica de amplificación de la qPCR. C) Curva de disociación de los productos de PCR. D) Gráfica para determinar la eficiencia de amplificación.

Los productos de PCR (Figura 47A) revelan una relación lineal en respuesta a la cantidad de input, en la gráfica de amplificación (Figura 47B) se observa que a menor cantidad de templado la amplificación ocurre a un CT más tardío, la curva que se encuentra a un CT de 34 corresponde al control sin templado (NTC) por lo que a pesar de haber producto no interfiere con la determinación ya que los CT de los input son a un CT mucho más temprano. En la curva de disociación (Figura 47C) se observan dos picos, uno correspondiente a los productos de PCR (derecha) y un segundo que corresponde a los NTC (izquierda), ya que los NTC presentaron este pico a una temperatura de disociación muy diferente a la de los productos esperados, se considera que no interfiere en el análisis. Al determinar la eficiencia, encontramos que esta es cercana al 100% (Figura 47D).

Como los oligonucleótidos presentaron una eficiencia cercana al 100%, se realizaron qPCR con los templados de la ChIP del tejido control encontrando que el promotor de *Pparg* presenta un enriquecimiento de la marca de hiperacetilación de la histona H4, al compararlo con el enriquecimiento de esta marca en la región Satelital lo cual es consistente con la expresión basal de este gen en el tejido hepático.

Una vez que se determinó que los oligonucleótidos utilizados tenían una eficiencia similar entre si, lo cual nos permitiría definir que la cantidad de producto que cada uno mostrara serían equivalentes al enriquecimiento de cada marca analizada se procedió a realizar un ensayo de ChIP para el tejido control y se observó la presencia de H4ac que es una marca de cromatina transcripcionalmente activa en la zona del promotor analizada, lo que nos hablaría de que el gen *Pparg* se expresa en el tejido hepático sano (Figura 48).

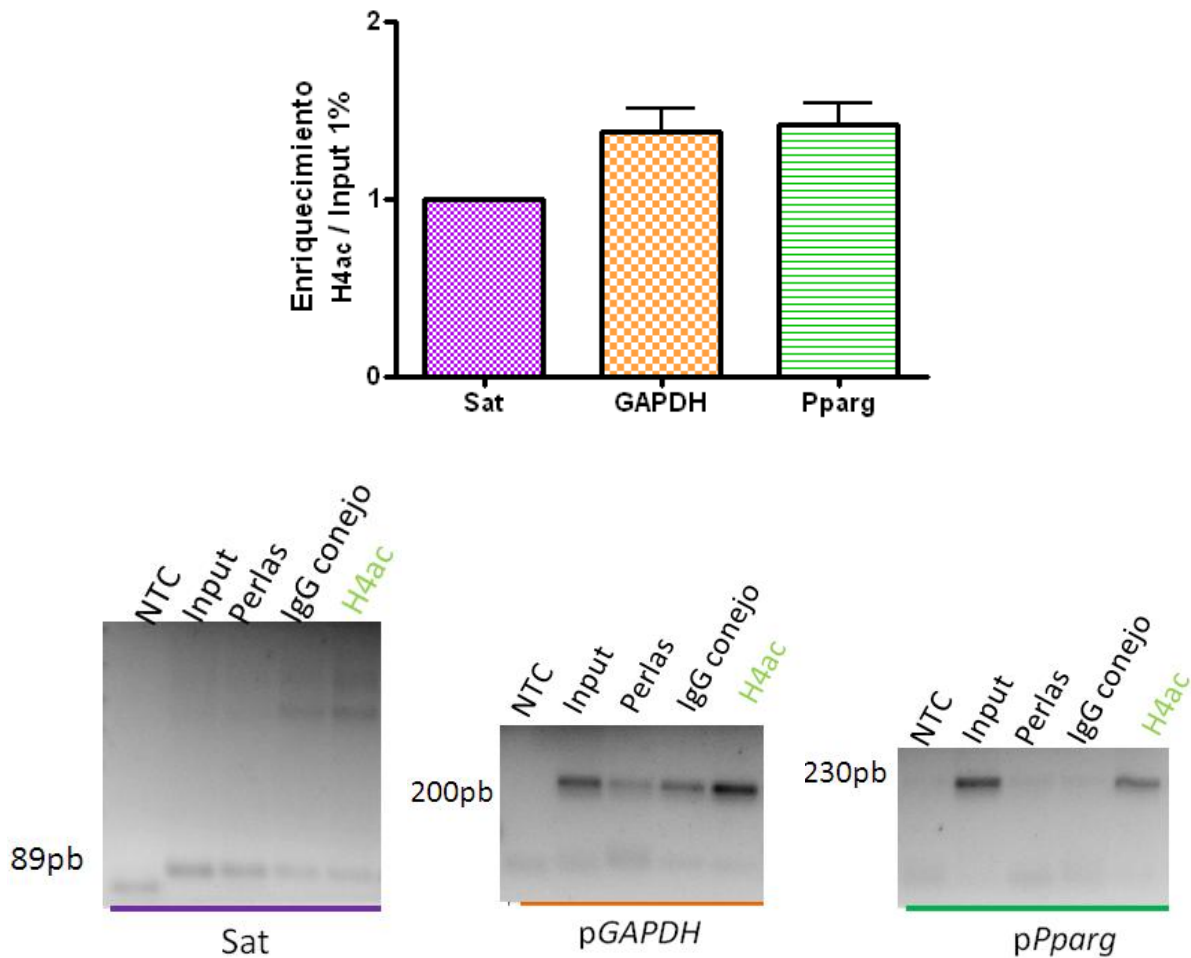


Fig. 48. El promotor del gen *Pparg* en hígado control muestra un enriquecimiento en la deposición de H4ac. En la parte inferior se muestran los productos de PCR correspondientes a cada par de oligonucleótidos.

Con las condiciones establecidas para evaluar la deposición de marcas de cromatina en el tejido hepático se procedió a su estudio en las muestras del modelo de cirrosis inducida con CCl₄. Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para cada condición.

Los resultados obtenidos hasta el momento con replicados técnicos (Figura 49) indican que durante el proceso cirrótico hay una disminución de la marca de hiperacetilación de la histona H4 en el promotor de *Pparg* lo cual podría estar relacionado con la disminución en la expresión del gen y considerando que en la misma región no se observaron cambios en el estado de metilación, es posible que los cambios observados en las PTM de histonas sean determinantes en la regulación a nivel de tejido completo para esta región del

genoma. Por otra parte, el tratamiento de ratas cirróticas con IFC-305 conlleva a la recuperación de los niveles de H4 hiperacetilada en el promotor de *Pparg*. Estos resultados son consistentes con el dato encontrado para el comportamiento global de las PTM de histonas a lo largo del modelo estudiado. Para estos ChIPs se incluyeron muestras de hígado de una rata sana a la que se le administró IFC-305 durante 10 semanas (10IFC), fue interesante encontrar que en este caso, el nivel de H4 hiperacetilada fue equivalente al de la rata control, lo cual indica que para ésta región la administración de IFC-305 no modifica el estado de la cromatina si no se tenía una alteración previamente establecida.

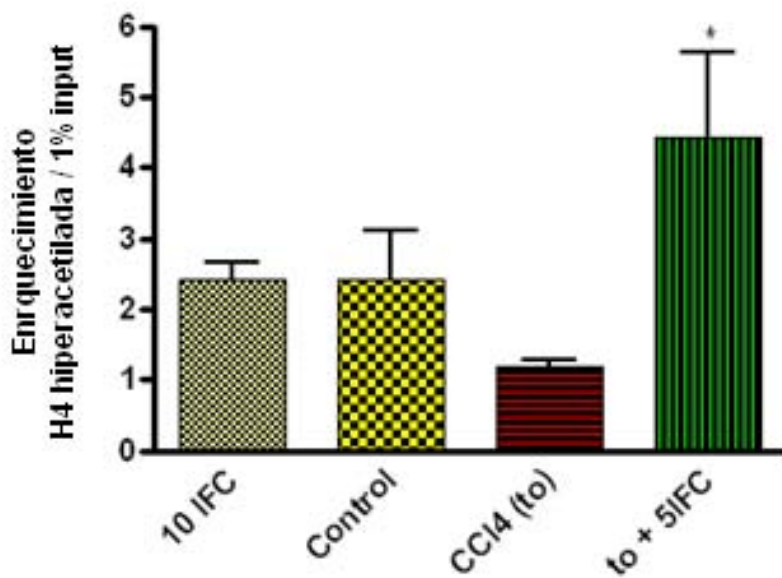


Fig. 49. Enriquecimiento de la hiperacetilación de la histona H4 por el IFC-305 en la cirrosis preestablecida. Los datos muestran el promedio \pm DEM del triplicado de un ensayo. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo cirrosis (CCl4 (to)).

Para conocer el estado de la deposición de marcas de cromatina cerrada en el promotor de *Pparg*, en un primer momento se realizaron ChIPs contra la marca de H3K9me3 misma que se ve enriquecida en esta región durante la activación de HSC de acuerdo a los reportes del grupo de Mann y colaboradores (Mann et al., 2010), sin embargo al analizar por qPCR los DNAs recuperados de las ChIPs no se encontró enriquecimiento de esta marca por arriba del que mostró el 1% del input en ningún estado del modelo. Por lo que se procedió a la evaluación de la marca depositada por el complejo Polycomb H3K27me3 y que también se ha reportado por el mismo grupo en la trasdiferenciación hacia miofibroblastos.

Los ensayos realizados hasta el momento (Figura 50) revelan que durante la cirrosis hay una disminución de la deposición de la marca de H3K27me3 comparada contra el hígado control y que esta disminución se acentúa con el tratamiento con IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de la cirrosis. A diferencia de lo que se observó al analizar la hiperacetilación de la histona H4 donde la administración del hepatoprotector en un hígado sano no generaba modificaciones en la región de *Pparg* analizada, para el caso de H3K27me3 se encontró que la administración de IFC-305 induce una tendencia a la disminución en la deposición de la marca en un hígado sano.

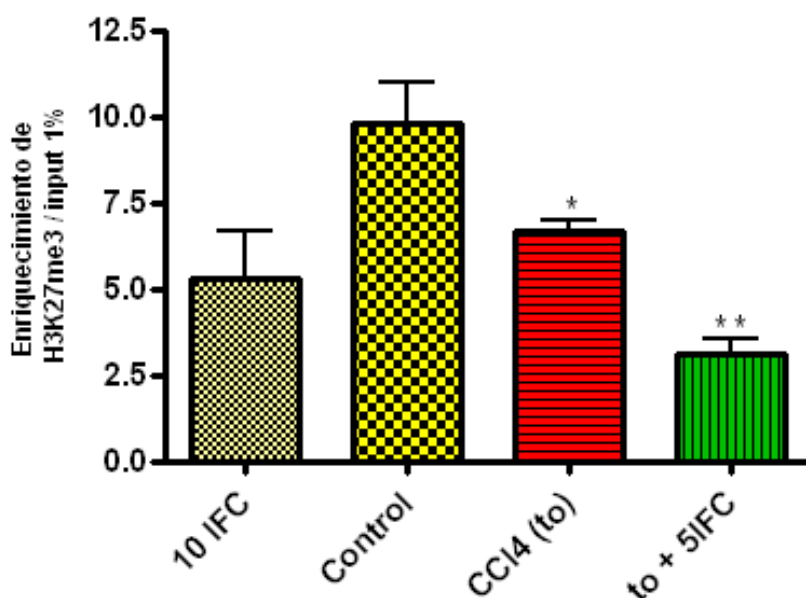


Fig. 50. Disminución de la deposición de H3K27me3 por el IFC-305 en la cirrosis preestablecida. Los datos se presentan como el promedio \pm DEM de un ensayo por triplicado. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo control. **Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo cirrosis (CCl₄(to)).

Al revisar la relación entre los valores obtenidos de H4 hiperacetilada y H3K27me3 (Figura 51), se encontró que durante el estado cirrótico la cromatina en torno al promotor de *Pparg* se encuentra más compacta que si se compara contra el hígado control, mientras que el tratamiento con el hepatoprotector IFC-305 genera una cromatina menos compacta incluso que en el hígado control lo cual correlaciona con la sobre expresión tanto de mensajero como de la proteína del receptor nuclear (Figura 18).

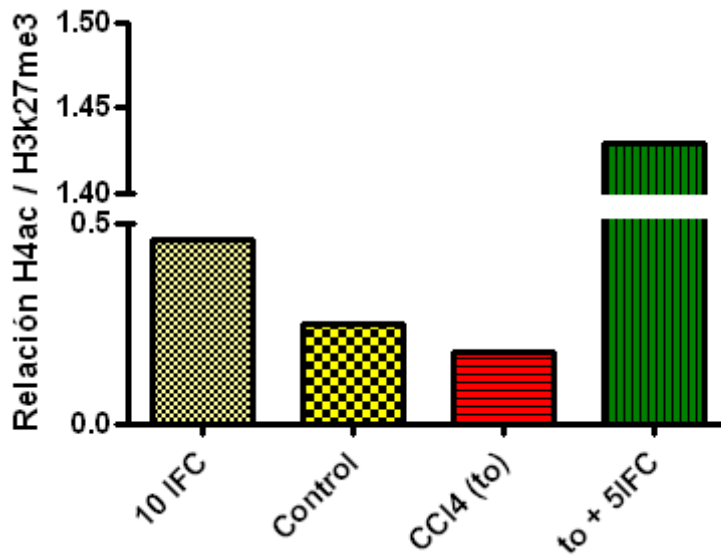


Fig. 51. Cronología del estado cromatínico del promotor de *Pparg* a lo largo del modelo de cirrosis inducido con CCl_4 .

9. El IFC-305 favorece el reclutamiento de PPAR γ al promotor de *Col1a1* para reprimir su expresión en la cirrosis preestablecida

De manera análoga a la estandarización realizada para los oligonucleótidos de la región satelital y los promotores de *GAPDH*, y *Pparg* para las marcas de histonas, se evaluó la eficiencia de oligonucleótidos control positivo para una región de unión de PPAR γ que corresponde al promotor de *ap2* que contiene un elemento de respuesta al receptor nuclear. Como control negativo a la deposición de PPAR γ se utilizaron los oligonucleótidos para la región del promotor de *GAPDH* usados en el ensayo de evaluación de PTM de histonas en el promotor de *Pparg* y para el estudio de la interacción de PPAR γ en el promotor de *Col1a1* se analizó la región descrita por el grupo de Tsukamoto donde PPAR γ reprime la expresión de *Col1a1* (Yavrom et al., 2005): Tanto los oligos de *ap2* PPRE como el del promotor de *Col1a1* utilizados para este ensayo de ChIP fueron tomados de (Yavrom et al., 2005).

Los resultados obtenidos hasta el momento con réplicas técnicas (Figura 52) muestran que durante la cirrosis hay una tendencia a la disminución del reclutamiento de PPAR γ en el promotor de *Col1a1* y que la administración de IFC-305 a ratas durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis enriquece en 4 veces la deposición del receptor nuclear en la región analizada. Por otra parte, es interesante que este efecto se observa únicamente si la cirrosis esta presente ya que en el grupo sano al que se trató con IFC-305 no hay una diferencia significativa comparada contra el control.

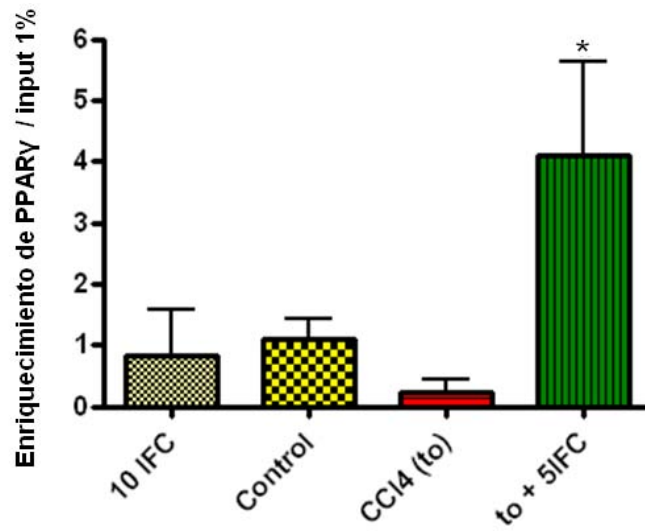


Fig. 52. Enriquecimiento en la deposición de PPAR γ sobre el promotor de *Col1a1* por efecto del IFC-305 en ratas cirróticas. Los datos muestran el promedio \pm DEM del triplicado de un ensayo. *Diferencia significativa ($p < 0.05$) comparada contra el grupo cirrosis (CCl4 (to)).

XII. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo por objeto definir si el mecanismo de acción del tratamiento con IFC-305 en ratas cirróticas involucra modificaciones epigenéticas en genes desregulados en cirrosis y que el hepatoprotector vuelve a niveles similares al control a través de los cuales se podría establecer una vía de reversión de la cirrosis.

Se contaba con evidencia, a nivel de mRNA, de que éste fármaco normaliza la expresión genética de 263 genes desregulados durante el proceso cirrótico; y de que a nivel bioquímico el tratamiento con IFC-305 reduce significativamente la bilirrubina y la actividad de transaminasas en suero, incrementa significativamente el nivel de albúmina sérica en ratas cirróticas (Perez-Carreón et al., 2010) además de evitar que las HSCs se activen para desdiferenciarse a miofibroblastos (Velasco-Loyden et al., 2010). Por otra parte se sabía que el compuesto provoca un incremento de la cantidad del receptor nuclear PPAR γ en el hígado de ratas cirróticas y que la cantidad de la proteína colágena I, principal componente fibrogénico en la cirrosis, se abatía con la administración del hepatoprotector (Rodríguez-Aguilera, 2012). Por otra parte, estudios realizados recientemente en el laboratorio habían establecido que el IFC-305 tenía efecto incrementando la cantidad global de DNA metilado si se administraba durante 5 semanas a ratas cirróticas (Rodríguez-Aguilera, 2012), este resultado dio pie a la evaluación global así como loci-específica de diferentes marcas epigenéticas que pudieran participar en la reversión de la cirrosis y que estuvieran modificadas por efecto del hepatoprotector.

En los siguientes párrafos se analizarán los resultados obtenidos y se propondrán ideas que pudieran explicar los cambios encontrados durante la cirrosis o la activación de HSC hacia miofibroblastos así como el efecto del hepatoprotector en ambos modelos.

1. Evaluación global de la metilación del DNA genómico durante la activación de HSC

El primer efecto diferencial del IFC-305 a nivel epigenético dependiendo del material biológico analizado fue el efecto sobre la metilación global del DNA genómico, ya que lo que se había encontrado en el tejido completo consistía en un incremento de la cantidad de DNA metilado si se administraba a ratas cirróticas durante 5 semanas después de la inducción de la cirrosis (Rodríguez-Aguilera, 2012), sin embargo, al evaluar éste mismo efecto directamente en cultivos celulares de HSC, se encontró que éstas células tienen una

tendencia a incrementar la cantidad de DNA metilado una vez que están activas (miofibroblastos, 7 d de cultivo) mientras que el tratamiento con IFC-305 mantiene un nivel equivalente a las células quiescentes (1 d de cultivo). El incremento en la metilación encontrada en el cultivo celular, es consistente con los datos reportados por Lu y colaboradores (Ramani et al., 2010) donde encontraron que durante la activación de HSC se sobreexpresan las isoformas 2A y 2B de la enzima metionina adenosiltransferasa encargada de la síntesis de SAM a partir de metionina y ATP (en las HSC la isoforma MAT1, no se expresa (Shimizu-Saito et al., 1997)) así como el incremento de este metabolito y principal donador de grupos metilo, por lo que el incremento en metilación podría estar asociado a la actividad de MAT2A y MAT2B así como de la biodisponibilidad de SAM. Por otro lado, el mantenimiento de los niveles de metilación por efecto del IFC-305 en el cultivo celular, pudiera estar relacionado con la sobreexpresión de PPAR γ el cual se ha reportado que regula negativamente la expresión de la isoforma MAT2A (Ramani y Tomasi, 2012) por lo que al no expresarse la enzima que se encarga de formar SAM, la metilación no incrementa.

El efecto del IFC-305 al evitar la activación de HSC pudiera relacionarse con los mecanismos encontrados recientemente sobre la reversión de la activación de HSC donde se ha demostrado que durante la reversión espontánea de fibrosis inducida con CCl₄, la mitad de los miofibroblastos escapan de la apoptosis, subexpresan genes fibróticos como *Col1a1*, *Col1a2*, α -SMA, *TGF β RI* y *TIMP1* y sobreexpresan genes asociados a la quiescencia como *Pparg* y *Bambi* (Kisseleva et al., 2012).

2. Estado de metilación del promotor de *Pparg*

Tanto en el tejido hepático completo como en las HSC y miofibroblastos, no se encontraron modificaciones del estado de metilación de las regiones analizadas de *Pparg*, en un primer momento se consideró que los cambios podrían estar ocurriendo en las HSC y ya que estas representan únicamente el 8% de la población celular del hígado, los cambios podrían estar enmascarados por la gran población de hepatocitos al realizar los ensayos de CHIP en el tejido completo y por otra parte, recientemente se ha descrito que únicamente 6.4% de las islas CpG en el hígado de rata se encuentran metiladas y que las CGI metiladas se encuentran enriquecidas en los exones comparando contra regiones como promotores, intrones y UTRs (Figura 53A); además el patrón de metilación cercano al sitio de inicio de la transcripción (TSS) describe una curva en forma de “V” indicando bajos niveles de metilación en TSS (Figura 53B) (Sati et al., 2012). Esto dio pie a la

evaluación de una región contigua dentro del primer exón de *Pparg* pero los resultados fueron consistentes con los encontrados en la región regulatoria.

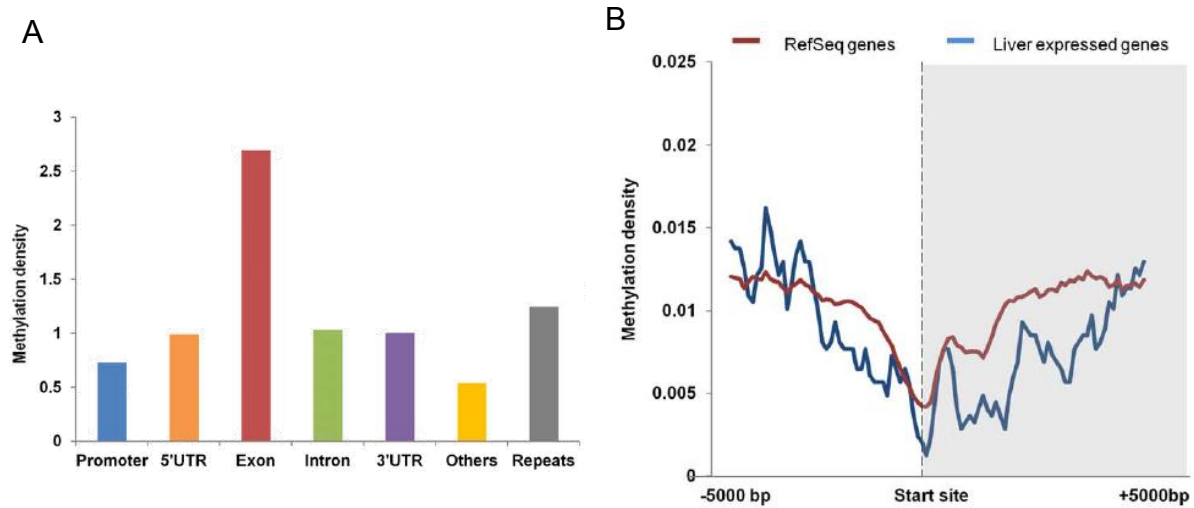


Fig. 53. Densidad de metilación en diferentes regiones genómicas de la rata. A) se muestra la densidad de metilación en las diferentes regiones del genoma de la rata, destacando que la mayor densidad se encuentra en los exones. B) Distribución de la metilación en torno al TSS en genes expresados en hígado de rata, se observa que la metilación disminuye conforme se aproxima al TSS. Tomado de (Sati et al., 2012)

Al analizar el promotor de *Pparg* en el modelo de activación de HSC, el cambio esperado que consistía en una ganancia de metilación del promotor de *Pparg* en la célula estelar activada (miofibroblasto, 7 d de cultivo) no se encontró a pesar de que se ha descrito la incorporación de proteínas de unión a DNA metilado en la zona estudiada. Esto podría entenderse si se considera que en la literatura se ha informado recientemente que algunas de estas proteínas pueden estar uniéndose a regiones ricas en CpG a pesar de que el DNA esté libre de metilación (Figura 54) (Baubec et al., 2013), con lo anterior también se puede agregar que en los reportes donde se describe la incorporación de las proteínas de unión a DNA metilado se utilizó el ensayo de ChIP para llegar a esta conclusión. El ensayo permitió determinar si estas proteínas se encuentran en la región analizada pero no si el DNA se encuentra o no metilado como en nuestro caso donde se utilizó la modificación de DNA por bisulfito de sodio para determinar la presencia de esta marca.

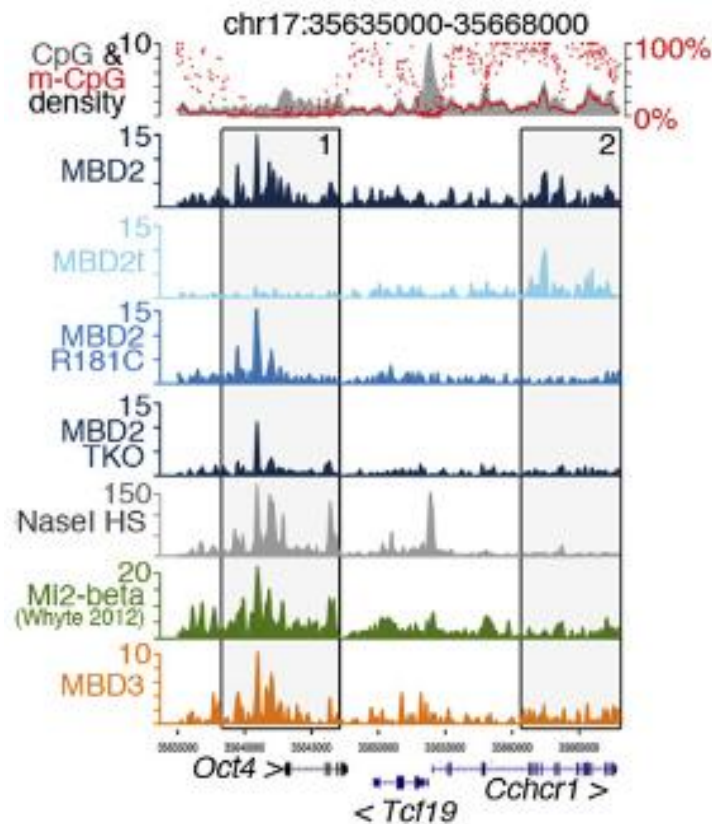


Fig. 54. Unión de proteínas de unión a DNA metilado independientemente de la metilación de CpG. Ejemplo de regiones que ilustran la unión dual de MBD2 a regiones de baja (1) o alta (2) densidad de metilación. En la parte superior del panel: % m-CpG y densidad de CpG y m-CpG. En la parte inferior del panel se muestran resultados de ChIP y de sensibilidad a la DNasa I por cada 100 pb. Tomado de (Baubec et al., 2013)

Estos resultados podrían sugerir que la expresión de *Pparg* en las condiciones estudiadas pudiera estar regulado por otro mecanismo epigenético como las PTM de histonas y no por metilación de DNA.

3. Estado de metilación del promotor de *Col1a1*

En la evaluación del estado de metilación del promotor de *Col1a1* en el tejido completo se identificaron cuatro CpGs que cambian radicalmente su metilación (disminuye) con el desarrollo de la cirrosis (Figura 30), la cual pudiera relacionarse con el incremento en el transcrito y proteína de éste gen (Figura 18). Es de destacar que la CpG en la posición 3 la cual tiene una clara disminución de la metilación y una tendencia a la recuperación de su estado metilado por efecto del IFC-305, se encuentra cercana a un sitio fino de regulación del gen (estrella amarilla) donde se ha descrito (Yavrom et al., 2005) que si se

muta el triplete TGG→CAA se abate la expresión del gen, es por esto que consideramos de especial importancia esta CpG. Además al analizar los porcentajes de metilación de cada CpG modificada es posible observar que la tendencia muestra una disminución de esta marca conforme avanza el modelo de cirrosis mientras que el tratamiento con IFC-305 por 5 semanas recupera el estado de metilación similar al que muestra el tejido control (Figura 30).

Por otra parte, es de destacar que la administración del IFC-305 a ratas cirróticas, incrementa el estado de metilación en las CpGs adyacentes al sitio de inicio de la transcripción y se ha descrito este comportamiento en promotores de hígado de rata (Figura 55) (Sati et al., 2012).

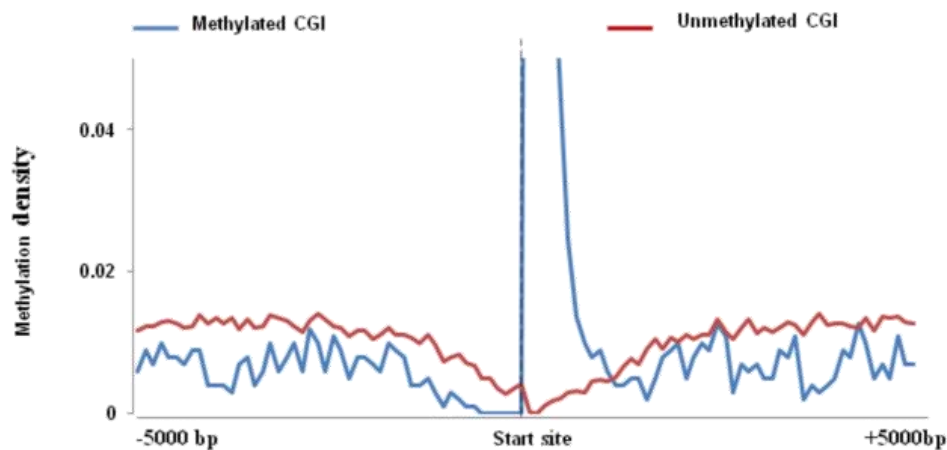


Fig. 55. Distribución de islas CpG metiladas y no metiladas en torno al TSS en el hígado de rata. Tomado de (Sati et al., 2012).

Es importante comentar que cuando se utiliza todo el tejido para el análisis del metiloma de DNA, o en este caso el estado de metilación de una región específica, existe el riesgo de que las diferencias observadas pueden simplemente estar reflejando una mezcla de distintos tipos celulares y/o de arquitectura en el tejido en lugar de identificar los cambios moleculares que están impulsando la fibrogénesis (Mann, 2014). Es por esto que se analizó el estado de metilación de esta misma región de *Col1a1* en los cultivos celulares de HSC durante su activación.

A diferencia de lo encontrado en el tejido completo, en el modelo de activación de HSC se encontró que las CpGs que presentaban un mayor número de cambios, mantenían cierto grado de estabilidad (se mantenían metiladas) en los diferentes estados de activación analizados. Es posible que la estabilidad de estas CpGs pudiera estar relacionada con las

recientemente descritas islas CpG *ravines* identificadas en el genoma humano, las cuales presentan un patrón de baja metilación con una región de alta metilación y que sugieren que la metilación en los extremos de islas CpG se asocia a genes de alta expresión. Además la presencia de *ravines* en el promotor 5' de los genes altamente transcritos apoya el complejo papel de la metilación tanto en activar como en reprimir la expresión (Edgar et al., 2014).

4. Evaluación global de 5hmC

Al analizar la presencia de la marca de 5hmC en muestras de DNA genómico del modelo de inducción de cirrosis con CCl₄, se encontró que esta marca disminuía en las muestras cirróticas mientras que el tratamiento con IFC-305 restablece la cantidad de 5hmC y que esta es similar al control como se observa en la figura 56. Este comportamiento corresponde también al que se observó para la metilación global de DNA genómico, lo cual podría entenderse como contradictorio si se considera que la marca de 5hmC es una señal de un proceso de desmetilación activa del DNA, sin embargo ya que ambos ensayos informan el estado de cada marca de manera global, es posible que el incremento en metilación esté ocurriendo en regiones diferentes del genoma a las que ocurre el incremento de 5hmC y que por lo tanto lo que se observa corresponda al promedio de los cambios a nivel del genoma completo.

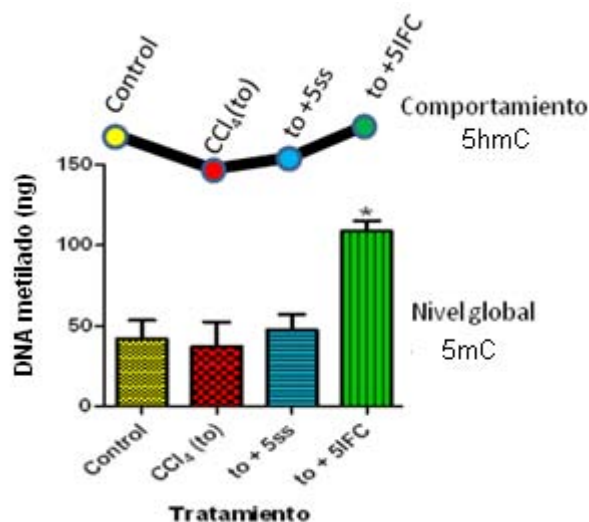


Fig. 56. Comportamiento global de 5hmC comparada contra la cuantificación de 5mC en DNA genómico global del modelo de cirrosis inducida con CCl₄.

Por otra parte, se ha encontrado que en muestras de pacientes con cáncer hepático, de mama, pulmón y páncreas hay una disminución de la marca de 5hmC en las regiones tumorales si se comparan con tejido adyacente al tumor o contra regiones de tejido sano (Yang et al., 2013a), además en este mismo informe se observa que esta disminución está asociada a una baja expresión de las enzimas TET1 en los tumores (Figura 57).

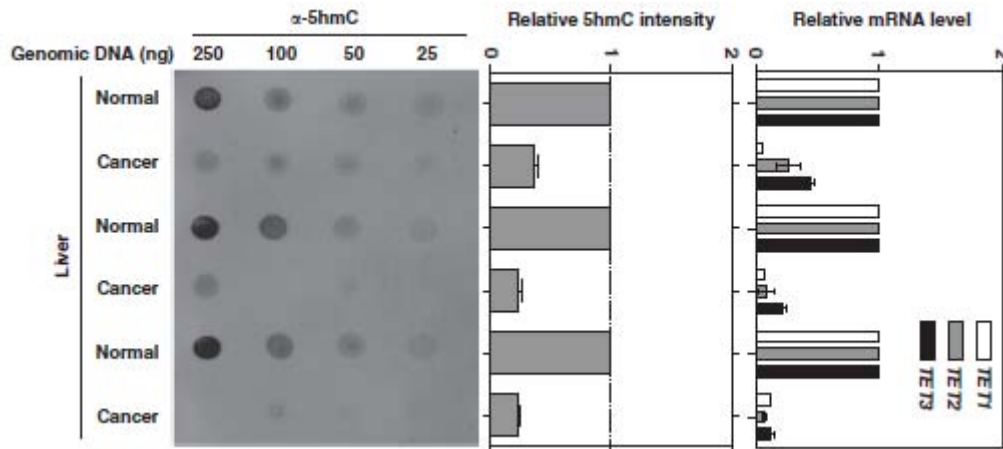


Fig. 57. La reducción de 5hmC está asociada con una substancial reducción en la expresión de los genes de las enzimas TET en cáncer hepático humano. Tomado de (Yang et al., 2013a).

Tomando en cuenta esta información, sería interesante evaluar el comportamiento a nivel de transcrito y proteína de las enzimas TET a lo largo del modelo estudiado para correlacionarlo con los valores de 5hmC.

Es importante comentar, que las primeras descripciones sobre la 5hmC en el DNA se realizaron en hígado y cerebro de rata por el grupo de Yura en 1972 (Penn et al., 1972) y que no fue hasta 2009 cuando dos grupos simultáneamente (Kriaucionis y Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009) propusieron que esta marca podría participar en el proceso de desmetilación activa del DNA en el sistema nervioso central y desde entonces muchos de los esfuerzos por entender la función de la 5hmC han girado en torno a dicha área.

Por su parte, al evaluar la marca de 5hmC en el modelo de activación de HSC, nuevamente se encontró un efecto diferencial del IFC-305 dependiendo del material biológico analizado, ya que durante el proceso de activación, hay un incremento de la inmunoreactividad de 5hmC mientras que el compuesto evita que este incremento vaya más allá del nivel que presentan las células a 1 día de activación, a diferencia de lo que ocurre en el tejido completo donde se observa que la cirrosis conduce a una disminución

de la marca y el compuesto la restablece. Hasta el momento no tenemos conocimiento sobre informes que indiquen cómo se encuentra la 5hmC en las células estelares hepáticas, así que este trabajo podría ser uno de los pioneros en el área.

5. Determinación de la cantidad global de acetilación de la histona H4

El análisis de la cantidad de la histona H4 acetilada a lo largo del modelo de cirrosis inducida con CCl₄, reveló que durante el estado cirrótico hay una disminución de cerca del 50% de la marca mientras que la administración del hepatoprotector durante 5 semanas después de la inducción de la cirrosis, restablece la cantidad de acetilación de H4 a un nivel similar al control. Como se sabe, la acetilación facilita la unión de los factores de transcripción a las secuencias de DNA en las zonas promotoras de los genes, fomentando una estructura abierta de la cromatina (Arenas-Huertero y Recillas-Targa, 2002), por lo que este mecanismo pudiera estar involucrado en la normalización de algunos de los 263 genes que normaliza el hepatoprotector durante la cirrosis. Además, estos resultados pudieran ser el efecto fisiológico de los cambios encontrados en la expresión del gen que codifica para la Hdac3 (Perez-Carreón et al., 2010) a través de microarreglos donde se encontró que el transcrito de esta enzima está incrementado en cirrosis mientras que el tratamiento con IFC-305 disminuye cerca del 30% la expresión del transcrito. Es importante comentar que las desacetilasas de histonas están comúnmente desreguladas en cáncer y que se han identificado diferentes factores relacionados con vías de señalización en esta patología que están regulados por la familia de las HDAC, algunos de los cuales son principales reguladores de la hepatocarcinogénesis como son: el inhibidor de apoptosis *BIRC5* (Survivina), el gen supresor de tumores y regulador de la vía Wnt *CDH1* (E-cadherina) y el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina *CDKN1A* (p21) el cuál se sabe que está involucrado en la inhibición del crecimiento, senescencia y apoptosis. Por otra parte, se ha propuesto que a la HDAC3 como un potencial biomarcador para la reincidencia después del trasplante hepático en carcinoma hepatocelular asociado a hepatitis B (Lachenmayer et al., 2012).

En cuanto a la cantidad de acetilación de la histona H4 en el modelo de activación de HSC, nuevamente se encontró un efecto diferencial del hepatoprotector dependiendo del material biológico analizado, ya que durante la activación de las HSC en primera instancia se observa una tendencia a la disminución de la marca (Figura 40) lo cual es consistente con los reportes en la literatura sobre el efecto de inhibidores de HDAC en la activación de

estas células (Liu et al., 2013; Niki et al., 1999) en las cuales se encontró que en las primeras 12 h de activación de HSC si no son tratadas con inhibidores de HDAC, se pierde considerablemente la marca de H4 hiperacetilada (Figura 58A) y por otro lado, el tratamiento con inhibidores de HDAC disminuye los marcadores de HSC activas como colágena I, α -sma y TIMP1 (Figura 58B).

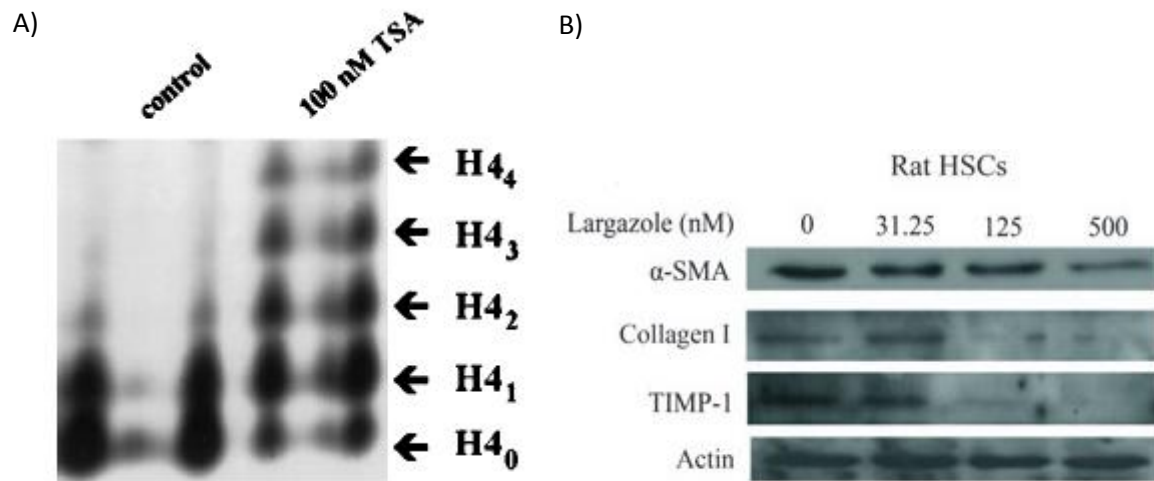


Fig. 58. Efecto de inhibidores de HDAC en la activación de HSC. A) Análisis de la hiperacetilación de la histona H4, las HSC en cultivo primario fueron incubadas con medio de cultivo (control) o con 100 nmol/L de TSA por 12 h. La incubación con TSA mantuvo la hiperacetilación de H4 durante el tiempo de cultivo, tomado de (Niki et al., 1999). B) HSC fueron tratadas con diferentes concentraciones de largazol y se observó que a 500nM del inhibidor de HDAC, disminuían los marcadores de activación de HSC al tratarlas durante 24 h, tomada de (Liu et al., 2013)

Sin embargo, se encontró un incremento en la marca de H4 hiperacetilada en miofibroblastos (HSC activadas, cultivo de 7d) de cerca de 4.5 veces mientras que el tratamiento con el hepatoprotector mantiene los niveles de dicha marca similares a los de las células quiescentes, en este punto es importante comentar que las HSC activadas proliferan mientras que las cultivadas en presencia de IFC-305 conservan un fenotipo no proliferativo.

6. Propuesta: Regulación epigenética de *Pparg* y mecanismo de represión de *Col1a1* por PPAR γ mediada por el IFC-305

Los resultados de las ChIPs con los que se cuentan hasta el momento sobre las marcas de histonas en el promotor de *Pparg* (Figuras 49, 50 y 51) apuntan a que durante el

estado cirrótico el contexto cromatínico en torno a este promotor está más cerrado (H4ac/H3K27me3 = 0.18) que en el hígado sano (H4ac/H3K27me3 = 0.25) mientras que la administración del IFC-305 durante 5 semanas a ratas cirróticas provoca una apertura de la cromatina (H4ac/H3K27me3 = 1.2) la cual estaría relacionada con el incremento de la expresión así como de la proteína PPAR γ .

Estos resultados son consistentes con el grupo de Mann y colaboradores quienes han descrito que hay ganancia de marcas de cromatina cerrada en las HSC transdiferenciadas a miofibroblastos (Mann et al., 2010) mientras que en nuestro modelo de tejido completo observamos una pérdida de marcas de cromatina abierta. Con este resultado es posible explicar los niveles de RNAm y proteína de PPAR γ en el modelo estudiado, sin embargo hasta este punto no es posible asegurar que la presencia del receptor nuclear estuviera reprimiendo la expresión de *Col1a1*, por lo que se evaluó el reclutamiento de PPAR γ en el promotor de *Col1a1* también por la técnica de ChIP.

Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina contra PPAR γ , sobre el promotor de *Col1a* (Figura 50) con los que se cuentan a la fecha con replicados técnicos, revelan que durante el estado cirrótico hay una tendencia a la pérdida del receptor nuclear en el promotor de *Col1a1*, que si bien la deposición de ésta proteína es baja en la región analizada en el hígado sano, es posible que esta interacción basal sea suficiente para evitar la sobreexpresión de colágena I. El grupo que describió este mecanismo en la activación de las células estelares (Yavrom et al., 2005) demostró que la interacción del receptor nuclear no es directamente con la secuencia del promotor de *Col1a1*, sino más bien ocurre por la competencia del receptor nuclear con la acetiltransferasa de histonas p300 quien a su vez interactúa con NF- κ B para transactivar la expresión del gen, si p300 es desplazado por PPAR γ se abate la expresión de colágena I. Los resultados del ChIP en el hígado de rata cirrótica tratada con IFC-305 apuntan a que el hepatoprotector pudiera estar utilizando éste ultimo mecanismo como vía de reversión de la cirrosis.

En la figura 60 se propone un modelo que trata de describir los cambios epigenéticos encontrados en hígado completo tanto a nivel global como loci-específicos.

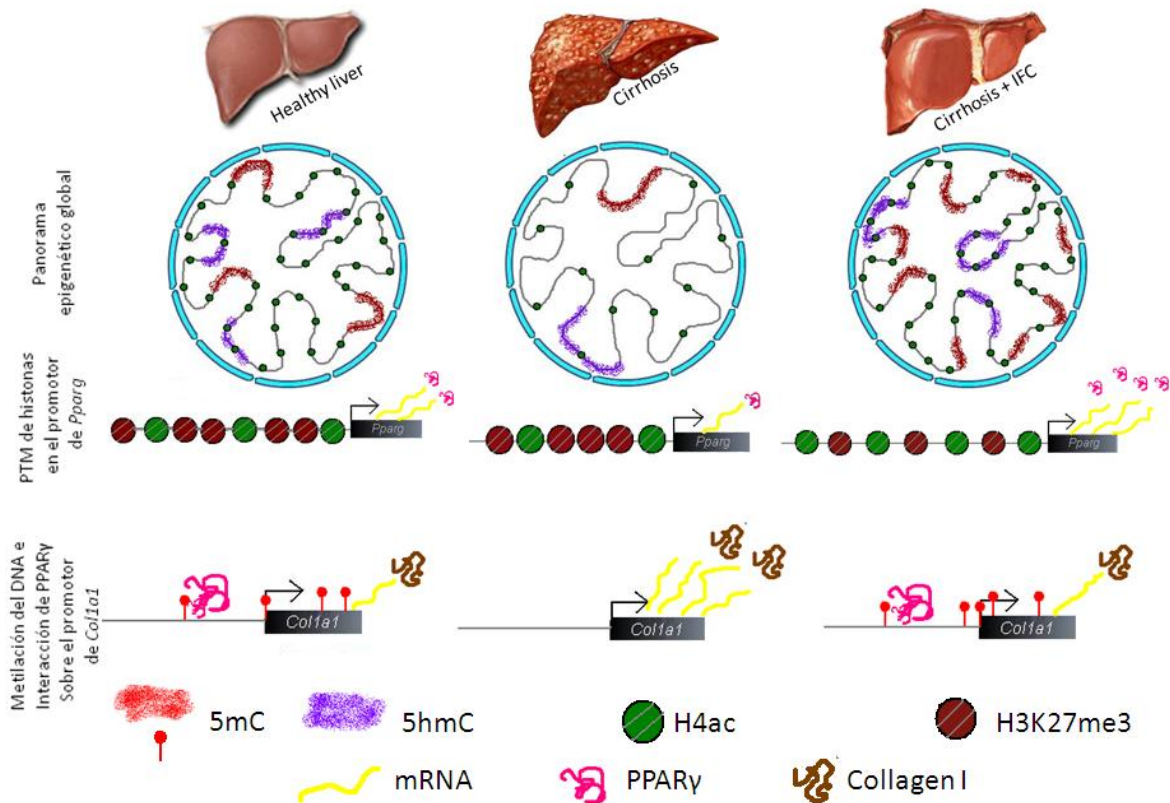


Fig. 60. Efectos epigenéticos del hepatoprotector IFC-305 en el hígado cirrótico. En la parte superior de la figura se presentan los efectos globales, durante el estado cirrótico hay una tendencia a la disminución del DNA metilado, 5hmC y acetilación de la histona H4; el tratamiento con el hepatoprotector incrementa la cantidad de DNA metilado y restablece los niveles de 5hmC así como de la acetilación de la histona H4. En la parte intermedia de la imagen se muestran los cambios que ocurren en el promotor de *Pparg* donde se observa que en cirrosis el promotor de este gen se encuentra en un contexto cromatínico más cerrado que en el control lo cual repercute en la cantidad de transcrito y de proteína que se sintetizan. Por el contrario, la administración del hepatoprotector genera una descompactación de la cromatina en el promotor de *Pparg* con la consecuente sobreexpresión del transcrito y proteína. En la parte baja de la imagen se muestran los cambios en el promotor de *Col1a1*, se observa que 4 dinucleótidos CpGs que se encontraban metilados en el hígado sano pierden su metilación y además disminuye la interacción del receptor nuclear PPAR γ lo cual puede ser la causa de la sobreexpresión tanto de mensajero como de la proteína Colágena I que estaría generando el estado cirrótico. Con la administración del hepatoprotector se genera una ganancia de metilación en torno al TSS y se recupera la metilación en el tercer dinucleótido CpG que se encuentra cercana a un sitio clave de regulación del gen y además se genera nuevamente un reclutamiento de PPAR γ al promotor de *Col1a1* el cual pudiera ser un mecanismo de reversión de cirrosis.

En este trabajo, también se encontró que los efectos del hepatoprotector IFC-305 pueden ser diferentes dependiendo del tipo celular al que se administre, esto se encontró al observar un comportamiento diferente del tratamiento en el hígado completo así como en los cultivos primarios de HSC. La figura 61 describe los cambios globales encontrados a nivel epigenético a lo largo del modelo de activación de HSC hacia miofibroblastos.

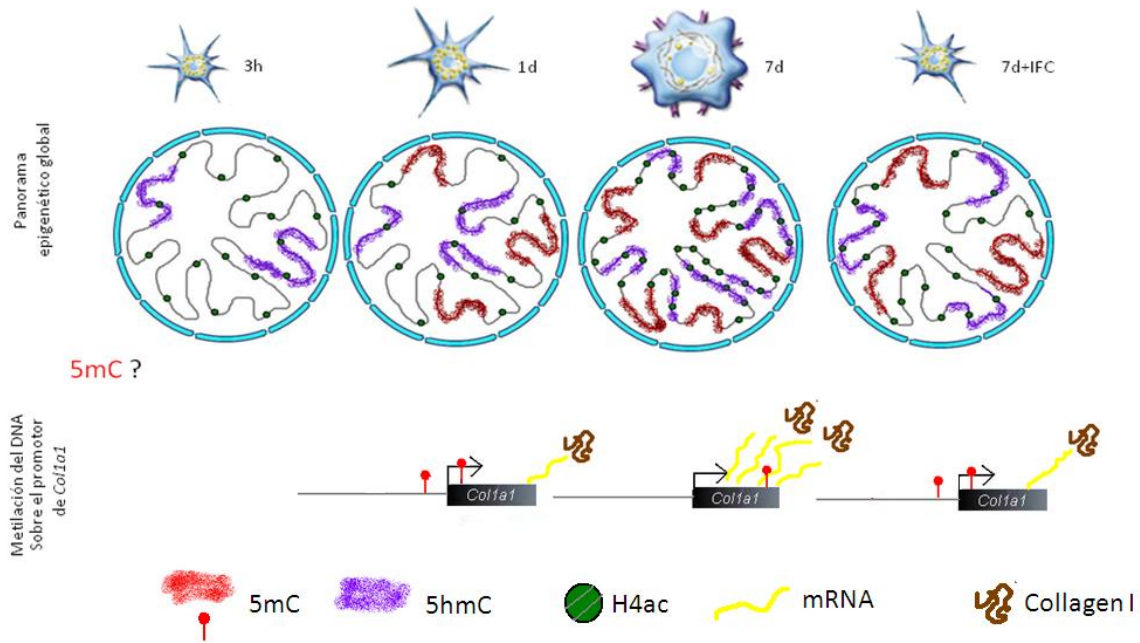


Fig. 61. Efectos epigenéticos del hepatoprotector IFC-305 en el modelo de activación de HSC. Se observa que a 1 día (1 d) de activación, hay una ligera disminución de H4 hiperacetilada y un incremento de 5hmC; la metilación del DNA no se determinó en las células cultivadas durante 3 h. Al comparar las células activadas (miofibroblastos, cultivo durante 7d) con células 1 d de cultivo se observa un incremento de metilación del DNA, de 5hmC así como de H4 hiperacetilada mientras que si las células son cultivadas conjuntamente con IFC-305, la cantidad de DNA metilado, de 5hmC y de H4 hiperacetilada se mantienen en los niveles de las células quiescentes.

XIII. CONCLUSIONES

1. Estudio de la metilación global del DNA genómico en el modelo de activación de HSC.

- Durante la activación de las células estelares hepáticas hay un incremento global de la cantidad de DNA metilado y al cultivarse en presencia de IFC-305 se impide éste incremento de metilación.

2. Evaluación del estado de metilación promotores de *Pparg* y *Col1a1*

- No se observaron cambios en el estado de metilación del promotor y primer exón de *Pparg* en hígado completo a lo largo del modelo de cirrosis estudiado.
- Durante la cirrosis inducida con CCl₄ y en to + 5ss se observa la pérdida de la metilación de cuatro CpGs dentro de la región del promotor de *Col1a1* analizada en hígado completo.
- El tratamiento con IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis promueve un incremento en la metilación alrededor del sitio de inicio de la transcripción de *Pparg*.
- En el promotor de *Pparg* no se observaron cambios en el estado de metilación ni por la activación de las HSC ni por efecto del IFC-305.
- En el modelo de activación de HSC se observó que el IFC-305 genera un incremento en la metilación de CpGs en torno al TSS de *Col1a1* si se compara con el estado de miofibroblasto.

3. Estudio del estado de hidroximetilación (5hmC) global del DNA genómico.

- Durante la cirrosis experimental hay una disminución de 5hmC global consistente con la disminución de dicha marca en diversos padecimientos neoplásicos si se considera que el 80% de los CHC son precedidos de cirrosis.
- La administración de IFC-305 durante 5 semanas después de la inducción de cirrosis, favorece el restablecimiento de los niveles globales de 5hmC.
- En la trasdiferenciación de HSC hacia miofibroblastos hay un incremento de 5hmC.

- El cultivo de HSC con IFC-305 evita el incremento de 5hmC generado durante la activación de estas células.
4. Determinación cantidad de histona H4 hiperacetilada de manera global
- Durante la cirrosis hay una disminución de la marca de hiperacetilación de la histona H4 y el tratamiento con IFC-305 restablece los niveles de dicha marca.
 - Los miofibroblastos provenientes del cultivo de HSC presentan un incremento de la marca de H4 hiperacetilada mientras que si se cultivan las HSC en presencia del IFC-305, esta marca se mantienen en un nivel similar al que presentan las células quiescentes.
5. Estudio cuantitativo de las PTM de histonas en el promotor de *Pparg* y *Col1a1* en el modelo de cirrosis estudiado
- El hígado control presenta un estado abierto de la cromatina del promotor de *Pparg*, consistente con la expresión basal del receptor nuclear en este tejido.
 - Durante la cirrosis hay una compactación de la cromatina en el promotor de *Pparg*.lo que correlaciona con la disminución en la expresión del gen
 - El tratamiento con IFC-305 a ratas cirróticas favorece una cromatina abierta en el promotor de *Pparg*.consistente con la sobreexpresión del gen
6. Reclutamiento del receptor nuclear PPAR γ al promotor de *Col1a1*
- En el hígado cirrótico se observó una tendencia a la disminución del receptor nuclear presente en el promotor de *Col1a1* lo que puede estar asociado a la sobreexpresión de colágena I.
 - El tratamiento con IFC-305 a ratas cirróticas promueve que haya nuevamente un reclutamiento del receptor nuclear hacia el promotor de *Col1a1* el cual pudiera ser un mecanismo de reversión de la cirrosis utilizado por el hepatoprotector.

XIV. LIMITANTES DEL ESTUDIO

Para el modelo *in vivo* es importante comentar que dado que la población celular más grande en el hígado son los hepatocitos (cerca del 80% de las células hepáticas), los resultados obtenidos a partir de este modelo representarían un panorama de lo que ocurre principalmente en esta población celular. Por otra parte, cabe señalar que cuando se utiliza todo el tejido para el análisis epigenético existe el riesgo de que las diferencias observadas pueden simplemente estar reflejando una mezcla de distintos tipos celulares y/o de arquitectura en el tejido en lugar de identificar los cambios moleculares atribuibles a los diferentes tratamientos a lo largo del modelo de estudio.

En el caso del modelo *in vitro*, si bien la activación de las HSC se da de manera espontánea al ser aisladas, los cambios moleculares que ocurran no necesariamente reflejarán lo que ocurre en estas mismas células dentro del tejido, ya que al estar en cultivo las condiciones del microambiente celular no son las mismas al no haber contribución de las demás estirpes celulares que se encuentran en el hígado, sin embargo este tipo de modelos permite el análisis y comprensión de algunos procesos al poder controlar variables que un modelo *in vivo* no permite.

XV. PERSPECTIVAS

Derivado de los resultados obtenidos en este estudio, es posible proponer nuevas preguntas tanto para ampliar la caracterización epigenética del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ y del modelo de activación de HSC en cultivo así como para profundizar en el mecanismo de acción del hepatoprotector IFC-305.

En lo que se refiere a la caracterización global será necesario evaluar el comportamiento de la histona H3K27me3 a lo largo del modelo de cirrosis inducida con CCl₄ modificación que está asociada a cromatina cerrada y que será la contraparte del resultado que indica que la histona H4ac (marca de cromatina abierta) se encuentra disminuida en cirrosis y que tratamiento con el hepatoprotector restablece a niveles del hígado sano. Además, considerando que en el microarreglo del modelo se encontró que la expresión de *Hdac3* esta modulada por la administración del fármaco, para determinar si la marca de H4ac es regulada por dicha enzima, se deberá de validar dicho resultado además de estudiar la

cantidad de proteína presente a lo largo del modelo. Por otra parte una forma de validar la disminución de 5hmC durante el estado cirrótico y la recuperación de niveles similares a los del control por el tratamiento con el hepatoprotector será la determinación de la cantidad de las enzimas TET a lo largo del modelo estudiado y si el IFC-305 es capaz de incrementar alguna de estas enzimas.

Al igual que en el modelo *in vivo*, la evaluación global de la histona H3K27me3 así como de las enzimas TET en el modelo de activación de HSC en cultivo será necesaria para complementar la caracterización epigenética del modelo. Considerando que los efectos epigenéticos del hepatoprotector IFC-305 han sido diferentes dependiendo del tipo celular que se analice (los efectos en el tejido hepático completo son diferentes a los observados en el cultivo de HSC) debe evaluarse si el mecanismo de inhibición de *Col1a1* por PPAR γ encontrado para el tejido completo ocurre también en las HSC las cuales son las principales responsables de la producción de fibrosis.

Considerando que el principal problema durante la cirrosis es la acumulación de colágena I producida por las HSC, para determinar si el fenotipo activado de HSC se resuelve impidiendo la síntesis exacerbada de colágena se realizará knock down de *Col1a1* en un cultivo primario de HSC, esto además permitirá proponer un mecanismo alternativo del efecto del IC-305 si en la HSC con baja expresión de colágena se reproducen los efectos encontrados con el cultivo en presencia de IFC-305 el cual podría incluir un asa de retroalimentación entre Colágena I y PPAR γ .

Recientemente se ha demostrado que CTCF, un factor nuclear altamente conservado en vertebrados que está involucrado en la activación y silenciamiento de genes y que se ha identificado en todos los *insulators* de vertebrados conocidos a la fecha (Valdes-Quezada, 2014), es necesario para la expresión de *Pparg* durante la diferenciación de adipocitos ya que promueve un incremento de 5hmC en enhancers (Dubois-Chevalier et al., 2014). Considerando que las HSC son en cierto modo similares a los adipocitos al participar en el metabolismo de lípidos y requerir la expresión de PPAR γ para mantener su estado diferenciado, sería interesante evaluar si CTCF participa la regulación de la expresión del receptor nuclear durante el proceso de activación de HSC en cultivo. Por otra parte, se ha descrito que PPAR γ a su vez, es capaz de regular a la enzima metionina adenosiltransferasa 2a en HSC (Ramani y Tomasi, 2012) que es la única isoforma

presente de esta enzima en HSC y que se encarga de la formación de SAM (el donador universal de grupos metilo) a partir de la metionina; evaluando la cantidad de esta enzima a lo largo de la activación de las HSC en cultivo y correlacionando los niveles con los de PPAR γ así como de CTCF y de la metilción global de DNA genómico, sería posible establecer un eje de regulación para entender la influencia de estos participantes en el proceso de transdiferenciación de HSC hacia miofibroblastos.

XVI. REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberths, K., and Watson, J.D. (2008). *Molecular Biology of The Cell*, Fifth edn (USA: Garland Publishing, Inc.).
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., and Caparros, M.-L. (2007). *Epigenetics* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Angulo, P., Hui, J.M., Marchesini, G., Bugianesi, E., George, J., Farrell, G.C., Enders, F., Saksena, S., Burt, A.D., Bida, J.P., Lindor K, Sanderson SO, Lenzi M, Adams LA, Kench J, Therneau TM, Day CP., (2007). The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology* *45*, 846-854.
- Arenas-Huertero, F., and Recillas-Targa, F. (2002). [Chromatin epigenetic modifications in cancer generation]. *Gaceta medica de Mexico* *138*, 547-555.
- Ascha, M.S., Hanouneh, I.A., Lopez, R., Tamimi, T.A., Feldstein, A.F., and Zein, N.N. (2010). The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* *51*, 1972-1978.
- Bataller, R., and Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* *115*, 209-218.
- Baubec, T., Ivanek, R., Lienert, F., and Schubeler, D. (2013). Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell* *153*, 480-492.
- Bhutani, N., Burns, D.M., and Blau, H.M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* *146*, 866-872.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* *16*, 6-21.
- Black, J.C., Van Rechem, C., and Whetstine, J.R. (2012). Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular cell* *48*, 491-507.
- Bogdanovic, O., and Veenstra, G.J. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* *118*, 549-565.
- Cadena-Del-Castillo, C. (2014). Estudio de la desregulación epigenética en la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino. In *Genética Molecular*, Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México).
- Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., and Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* *22*, 2990-2997.
- Clark, S.J., Statham, A., Stirzaker, C., Molloy, P.L., and Frommer, M. (2006). DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature protocols* *1*, 2353-2364.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* *146*, 67-79.
- Cremer, T., and Cremer, C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature reviews Genetics* *2*, 292-301.
- Chagoya-de-Sánchez, V., Suárez, J.A., and Hernández-Muñoz, R. (2005). Investigación y desarrollo de un fármaco para el tratamiento de la cirrosis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* *8*, 106-114.
- Chagoya-de Sanchez, V., Suarez-Cuenca, J.A., and Hernandez-Munoz, R. (2007). Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis. *Gaceta medica de Mexico* *143*, 44-50.

- Chagoya de Sanchez, V., Hernandez-Munoz, R., Yanez, L., Vidrio, S., and Diaz-Munoz, M. (1995). Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *Journal of biochemical toxicology* 10, 41-50.
- Chang, T.T., Liaw, Y.F., Wu, S.S., Schiff, E., Han, K.H., Lai, C.L., Safadi, R., Lee, S.S., Halota, W., Goodman, Z., *et al.* (2010). Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 52, 886-893.
- Chen, G., Zhang, L., Chen, L., Wang, H., Zhang, Y., and Bie, P. (2013a). Role of integrin α 6 in the pathogenesis of ischemia-related biliary fibrosis after liver transplantation. *Transplantation* 95, 1092-1099.
- Chen, S.L., Zheng, M.H., Shi, K.Q., Yang, T., and Chen, Y.P. (2013b). A new strategy for treatment of liver fibrosis: letting MicroRNAs do the job. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 27, 25-34.
- D'Amico, G., Garcia-Tsao, G., and Pagliaro, L. (2006). Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *Journal of hepatology* 44, 217-231.
- Dahl, C., Gronbaek, K., and Guldborg, P. (2011). Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta* 412, 831-836.
- De Gottardi, A., Berzigotti, A., Seijo, S., D'Amico, M., Thormann, W., Abraldes, J.G., Garcia-Pagan, J.C., and Bosch, J. (2012). Postprandial effects of dark chocolate on portal hypertension in patients with cirrhosis: results of a phase 2, double-blind, randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition* 96, 584-590.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development* 25, 1010-1022.
- Debril, M.B., Gelman, L., Fayard, E., Annicotte, J.S., Rocchi, S., and Auwerx, J. (2004). Transcription factors and nuclear receptors interact with the SWI/SNF complex through the BAF60c subunit. *The Journal of biological chemistry* 279, 16677-16686.
- Desmet, V.J., and Roskams, T. (2004). Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *Journal of hepatology* 40, 860-867.
- Dooley, J., Lok, A., Burroughs, A., and Heathcote, E. (2011). *Sherlock's diseases of the liver and biliary system*, 12th edn (Oxford: Wiley-Blackwell).
- Drucker, R. (2005). *Fisiología Médica (México: Manual Moderno)*.
- Dubois-Chevalier, J., Oger, F., Dehondt, H., Firmin, F.F., Gheeraert, C., Staels, B., Lefebvre, P., and Eeckhoutte, J. (2014). A dynamic CTCF chromatin binding landscape promotes DNA hydroxymethylation and transcriptional induction of adipocyte differentiation. *Nucleic acids research* 42, 10943-10959.
- Dufour, J.F., and Clavien, P.A. (2010). Signaling Pathways in Liver Diseases, 2° edn (Springer).
- Edgar, R., Tan, P.P.C., Portales-Casamar, E., and Pavlidis, P. (2014). Meta-analysis of human methylomes reveals stably methylated sequences surrounding CpG islands associated with high gene expression. *Epigenetics & Chromatin* 7.
- El-Serag, H.B., Tran, T., and Everhart, J.E. (2004). Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 126, 460-468.
- Escamilla-Del-Arenal, M., da Rocha, S.T., and Heard, E. (2011). Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Human genetics* 130, 307-327.

- Escamilla-del-Arenal, M., and Recillas-Targa, F. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico* 28, 173-201.
- Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Hansen, J., Kristiansen, K., Debril, M.B., Miard, S., and Auwerx, J. (2002). The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Developmental cell* 3, 903-910.
- Falize, L., Guillygomarc'h, A., Perrin, M., Laine, F., Guyader, D., Brissot, P., Turlin, B., and Deugnier, Y. (2006). Reversibility of hepatic fibrosis in treated genetic hemochromatosis: a study of 36 cases. *Hepatology* 44, 472-477.
- Fauci, A., Kasper, D., Longo, D., Braunwald, E., Hauser, S., Jameson, L., and Loscalzo, J. (2009). *Harrison Principios de Medicina Interna*, 17° edn (China).
- Fede, G., D'Amico, G., Arvaniti, V., Tsochatzis, E., Germani, G., Georgiadis, D., Morabito, A., and Burroughs, A.K. (2012). Renal failure and cirrhosis: a systematic review of mortality and prognosis. *Journal of hepatology* 56, 810-818.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.
- Fernandez, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., and Bosch, J. (2009). Angiogenesis in liver disease. *Journal of hepatology* 50, 604-620.
- Fonseca-Guzmán, A. (2014). Efecto de un RNA largo no-codificante en la expresión de los genes α -globina de pollo. In *Genética Molecular Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México)*.
- Forner, A., Hessheimer, A.J., Isabel Real, M., and Bruix, J. (2006). Treatment of hepatocellular carcinoma. *Critical reviews in oncology/hematology* 60, 89-98.
- Freedman, N.D., Park, Y., Abnet, C.C., Hollenbeck, A.R., and Sinha, R. (2012). Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *The New England journal of medicine* 366, 1891-1904.
- Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *Journal of hepatology* 38 *Suppl 1*, S38-53.
- Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1827-1831.
- Fullgrabe, J., Kavanagh, E., and Joseph, B. (2011). Histone onco-modifications. *Oncogene* 30, 3391-3403.
- Garcia-Pagan, J.C., Gracia-Sancho, J., and Bosch, J. (2012). Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *Journal of hepatology* 57, 458-461.
- Garcia-Sainz, J.A., Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1980). Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism. *Biochemical pharmacology* 29, 1709-1714.
- Garcia-Sainz, J.A., Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., and de Sanchez, V.C. (1979). Mechanism of the fatty liver induced by cycloheximide and its reversibility by adenosine. *Biochemical pharmacology* 28, 1409-1413.
- Greer, E.L., and Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews Genetics* 13, 343-357.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., and Carroll, S.B. (2008). *Genética*, Novena edn (España: Mc Graw Hill).

- Guenther, M.G., Barak, O., and Lazar, M.A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Molecular and cellular biology* 21, 6091-6101.
- Guo, J.U., Ma, D.K., Mo, H., Ball, M.P., Jang, M.H., Bonaguidi, M.A., Balazer, J.A., Eaves, H.L., Xie, B., Ford, E., *et al.* (2011). Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature neuroscience* 14, 1345-1351.
- Guyot, C., Lepreux, S., Combe, C., Doudnikoff, E., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., and Desmouliere, A. (2006). Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 135-151.
- Ham, A.W., and Cormack, D.H. (1985). Tratado de Histología, 8° edn (México: Iberoamericana).
- Hamilton, J.P. (2011). Epigenetics: principles and practice. *Dig Dis* 29, 130-135.
- Hammel, P., Couvelard, A., O'Toole, D., Ratouis, A., Sauvanet, A., Flejou, J.F., Degott, C., Belghiti, J., Bernades, P., Valla, D., *et al.* (2001). Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *The New England journal of medicine* 344, 418-423.
- Hellems, K., Michalik, L., Dittie, A., Knorr, A., Rombouts, K., De Jong, J., Heirman, C., Quartier, E., Schuit, F., Wahli, W., *et al.* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 124, 184-201.
- Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology* 6, 425-456.
- Hernandez-Gea, V., Ghiassi-Nejad, Z., Rozenfeld, R., Gordon, R., Fiel, M.I., Yue, Z., Czaja, M.J., and Friedman, S.L. (2012). Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 142, 938-946.
- Hernandez-Guerra, M., Garcia-Pagan, J.C., Turnes, J., Bellot, P., Deulofeu, R., Abraldes, J.G., and Bosch, J. (2006). Ascorbic acid improves the intrahepatic endothelial dysfunction of patients with cirrhosis and portal hypertension. *Hepatology* 43, 485-491.
- Hernandez-Hernandez, A., Rincon-Arango, H., Recillas-Targa, F., Ortiz, R., Valdes-Quezada, C., Echeverria, O.M., Benavente, R., and Vazquez-Nin, G.H. (2008). Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* 117, 77-87.
- Hernandez-Munoz, R., Glender, W., Diaz Munoz, M., Adolfo, J., Garcia-Sainz, J.A., and Chagoya de Sanchez, V. (1984). Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical pharmacology* 33, 2599-2604.
- Hernandez-Munoz, R., Santamaria, A., Garcia-Sainz, J.A., Pina, E., and Chagoya de Sanchez, V. (1978). On the mechanism of ethanol-induced fatty liver and its reversibility by adenosine. *Archives of biochemistry and biophysics* 190, 155-162.
- Herreras, J.M. (1996). Tratado de Hepatología (España: Universidad de Sevilla).
- Hezode, C., Roudot-Thoraval, F., Nguyen, S., Grenard, P., Julien, B., Zafrani, E.S., Pawlotsky, J.M., Dhumeaux, D., Lotersztajn, S., and Mallat, A. (2005). Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 42, 63-71.
- <http://rgd.mcw.edu/>. RGD Rat Genome Database.
- INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, sexo y grupo de edad del fallecido.

- INEGI (2014). Causas de defunción. Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2012.
- Iredale, J.P. (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of clinical investigation* 117, 539-548.
- Issa, R., Zhou, X., Constandinou, C.M., Fallowfield, J., Millward-Sadler, H., Gaca, M.D., Sands, E., Suliman, I., Trim, N., Knorr, A., *et al.* (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 126, 1795-1808.
- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., and Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466, 1129-1133.
- Iyer, B.V., Kenward, M., and Arya, G. (2011). Hierarchies in eukaryotic genome organization: Insights from polymer theory and simulations. *BMC biophysics* 4, 8.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Katzung, B. (1986). *Farmacología Básica y Clínica*, 2° edn (México: El Manual Moderno).
- Kharbanda, K.K. (2007). Role of transmethylation reactions in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 13, 4947-4954.
- Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., *et al.* (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 9448-9453.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* 31, 89-97.
- Koutnikova, H., Cock, T.A., Watanabe, M., Houten, S.M., Champy, M.F., Dierich, A., and Auwerx, J. (2003). Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14457-14462.
- Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929-930.
- Lachenmayer, A., Toffanin, S., Cabellos, L., Alsinet, C., Hoshida, Y., Villanueva, A., Minguez, B., Tsai, H.W., Ward, S.C., Thung, S., *et al.* (2012). Combination therapy for hepatocellular carcinoma: additive preclinical efficacy of the HDAC inhibitor panobinostat with sorafenib. *Journal of hepatology* 56, 1343-1350.
- Larsson, S.C., and Wolk, A. (2007). Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 132, 1740-1745.
- Lefterova, M.I., Steger, D.J., Zhuo, D., Qatanani, M., Mullican, S.E., Tuteja, G., Manduchi, E., Grant, G.R., and Lazar, M.A. (2010). Cell-specific determinants of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function in adipocytes and macrophages. *Molecular and cellular biology* 30, 2078-2089.
- Leithead, J.A., Ferguson, J.W., and Hayes, P.C. (2008). Smoking-related morbidity and mortality following liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 14, 1159-1164.
- Lenhard, B., Sandelin, A., and Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nature reviews Genetics* 13, 233-245.
- Liu, Y., Wang, Z., Wang, J., Lam, W., Kwong, S., Li, F., Friedman, S.L., Zhou, S., Ren, Q., Xu, Z., *et al.* (2013). A histone deacetylase inhibitor, largazole, decreases liver fibrosis and angiogenesis by inhibiting transforming growth factor-beta and

- vascular endothelial growth factor signalling. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33, 504-515.
- Longo, D., Kasper, D., Jameson, L., Fauci, A., Hauser, S., and Loscalzo, J. (2012). *Harrison Principios de Medicina Interna*, 18° edn (México).
- Luca, A., Garcia-Pagan, J.C., Bosch, J., Feu, F., Caballeria, J., Groszmann, R.J., and Rodes, J. (1997). Effects of ethanol consumption on hepatic hemodynamics in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 112, 1284-1289.
- Ma, C., and Brunt, E.M. (2012). Histopathologic evaluation of liver biopsy for cirrhosis. *Advances in anatomic pathology* 19, 220-230.
- Mandrekar, P. (2011). Epigenetic regulation in alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 17, 2456-2464.
- Mann, D.A. (2014). Epigenetics in liver disease. *Hepatology* 60, 1418-1425.
- Mann, D.A., and Mann, J. (2008). Epigenetic regulation of hepatic stellate cell activation. *Journal of gastroenterology and hepatology* 23 *Suppl 1*, S108-111.
- Mann, J., Chu, D.C., Maxwell, A., Oakley, F., Zhu, N.L., Tsukamoto, H., and Mann, D.A. (2010). MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology* 138, 705-714, 714 e701-704.
- Mann, J., Oakley, F., Akiboye, F., Elsharkawy, A., Thorne, A.W., and Mann, D.A. (2007). Regulation of myofibroblast transdifferentiation by DNA methylation and MeCP2: implications for wound healing and fibrogenesis. *Cell death and differentiation* 14, 275-285.
- Manolakopoulos, S., Triantos, C., Theodoropoulos, J., Vlachogiannakos, J., Kougioumtzan, A., Papatheodoridis, G., Tzourmakliotis, D., Karamanolis, D., Burroughs, A.K., Archimandritis, A., *et al.* (2009). Antiviral therapy reduces portal pressure in patients with cirrhosis due to HBeAg-negative chronic hepatitis B and significant portal hypertension. *Journal of hepatology* 51, 468-474.
- Maston, G.A., Evans, S.K., and Green, M.R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics* 7, 29-59.
- Mathurin P, Hadengue A, Bataller R, Addolorato G, Burra P, Burt A, Caballeria J, Cortez-Pinto H, Day CP, Forrest EH, Gual A, Leon DA, Lligoña A, Jepsen P, Mueller S, Pageaux GP, Roskams T, Seitz HK, Stickel F, Thursz M, Naveau S, Morgan T, Nevens F. (2012). EASL clinical practical guidelines: management of alcoholic liver disease. *Journal of hepatology* 57, 399-420.
- Medina, J. (2011). *Medicina Ocupacional. Gases y Disolventes*.
- Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151, 1417-1430.
- Moreau, R., Jalan, R., Gines, P., Pavesi, M., Angeli, P., Cordoba, J., Durand, F., Gustot, T., Saliba, F., Domenicali, M., *et al.* (2013). Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 144, 1426-1437, 1437 e1421-1429.
- Morgan, T.R., Ghany, M.G., Kim, H.Y., Snow, K.K., Shiffman, M.L., De Santo, J.L., Lee, W.M., Di Bisceglie, A.M., Bonkovsky, H.L., Dienstag, J.L., *et al.* (2010). Outcome of sustained virological responders with histologically advanced chronic hepatitis C. *Hepatology* 52, 833-844.
- Moriarty, K.J. (2010). Alcohol-related disease: meeting the challenge of improved quality of care and better use of resources (Public Health England).
- Murphy, K., Travers, P., and Walpor, M. (2008). *Inmunología de Janeway*, Séptima edn (México: Mc Graw Hill).
- Murphy, S.K., Yang, H., Moylan, C.A., Pang, H., Dellinger, A., Abdelmalek, M.F., Garrett, M.E., Ashley-Koch, A., Suzuki, A., Tillmann, H.L., *et al.* (2013). Relationship

- between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 145, 1076-1087.
- Murr, R. (2010). Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Advances in genetics* 70, 101-141.
- Naveau, S., Giraud, V., Borotto, E., Aubert, A., Capron, F., and Chaput, J.C. (1997). Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 25, 108-111.
- Nelson, D., and Cox, M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (USA: Freeman and Company).
- Niki, T., Rombouts, K., De Bleser, P., De Smet, K., Rogiers, V., Schuppan, D., Yoshida, M., Gabbiani, G., and Geerts, A. (1999). A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology* 29, 858-867.
- Nkontchou, G., Bastard, J.P., Ziou, M., Aout, M., Cosson, E., Ganne-Carrie, N., Grand-Lemaire, V., Roulot, D., Capeau, J., Trinchet, J.C., *et al.* (2010). Insulin resistance, serum leptin, and adiponectin levels and outcomes of viral hepatitis C cirrhosis. *Journal of hepatology* 53, 827-833.
- Novo, E., Cannito, S., Paternostro, C., Bocca, C., Miglietta, A., and Parola, M. (2014). Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics* 548, 20-37.
- Oliveri, R.S., Wetterslev, J., and Gluud, C. (2012). Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 380, 470; author reply 470-471.
- Paik, W.K., Kim, S., and Lim, I.K. (2014). Protein methylation and interaction with the antiproliferative gene, BTG2/TIS21/Pc3. *Yonsei medical journal* 55, 292-303.
- Papatheodoridis G, Buti M, Cornberg M, Janssen HL, Mutimer D, Pol S, Raimondo G, Dusheiko G, Lok A, Marcellin P (2012). EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology* 57, 167-185.
- Pascual, G., Fong, A.L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A.C., Perissi, V., Rose, D.W., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437, 759-763.
- Penn, N.W., Suwalski, R., O'Riley, C., Bojanowski, K., and Yura, R. (1972). The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *The Biochemical journal* 126, 781-790.
- Pérez-Cabeza-de-Vaca, R. (2012). Efecto del hepatoprotector IFC-305 en las células de Kupffer en el modelo experimental de cirrosis inducida por CCl₄. In *Biología Celular y Desarrollo*, Instituto de Fisiología Celular (México: Universidad Nacional Autónoma de México).
- Perez-Carreón, J.I., Martínez-Pérez, L., Loredó, M.L., Yáñez-Maldonado, L., Velasco-Loyden, G., Vidrio-Gómez, S., Ramírez-Salcedo, J., Hernández-Luis, F., Velázquez-Martínez, I., Suárez-Cuenca, J.A., *et al.* (2010). An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl₄-induced rat cirrhosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 287-296.
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S.W., Solovei, I., Brugman, W., Graf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R.M., van Lohuizen, M., *et al.* (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Molecular cell* 38, 603-613.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116, 511-526.

- Perugorria, M.J., Wilson, C.L., Zeybel, M., Walsh, M., Amin, S., Robinson, S., White, S.A., Burt, A.D., Oakley, F., Tsukamoto, H., *et al.* (2012). Histone methyltransferase ASH1 orchestrates fibrogenic gene transcription during myofibroblast transdifferentiation. *Hepatology* 56, 1129-1139.
- Pinzani, M., Rombouts, K., and Colagrande, S. (2005). Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management. *Journal of hepatology* 42 *Suppl*, S22-36.
- Pol, S., Carnot, F., Nalpas, B., Lagneau, J.L., Fontaine, H., Serpaggi, J., Serfaty, L., Bedossa, P., and Brechot, C. (2004). Reversibility of hepatitis C virus-related cirrhosis. *Human pathology* 35, 107-112.
- Ramani, K., and Tomasi, M.L. (2012). Transcriptional regulation of methionine adenosyltransferase 2A by peroxisome proliferator-activated receptors in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 55, 1942-1953.
- Ramani, K., Yang, H., Kuhlenkamp, J., Tomasi, L., Tsukamoto, H., Mato, J.M., and Lu, S.C. (2010). Changes in the expression of methionine adenosyltransferase genes and S-adenosylmethionine homeostasis during hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 51, 986-995.
- Recillas-Targa, F. (2014). Interdependency between genetic and epigenetic regulatory defects in cancer. *Methods Mol Biol* 1165, 33-52.
- Rizzon, D.C. (2011). *Fundamentos de Anatomía y Fisiología* 3° edn (México: Cengage Learning).
- Rodríguez-Aguilera, J.R. (2012). Modificaciones de la Regulación Epigenética por el Hepatoprotector IFC-305 en Cirrosis. In *Biología Celular y Desarrollo*, Instituto de Fisiología Celular (México: Universidad Nacional Autónoma de México).
- Ruiz-Velasco-Leyva, M. (2014). Estudio de la función de un RNA largo no-codificante con niveles de expresión alterados en cáncer de mama. In *Genética Molecular*, Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México).
- Sati, S., Tanwar, V.S., Kumar, K.A., Patowary, A., Jain, V., Ghosh, S., Ahmad, S., Singh, M., Reddy, S.U., Chandak, G.R., *et al.* (2012). High resolution methylome map of rat indicates role of intragenic DNA methylation in identification of coding region. *PLoS one* 7, e31621.
- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1412-1417.
- Schuppan, D., and Afdhal, N.H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet* 371, 838-851.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., and Casero, R.A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.
- Shimizu-Saito, K., Horikawa, S., Kojima, N., Shiga, J., Senoo, H., and Tsukada, K. (1997). Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in different cell types of rat liver. *Hepatology* 26, 424-431.
- Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W., Bauer, C., Munzel, M., Wagner, M., Muller, M., Khan, F., *et al.* (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxymethyl)cytosine and its oxidized derivatives. *Cell* 152, 1146-1159.
- Stepanova, M., Rafiq, N., and Younossi, Z.M. (2010). Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study. *Gut* 59, 1410-1415.
- Strauss, W.M. (2001). Preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] *Chapter* 2, Unit 2.

- Sugii, S., and Evans, R.M. (2011). Epigenetic codes of PPARgamma in metabolic disease. *FEBS Lett* 585, 2121-2128.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- Torres, D.M., and Harrison, S.A. (2013). Is it time to write a prescription for coffee? Coffee and liver disease. *Gastroenterology* 144, 670-672.
- Tsochatzis, E., Papatheodoridis, G.V., Manesis, E.K., Kafiri, G., Tiniakos, D.G., and Archimandritis, A.J. (2008). Metabolic syndrome is associated with severe fibrosis in chronic viral hepatitis and non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 27, 80-89.
- Tsochatzis, E.A., Bosch, J., and Burroughs, A.K. (2012). New therapeutic paradigm for patients with cirrhosis. *Hepatology* 56, 1983-1992.
- Tsochatzis, E.A., Bosch, J., and Burroughs, A.K. (2014). Liver cirrhosis. *Lancet* 383, 1749-1761.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811-816.
- Turner, B.M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nature cell biology* 9, 2-6.
- Valdes-Quezada, G. (2014). Regulación epigenética del gen embrionario phi alfa globina durante el desarrollo y la diferenciación eritroide. In *Genética Molecular*, Instituto de Fisiología Celular (Universidad Nacional Autónoma de México).
- Varela-Moreiras, G., Alonso-Aperte, E., Rubio, M., Gasso, M., Deulofeu, R., Alvarez, L., Cabbleria, J., Rodes, J., and Mato, J.M. (1995). Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: effect of S-adenosylmethionine treatment. *Hepatology* 22, 1310-1315.
- Velasco-Loyden, G., Perez-Carreón, J.I., Aguero, J.F., Romero, P.C., Vidrio-Gomez, S., Martínez-Perez, L., Yanez-Maldonado, L., Hernández-Munoz, R., Macías-Silva, M., and de Sánchez, V.C. (2010). Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochemical pharmacology* 80, 1690-1699.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D.E., Barski, A., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138, 1019-1031.
- Wanless, I. (2004). Pathogenesis of cirrhosis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 19, S369-S371.
- Wanless, I.R., Nakashima, E., and Sherman, M. (2000). Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Archives of pathology & laboratory medicine* 124, 1599-1607.
- Wanless, I.R., Wong, F., Blendis, L.M., Greig, P., Heathcote, E.J., and Levy, G. (1995). Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in development of parenchymal extinction and portal hypertension. *Hepatology* 21, 1238-1247.
- Welzel, T.M., Graubard, B.I., Zeuzem, S., El-Serag, H.B., Davila, J.A., and McGlynn, K.A. (2011). Metabolic syndrome increases the risk of primary liver cancer in the United States: a study in the SEER-Medicare database. *Hepatology* 54, 463-471.
- Wong, G.L. (2014). Prediction of fibrosis progression in chronic viral hepatitis. *Clinical and molecular hepatology* 20, 228-236.
- Wu, S.C., and Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 607-620.

- Yang, H., Liu, Y., Bai, F., Zhang, J.Y., Ma, S.H., Liu, J., Xu, Z.D., Zhu, H.G., Ling, Z.Q., Ye, D., *et al.* (2013a). Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 32, 663-669.
- Yang, J.J., Tao, H., Huang, C., Shi, K.H., Ma, T.T., Bian, E.B., Zhang, L., Liu, L.P., Hu, W., Lv, X.W., *et al.* (2013b). DNA methylation and MeCP2 regulation of PTCH1 expression during rats hepatic fibrosis. *Cellular signalling* 25, 1202-1211.
- Yavrom, S., Chen, L., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R.A., and Tsukamoto, H. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses proximal alpha1(I) collagen promoter via inhibition of p300-facilitated NF- κ B binding to DNA in hepatic stellate cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 40650-40659.
- Yu, C., Markan, K., Temple, K.A., Deplewski, D., Brady, M.J., and Cohen, R.N. (2005). The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *The Journal of biological chemistry* 280, 13600-13605.
- Zein, C.O. (2010). Clearing the smoke in chronic liver diseases. *Hepatology* 51, 1487-1490.