

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

El miR 149-3p como modulador de la regeneración hepática

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

Biol. Exp. GABRIEL PÉREZ FRANCO

DIRECTOR

DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY

Ciudad de México, julio 2019.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dra. Claudia Selene Zarate Guerra UACM.
Secretario: Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy UACM.
Vocal: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga UACM.

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dra. Rosa Martha Eugenia Yocupicio Monroy
Profesora Investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

ASESORAS

Dra. Lilia López Cánovas
Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Sofía Lizeth Alcaráz Estrada
CMN 20 de noviembre. Medicina Genómica. ISSSTE

Contenido	
INTRODUCCIÓN	3
El Hígado	3
Patologías Hepáticas	5
Regeneración hepática	6
El Factor de crecimiento transformante Beta 1 (TGF-β1)	8
Micro RNAs	10
Micro RNAs en el proceso de fibrosis	12
ANTECEDENTES	13
MiRNAs en la regeneración hepática	13
Expresión de diversos miRNAs durante el proceso de regeneración hepática	14
Antecedentes del miR 149-3p	17
JUSTIFICACIÓN	20
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Cultivo de línea celular	23
Tratamiento con TGF-β1	23
Transfección con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p	23
Extracción de RNA total	24
RT-PCR tiempo real	24
Extracción de proteínas	25
Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot	25
Inmunofluorescencia indirecta	26
RESULTADOS	27
Relocalización de SMAD4 en el núcleo en la línea celular Huh-7 ante el estímulo de TGF-β1	27
Efecto del tratamiento con TGF-β1 en la viabilidad celular	29
Expresión de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ki 67 en células Huh-7 tratadas con TGF-β1	30
Expresión de la proteína PCNA en células Huh-7 tratadas con TGF-β1	31
Expresión del marcador de proliferación celular Ki 67 en células Huh-7 tratadas con TGF-β1	33
Análisis de la expresión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en células Huh-7 tratadas con TGF-β1	35

Análisis de la expresión relativa del miR 149-3p en las células tratadas con mimetizadores e inhibidores de miRNA.....	37
Efecto del mimetismo e inhibición del miR-149-3p en la viabilidad celular	38
Expresión de PCNA en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p	40
Expresión de Ki 67 en células con expresión aumentada y disminuida del miR 149-3p	42
Expresión de HGF en las células transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p	45
Expresión de GSK3-α en células transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p	48
Inmunofluorescencia indirecta de la proteína GSK3-α en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	56
APENDICE	57
Medios de cultivo	57
Soluciones para Western Blot	57
Geles de acrilamida	57
Tris Glicina 10 X	58
Buffer de corrida	58
Buffer de transferencia	58
TBE (10X).....	58
Buffer Laemmlie (2X).....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a las instituciones responsables de la realización de este proyecto; la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el compromiso adquirido en mi calidad de estudiante de esta casa de estudios y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado mediante la beca de estudiante de posgrado. Así como el financiamiento para la realización de este trabajo con el donativo: 183448

De manera muy sincera a la Doctora Martha por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, su compromiso, eterna paciencia y enseñanzas...Gracias Doc.

A mis asesoras la Dra. Sofía y la Dra. Lilia que en todo momento me apoyaron.

A los Profesores del PCG por su apoyo y consejos a lo largo de mi estancia en el posgrado, de cada uno me llevo un aprendizaje invaluable.

A mis compañeros y ahora amigos del laboratorio Vane, Karina, Dani, Bren, Hiraís y Adrián, gracias muchachos.

A mis compañeros del posgrado, por tener siempre una palabra de aliento, especialmente a ti Iraiz.

A mi familia especialmente a Pedro, Lolita, Silvia, Carlos, Rosy y Emi.

Y a mis amigos: Roy, Alan, Rodrigo y Karis

DEDICATORIAS

A mi mama por el amor e infinito apoyo, por no dejarme rendir y mantenerme en el camino correcto.

A mi papá, negro siempre te llevo conmigo

A mi hermano José Carlos

Ayerim gracias por tu más sincero apoyo, por estar conmigo en las buenas y en las no tan buenas, por ser parte de esto ya que sin ti no lo hubiera logrado.

*“No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños”*

Mario Benedetti.

Resumen

En los últimos años el número de casos de enfermedades relacionadas con el hígado ha tenido un aumento considerable a nivel mundial y nacional siendo de vital importancia para el sector salud atender las necesidades de los pacientes que presentan patologías relacionadas con este órgano.

Como un proceso normal, el hígado tiene la capacidad de regenerar el daño o lesión ocasionada por cualquiera de los factores que limiten su función. El proceso de regeneración hepática requiere la participación de una serie de moléculas como factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular, factores de transcripción, entre otros.

En el presente trabajo se aborda la regeneración hepática desde la perspectiva del efecto modulador de la regeneración hepática que se ha descrito para el TGF- β 1. Este factor de crecimiento tiene la capacidad de modular una serie de miRNAs en células hepáticas, los cuales a su vez podrían ser mediadores de los efectos de dicha molécula en el proceso regenerativo. Uno de los miRNAs que disminuye su expresión de manera significativa ante el tratamiento con el TGF- β 1, es el miR-149-3p.

Para determinar si el miR-149-3p es un mediador de la respuesta inducida por el TGF- β 1, primeramente, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se corroboró el efecto anti-proliferativo del TGF- β 1 en la línea celular hepática Huh-7. Posteriormente, se determinó que los mimetizadores del miRNA mencionados inhiben los marcadores de proliferación y los inhibidores tienen el efecto contrario. Además, se determinó que el miR-149-3p modula la expresión de GSK3 α en el contexto de la línea celular Huh-7 corroborando que dicha proteína es un blanco de dicho miRNA y que parte de sus funciones se ejercen a través de dicha molécula.

Por todo lo anterior, se postula que en el contexto de la línea celular de hepatoma humano, la disminución del miR-149-3p en respuesta a TGF- β 1, podría funcionar como un mecanismo de retroalimentación negativa que promueve el efecto contrario al del factor de crecimiento, probablemente como una manera de modular las consecuencias de su actividad.

ABSTRACT

In recent years the number of cases of diseases related to the liver has had a considerable increase worldwide and nationally, being of vital importance for the health sector to meet the needs of patients with pathologies related to this organ.

As a normal process, the liver has the ability to regenerate damage or injury caused by any of the factors that limit its function. The process of hepatic regeneration requires the participation of a series of molecules such as growth factors, extracellular matrix molecules, transcription factors, among others.

In the present study, hepatic regeneration is approached from the perspective of the modulating effect of hepatic regeneration that has been described for TGF- β 1. This growth factor has the ability to modulate a series of miRNAs in liver cells, which in turn could mediate the effects of this molecule in the regenerative process. One of the miRNAs that significantly diminishes its expression before treatment with TGF- β 1 is miR-149-3p.

To determine if miR-149-3p is a mediator of the response induced by TGF- β 1, first, experiments were carried out in which the anti-proliferative effect of TGF- β 1 in the liver cell line Huh-7 was corroborated. Subsequently, it was determined that the aforementioned miRNA mimetics inhibit the proliferation markers and the inhibitors have the opposite effect. In addition, it was determined that miR-149-3p modulates the expression of GSK3a in the context of the Huh-7 cell line corroborating that protein is a target of miR 149-3p and that part of its functions are exerted through molecule.

For all of the above, it is postulated that in the context of the human hepatoma cell line, the decrease of miR-149-3p in response to TGF- β 1, could function as a negative feedback mechanism that promotes the opposite effect of the factor of growth, probably as a way to modulate the consequences of their activity.

INTRODUCCIÓN

El Hígado

El hígado es un órgano que forma parte del sistema digestivo y que está conservado en vertebrados. Ubicado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, está conformado por 4 segmentos: lóbulo izquierdo y lóbulo derecho que a su vez se subdivide en lóbulo cuadrado y lóbulo caudado. (figura 1)(Manuscript & Immunology, 2014).

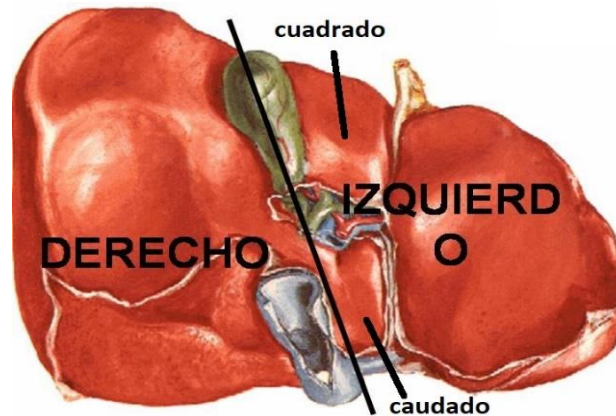


Figura 1. Anatomía del Hígado. Imagen representativa de la organización espacial del órgano y los lóbulos que lo conforman (imagen modificada; Le Vay et al).

Desde el punto de vista histológico el hígado consta de una repetición de su estructura básica llamada lobulillo, los cuales están separados entre sí por tejido conjuntivo. Estos lobulillos tienen forma de prisma poligonal y en corte transversal se observan estructuras hexagonales con una vena central. Entre los lobulillos se encuentra la denominada triado portal la cual está compuesta por vena porta, arteria hepática y conducto biliar (figura 2). Las células parenquimales hepáticas propiamente conocidas como hepatocitos ocupan de un 75 a un 90 % de las células totales en el hígado, estas son las encargadas de dar la función al órgano. Además de éstas también existen células epiteliales las cuales recubren al órgano y la luz de los sinusoides. Otro tipo de células que se encuentran en este órgano son las

llamadas células de Kupffer las cuales son macrófagos que regulan la respuesta inmune dentro del órgano. Otro tipo celular encontrado en el hígado son las llamadas células estelares hepáticas (HSC) o células del Ito, que participan en el proceso de fibrosis re diferenciándose a miofibroblastos y produciendo cantidades importantes de colágeno.

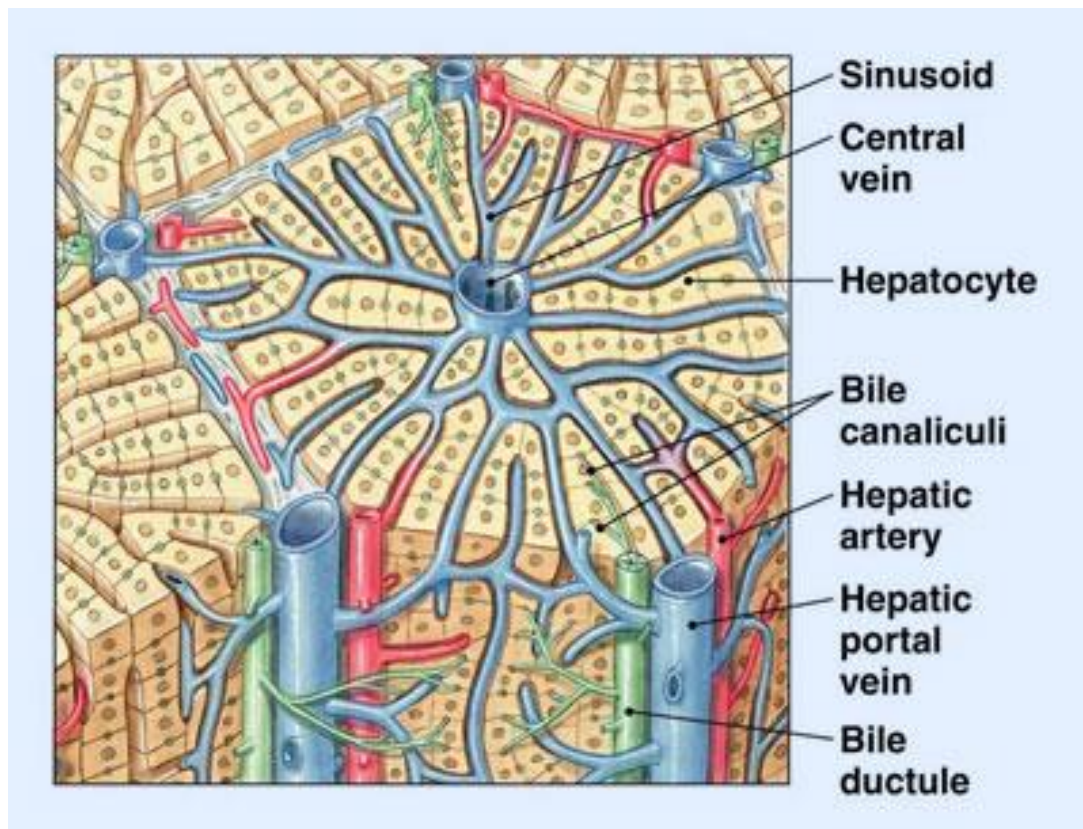


Figura 2. Triada portal. Estructuras que forman la unidad funcional del hígado conocida como lobulillo hepático (Urien & Robles, 2012).

La función del hígado en los vertebrados y particularmente en el humano es la de metabolizar los productos de la digestión a través de la producción de bilis, también es el órgano que principalmente se encarga de la detoxificación de moléculas dañinas para el organismo. Así mismo, dentro de este órgano se encuentra la principal fuente de almacenamiento energético y el metabolismo lipídico.

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en el año 2016 informó que en la población mexicana de 18 a 29 años el cáncer de órganos hematopoyéticos (bazo, ganglio, timo, hígado o médula ósea) causó el mayor porcentaje de muertes por tumores malignos en el periodo de 2011 a 2016.

Actualmente se ha identificado un aumento en el número de casos de cánceres de órganos digestivos (30%) en los últimos años, siendo el cáncer de hígado el segundo lugar y la cuarta causa de muerte en el país en población cuyo rango de edad va de los 30 a los 59 (Narro. et al.)

Patologías Hepáticas

Existen múltiples enfermedades que afectan al hígado, de entre las cuales destacan las enfermedades infecciosas ocasionadas por parásitos, bacterias y virus, y que están ligadas a la falla hepática aguda, como es el caso de la infección por el virus de la hepatitis C, asociada mayormente con una falla hepática aguda (He et al., 2015). Otro factor que enferma a este órgano es el consumo prolongado de alcohol (esteatosis alcohólica) y aquella que no tiene como factor el consumo de este mismo (esteatosis no alcohólica) las cuales en las últimas décadas han presentado un alto índice de mortalidad y morbilidad a nivel mundial que se estima que asciende de un 20 a un 30% de la población mundial (Saberri et al., 2018).

Así mismo, personas que llevan un tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas o que han estado bajo tratamientos farmacológicos prolongados pueden presentar una falla hepática y sus complicaciones. (Yingli He et al., 2015).

Uno de los estados patológicos multifactoriales que afectan al hígado es la cirrosis hepática en el cual la fibrosis es el precursor de esta condición. La etiología de la cirrosis es muy variada, siendo el alcoholismo, la obesidad y la infección crónica por el virus de la hepatitis C las causas más comunes. Podemos definir a la cirrosis como el proceso en donde existe una degradación de las células parenquimales y necrosis de los hepatocitos además de la sustitución del parénquima hepático por tejidos fibróticos (acumulación de matriz extracelular, ECM) formación de nódulos

regenerativos además de pérdida de la función hepática (W. C. Zhou, Zhang, & Qiao, 2014).

Muchos tipos de citocinas y micro RNAs están involucrados en las etapas iniciales y la progresión de la fibrosis, entre estas se encuentran la IL-1, TGF- β 1 y TNF- α que presentan un incremento en su expresión en tejido fibrótico. Por otro lado, el proceso fibrótico conlleva a la activación de las células hepáticas estelares (HSC).

La defenestración y capilarización del espacio sinusoidal de las células endoteliales contribuyen a una falla hepática aguda que lleva a la activación de las células de Kuffer que destruyen a los hepatocitos. A nivel molecular muchas citocinas regulan estos procesos en el hígado como PDGF la cual es una molécula altamente mitogénica presente en las HSCs.

Regeneración hepática

El hígado lleva a cabo procesos que promueven su capacidad regenerativa ante el daño hepático, con lo cual se intenta recuperar la arquitectura y función del órgano. Esta asombrosa particularidad se identificó primeramente en el pez cebra (*Danio rerio*) y desde entonces se han propuesto modelos de regeneración en otras especies de vertebrados como roedores y desde luego en humanos (Huang & Rudnick, 2014).

Cuando el hígado cursa con un proceso patológico, uno de los primeros eventos que ocurren en el órgano es la producción de moléculas proinflamatorias y de aquellas que se requieran para restablecer la arquitectura y la función hepática. Uno de los eventos que se requieren para la reparación del tejido dañado es la secreción de moléculas de matriz extracelular, sin embargo, este proceso debe ser altamente regulado ya que cuando el proceso de regeneración no se está realizando de la manera adecuada, la fibrosis es una consecuencia anómala de éste. La fibrosis se define como un exceso en la cantidad de la ECM que puede conducir a una cirrosis y que además se puede acompañar de eventos

proliferativos descontrolados de las células hepáticas que podrían causar cáncer en el órgano (Caja et al., 2018).

Cuando el daño al hígado es muy grave se recurre al procedimiento conocido como hepatectomía parcial el cual consiste en retirar hasta un 70% del hígado dañado esperando que gracias al proceso regenerativo se restablezca la arquitectura y la función del órgano. En roedores esto puede llevar un periodo de días mientras que en el ser humano una recuperación total de órgano y función se da en un periodo de 3 a 4 semanas.

Propiamente en el proceso de regeneración hepática se han identificado a las células hepáticas estelares como las reguladoras maestras en el proceso. Este tipo celular se diferencia al linaje conocido como miofibroblasto, encargados de producir moléculas como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento epidermal (EGF) además de realizar una transición Epitelio-Mesénquima la cual consiste en una conversión de las células epiteliales a células mesenquimales que favorecen la proliferación celular en el hígado (Oh, Swiderska-Syn, Jewell, Premont, & Diehl, 2018).

En condiciones normales un hepatocito se encuentra en estado quiescente, además de las señales de crecimiento ya mencionadas se necesitan de estímulos que provoquen un cambio en el ciclo celular del hepatocito a una fase de síntesis. Se han identificado a diversas citocinas como IL-6, TNF- α (aumento en la expresión en células de Kupffer de 30 a 120 min después de la hepatectomía parcial) como las principales efectoras de esta actividad estimulando a que la célula hepática entre en fase de síntesis en el ciclo celular (Böhm, Köhler, Speicher, & Werner, 2010).

Este proceso de regeneración debe estar finamente modulado dado que la proliferación exacerbada de las células puede ser contraproducente para el organismo. En estos procesos reguladores se ha identificado a TGF- β 1 como la principal molécula que regula este proceso (Caja et al., 2018).

El Factor de crecimiento transformante Beta 1 (TGF-β1)

El TGF-β1 pertenece a una gran familia de proteínas las cuales se han descrito por su participación en el desarrollo y homeostasis de los tejidos. El TGF-β es una subfamilia de estas proteínas las cuales pueden ser homodiméricas o polipéptidos heterodiméricos cuya función está determinada por el tipo de célula, la condición en la que se encuentre y la presencia o ausencia de otras proteínas. Particularmente, TGF-β1 (una de las tres integrantes de la subfamilia) ha sido identificada en el proceso regenerativo del hígado como una molécula que regula de manera negativa dicho proceso conduciendo al hepatocito a la apoptosis además también se ha identificado a TGF-β1 como una de las principales moléculas que provocan fibrosis en el órgano además de ser la más abundante en el tejido (Figura 3) (Caja et al., 2018).

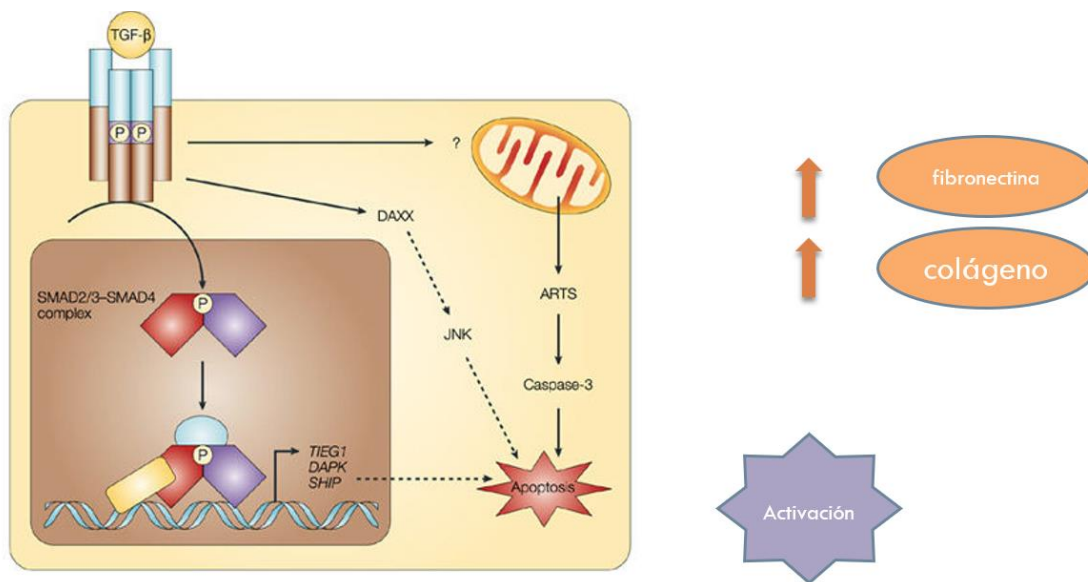


Figura 3. Vía de señalización promovida por TGF-β1. Esquema general de la actividad de TGF-β1 en el hepatocito, la cual promueve una señalización que involucra a las moléculas SMAD que conducen a la transcripción de moléculas necesarias para la fibrosis como fibronectina y colágeno además de DAPK1 que dirige a la célula a apoptosis entre otras. Imagen modificada. (Siegel & Massagué, 2003).

En la matriz extracelular TGF- β 1 se encuentra en estado de latencia debido a la asociación con una proteína llamada Latent TGF- β binding protein (LTBP), la cual reprime su unión al receptor específico. Posteriormente eventos de proteólisis dirigidos por una cantidad importante de activadores de TGF- β 1 como son el : ácido retinoico, factor de crecimiento de fibroblastos, las metaloproteinasas 2 y 5, la trombospondina 1, y algunas activinas, liberan a TGF- β 1 de su estado de latencia haciendo posible su unión a sus moléculas receptoras los cuales son del tipo serin-treonin-cinasas, que orquestan los procesos fosforilación de las proteínas SMAD, propiamente SMAD 2 y SMAD 4 las cuales pueden entrar al núcleo celular y ejercer su función como factor de transcripción.(Böhm, Köhler, Speicher, & Werner, 2010)

Algunos de los genes que son transcritos por la vía de TGF- β 1 y que están implicados en el proceso de regeneración en el hígado son moléculas de la matriz extra células como fribronectina, colágenas, y lamininas (Dimitrova et al., 2017).

Además se han identificado genes que regulan la progresión del ciclo celular por actividad de la vía de señalización de TGF- β 1 los cuales son p15 (Sandhu et al., 1997), p21 y p27 proteínas que regulan la actividad de las CDKs en el ciclo celular (Lee et al., 2013).

Además de TGF- β 1 como una molécula reguladora negativa del proceso proliferativo del hepatocito y por consiguiente de la regeneración del órgano, existen otras moléculas dentro del ambiente celular que han sido identificadas como reguladoras de múltiples procesos biológicos; los micro RNAs.

Micro RNAs

Los micro RNAs (miRNAs) son pequeños RNA no codificantes de una longitud aproximada de 19 a 25 nucleótidos los cuales regulan de manera post-transcripcional por la unión a la región 3' o 5' UTR del RNA mensajero (RNAm) blanco (Schueller et al., 2018). Actualmente, los estudios *in silico* han podido determinar que en todo el genoma humano existen alrededor de 45, 000 sitios posibles de unión de estos miRNAs y que posiblemente estén regulando más del 60% de la expresión de las proteínas expresadas (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009).

La biogénesis de los miRNAs esta iniciada por la RNA pol II quien es la encargada de sintetizar en el núcleo una molécula precursora (pri-miRNA) que pasa por procesos de maduración. El primero de esto ocurre dentro del núcleo cuando DROSHA y DGCR8 cortan al precursor generando una secuencia de RNA de aproximadamente 100 nucleótidos (nt) denominado pre-miRNA, el cual es reconocido por la exportina 5 y de esta manera sale del núcleo hacia el citoplasma celular. Una vez ahí ocurre un segundo evento de maduración de la molécula mediado por el complejo de proteínas DICER y TRBP que cortan al pre-miRNA dejando una sola de las cadenas para que posteriormente la proteína Argonauta sea reclutada y dirija al ya denominado micro RNA a su sitio blanco y se una por complementariedad parcial a la región no traducida (UTR) del RNA mensajero (principalmente a la 3' UTR) y de esta forma sea degradado impidiendo su expresión (Figura 4) (Schueller et al., 2018).

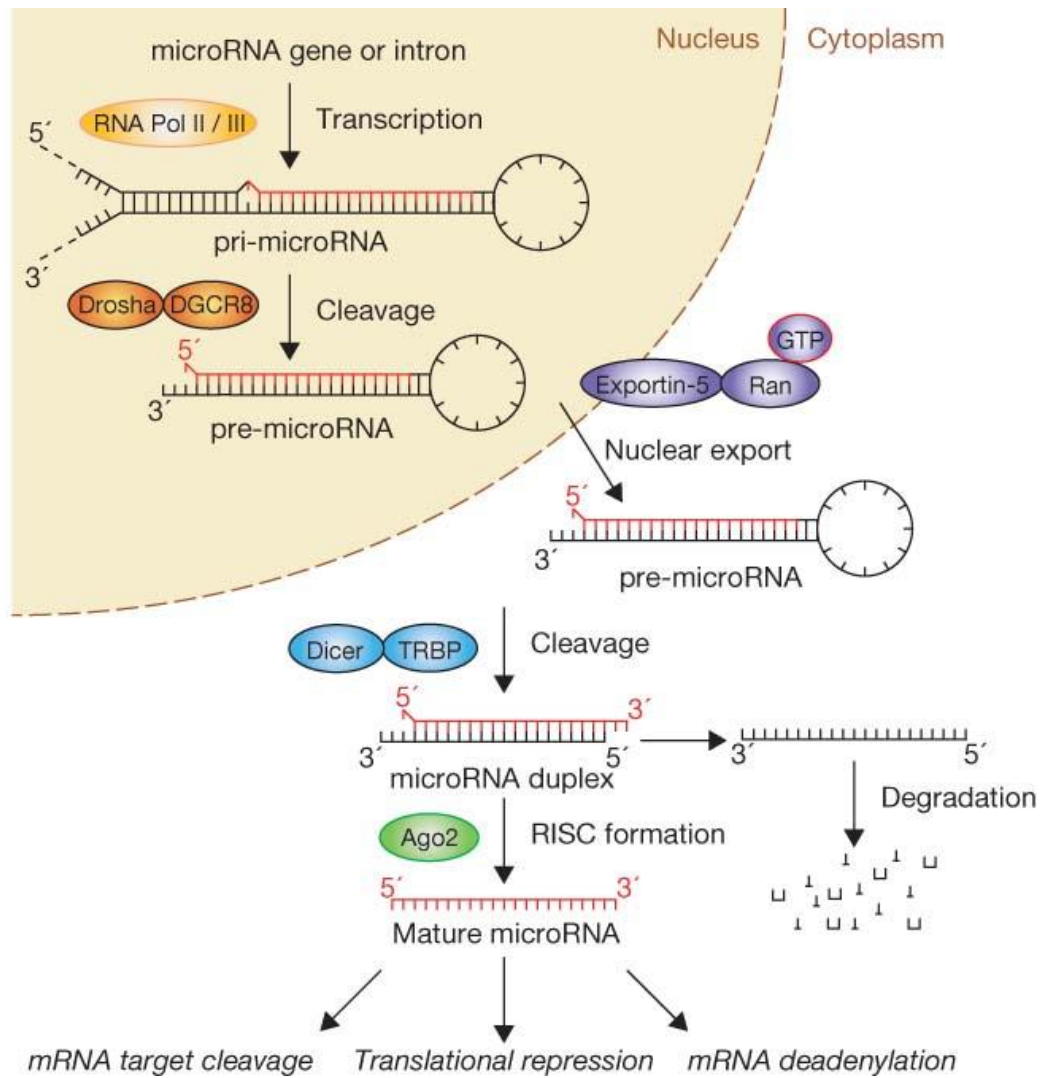


Figura 4. Biogénesis de los miRNAs. Esquema general de la biogénesis de los miRNAs en donde se esquematiza el procesamiento del transcrito primario del RNA y los procesos de maduración de la molécula larga en núcleo hasta su maduración final en el citoplasma para llevar a cabo su función que es regular de manera postranscripcional la expresión genética de los RNA mensajeros (L. He & Hannon, 2004)

Micro RNAs en el proceso de fibrosis

Se ha identificado al miR 21 como un importante regulador en el proceso fibrótico en el hígado el cual puede reducir los niveles de expresión de TGF- β y esto a su vez suprimir la activación de las HCS.

El miR 214-5p está identificado como un potencial inhibidor de la fibrosis por la interacción que tiene con genes como son las metaloproteinasas MMP-2 MMP-9 así como α -SMA las cuales serán moléculas activadoras de las HSCs (W. C. Zhou et al., 2014).

En la tabla 1 se enlistan algunos miRNAs asociados a los procesos fibróticos en el hígado.

miRNA	Blanco	Efecto	Referencia
17-5p	Smad 7	pro	(F. Yu, Guo, Chen, Dong, & Zheng, 2015)
33a	PPAR- α	pro	(Hazra et al., 2004)
122	P4HA1	anti	(Esau et al., 2006)
132	MeCP2	anti	(Mann et al., 2011)
133a	Colágenas	anti	(Roderburg et al., 2013)
214	CTGF	anti	(Chen et al., 2015)

Tabla 1. miRNAs y genes blancos en el proceso de fibrosis. En esta tabla se presentan algunos miRNAs asociados a la fibrosis en el hígado, así como el efecto pro o anti fibrótico.

ANTECEDENTES

MiRNAs en la regeneración hepática.

Actualmente se han identificado diversos miRNAs que se modulan durante el proceso regenerativo del hígado y que podrían estar participando en la regulación de éste. Salehi y cols. realizaron un estudio con roedores a los cuales se les practicó hepatectomía parcial (70%), como modelo de regeneración hepática, para posteriormente determinar el nivel de expresión de los miRNAs. Los resultados indican que existen miRNA que se sobre expresan y otros que disminuyen su expresión en las diferentes fases de regeneración analizadas; (Tabla 2).

miRNAs	Fase de inicio y proliferación	Fase de terminación
miR-16	↓	↓
miR-22	↓	↓
miR-23	↓	↓
miR-24	↓	↓
miR-26a	↓	↓
miR-29	↓	↓
miR-30	↓	↓
miR-21	↑	↓
miR-192	↑	↓
miR-194	↑	↓
miR-203	↑	↓
miR-122	↑	↓

Tabla 2. En esta tabla se presentan los cambios en el nivel de expresión de algunos miRNAs así como la fase de regeneración en la que se encuentra el hepatocito (modificado de Salehi et al).

Expresión de diversos miRNAs durante el proceso de regeneración hepática.

Los miRNAs que participan en la regulación de la regeneración hepática, deben actuar de manera “coordinada” dependiendo la fase en la que se encuentren para una regeneración exitosa y así restablecer la función del órgano. Algunos de estos miRNAs y su actividad en el hepatocito se ejemplifican en la figura 5.

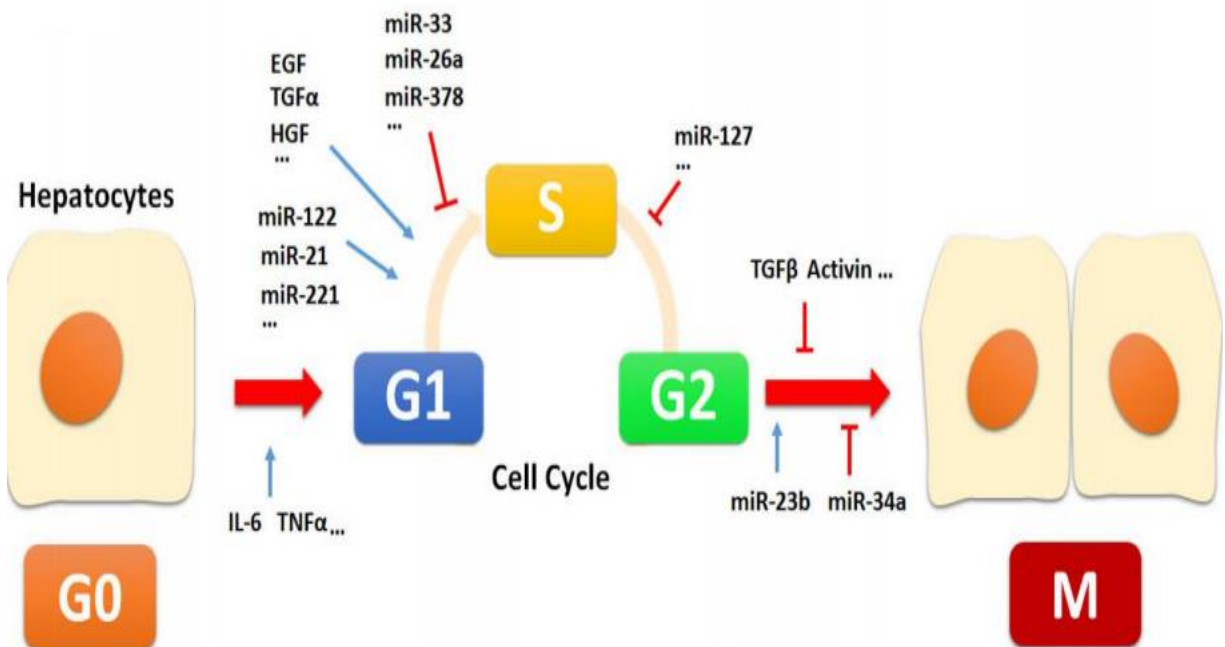


Figura 5. Actividad de los miRNAs en el hepatocito. Los miRNAs participan en el proceso de regeneración hepática conduciendo en la fase inicial a la proliferación de los hepatocitos y en la fase final que lleva a la inhibición de los eventos de multiplicación celular (Schueller et al., 2018).

Es importante enfatizar que la mayoría de estos miRNAs podrían estar involucrados en la regulación del proceso de regeneración del hígado y así estar muy relacionados con la regulación de la progresión del ciclo celular del hepatocito.

Tal es el caso del miR-21, el cual se ha identificado como una molécula que promueve la proliferación del hepatocito en ratones con hepatectomía parcial. En el estudio realizado por Raymond y cols, se observó una disminución en el nivel de expresión del miR-21 a las 18 h post hepatectomía parcial, así la inhibición de dicho miRNA conlleva a un aumento en la expresión de una de sus moléculas blanco, la proteína FoxM1, esencial para la síntesis de DNA en el hepatocito además de que favorece el cambio de fase G1 a S del ciclo celular (Ng, Song, Roll, Frandsen, & Willenbring, 2012).

Otro de los miRNAs identificados como reguladores positivos del proceso de regeneración es el miR-122, que también ha sido postulado como un biomarcador de daño hepático. En los estudios realizados por Yu y cols, se encontró que este miRNA tiene como blanco al RNAm del gen de la proteína HO1 la cual tiene un efecto inhibitorio en la proliferación celular del hígado disminuyendo la actividad de TNF- α e IL-6 cabe mencionar que ambas moléculas son activadoras del ciclo celular (E. Yu & Son, 2016).

Particularmente IL-6 es una proteína que se ha identificado como un importante iniciador del proceso de regeneración y al miR-203 como un regulador de su actividad mediante SOCS3 cuya actividad es bloquear la vía de señalización de IL-6, esto implica que cuando hay un aumento en la expresión del miR-203 se disminuye la expresión SOCS3 y esto inhibe la proliferación y metástasis en células de hepatocarcinoma (Zheng et al., 2017).

Asimismo, existen miRNAs que actúan inhibiendo el proceso de proliferación del hepatocito como es el caso del miR-26a, se ha comprobado que el aumento de dicho miRNA puede disminuir la expresión de las ciclinas D2 y E2. Esto concuerda con el hecho de que la disminución de este miRNA se observa durante la fase

inicial de la regeneración del hígado para posteriormente aumentar su nivel de expresión en la fase de terminación y de este modo sería uno de los factores que ayuda a promover la proliferación en dicha etapa del proceso regenerativo (J. Zhou et al., 2012).

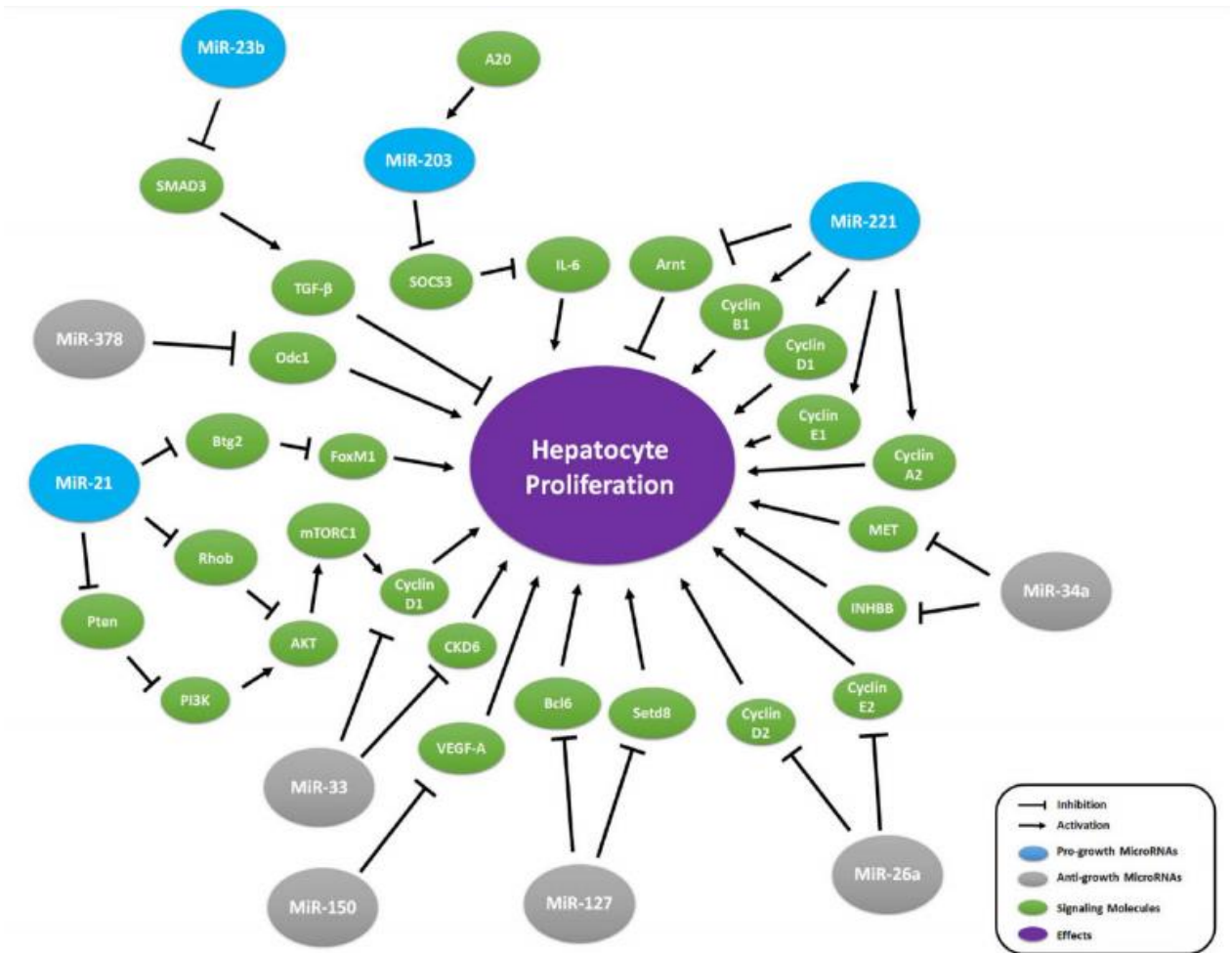


Figura 6. Actividad de algunos de miRNAs en el hepatocito. Se esquematiza el efecto de algunos miRNAs sobre el hepatocito estimulando la proliferación o inhibiéndola. El proceso regenerativo en el hígado es multifactorial, la regulación de estos eventos debe estar finamente modulado en donde los miRNAs tiene un papel fundamental (Zang, Geng, Zhang, & Xu, 2017).

Antecedentes del miR 149-3p

Estudios previos del laboratorio en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1 mostraron interesantemente que uno de los miRNAs que reduce su expresión ante dicho estímulo es el miR 149-3p (figura 7).

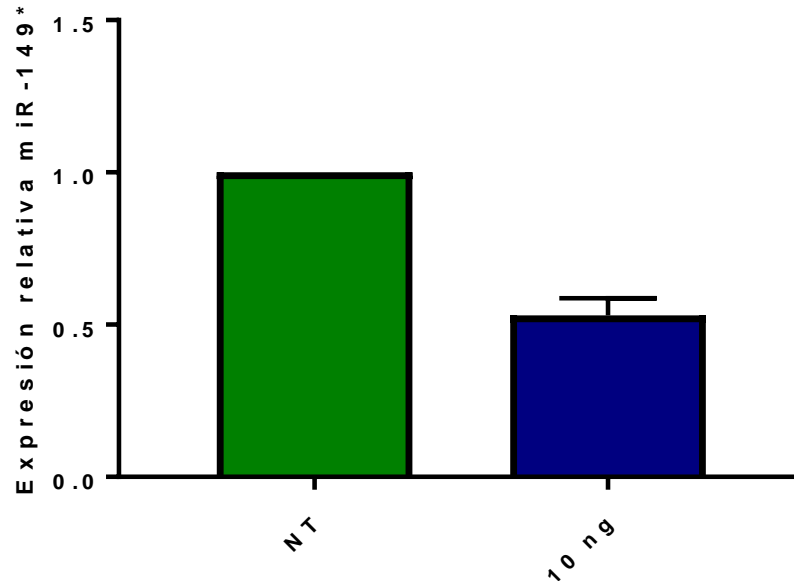


Figura 7. Expresión relativa del miR 149-3p en células Huh-7 estimuladas con TGF- β . Las células Huh-7 fueron tratadas con 10 ng de TGF- β 1 y después de 24 h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar un cDNA para después utilizar una sonda TaqMan específica para el miR-149-3p y amplificarlo (Yocupicio-Monroy, M. et al, en preparación).

El miR 149-3 en el humano esta codificado en la posición 2q37.3 por únicamente un exón. La estructura del miR 149-3p se muestra en la figura 7 (Yunjie He et al., 2017).

El miR 149-3p se ha identificado como una molécula que regula la conversión de grasa parda a grasa blanca durante la exposición a temperaturas bajas (Ding et al., 2016) y que puede regular positiva o negativamente la progresión o metástasis de diferentes tipos de cáncer (Cao et al., 2016). Además, se ha visto que polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que inhiben la expresión de dicho

miRNA son más frecuentes en poblaciones con mayor tendencia a cánceres de origen gastrointestinal, cervical, neuroblastoma, etc (Choupani et al., 2019).

Por otro lado, se ha demostrado que el miR-149-3p puede funcionar como un regulador oncogénico promoviendo la proliferación y reduciendo la apoptosis en células de leucemia linfoblástica aguda (T-ALL) a través de la proteína JunB, y posteriormente regulando a la disminución de la proteína p21, además de regular la ciclina D1, 4EBP1, y p70s6k así todos estos mediadores contribuyen a la capacidad proliferativa de las células en cuestión (Fan et al., 2015).

El miR 149-3p también puede inhibir la expresión de la proteína polo-like-quinasa 1, una molécula reguladora de la progresión del ciclo celular y de la apoptosis. Además, la sobre expresión del miR-149-3p en células de neuroblastoma y en células HeLa indujo la actividad de la caspasa 3/7 promoviendo así la apoptosis e inhibiendo el crecimiento celular. Además, la expresión del miR-149-3p se encontró regulada a la alza en las células U87-MG después del tratamiento de la quinidina, un bloqueador del canal K⁺ controlado por voltaje, lo que lleva a la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis de las células de glioma (Shin et al., 2017).

Con respecto al papel del miR-149-3p en células cancerosas, Lei Jin y cols, detectaron un incremento en la expresión de en células de melanoma, las cuales tienen niveles altos de p53, señalado como promotor de la expresión del miRNA. En este estudio también se determinó que el miRNA tiene como blanco la región 3'UTR del RNAm de GSK3- α , una proteína que regula la fosforilación y la degradación de la molécula anti-apoptótica Mcl -1, así cuando se aumenta el miR-149-3p, disminuye la expresión de GSK3- α , lo que promueve un aumento en Mcl1 y así se produce resistencia a la apoptosis en las células de melanoma. Cabe mencionar que estos mismos autores demostraron que el mecanismo de aumento de dicho miRNA y la modulación de GSK3- α no se da en al menos otras tres líneas celulares de otros tipos de cáncer, por lo que sugieren que dicho comportamiento depende del contexto celular (Figura 8).

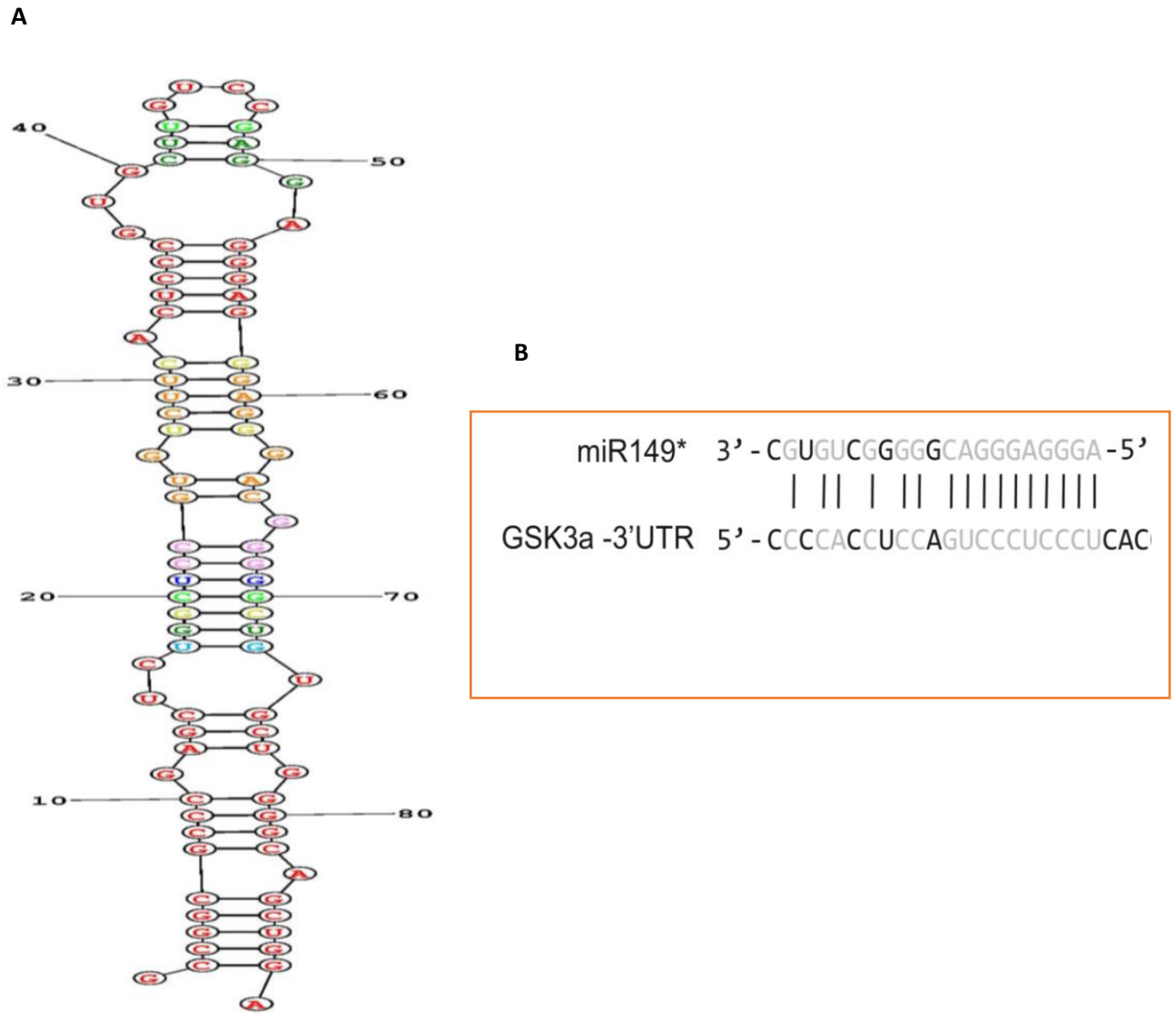


Figura 8. Estructura del miR 149-3p. La figura muestra la secuencia de la región que codifica el miR 149 (A). Resaltado en color rojo se muestra la secuencia que codifica al miR 149-3p (AGG GAGGGA CGG GGG CUG UGC) y la región 3'UTR de GSK3- α (NCC CAC CUC CAG UCC CUC CCU CA) (B).

JUSTIFICACIÓN

El Hígado es un órgano que se ve afectado por diversas patologías, siendo la cirrosis una de las consecuencias más severas. En México se estima que existen de 100,000 a 200,000 pacientes cirróticos y la tendencia de estas cifras es a aumentar en los próximos años. Hasta el momento no se han identificado mecanismos efectivos que aceleren el proceso de regeneración hepática y que se restablezca la función y a su vez que la aplicación de este conocimiento reduzca la tasa de mortalidad y morbilidad en los pacientes. Por lo anterior, es importante conocer los mecanismos moleculares que participan en la regulación del proceso de regeneración hepática teniendo como objetivo el diseño de una terapéutica que ayude a mejorar la condición de los pacientes que cursan con padecimientos hepáticos.

HIPÓTESIS

La inhibición del miR 149-3p en células hepáticas humanas modula la expresión de marcadores de regeneración funcionando como un mediador del estímulo de TGF- β 1.

Objetivo general

- Caracterizar parcialmente el papel del miR 149-3p en el proceso de regeneración hepática

Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de marcadores de regeneración en células hepáticas humanas en presencia de TGF- β 1.
2. Establecer el nivel de la expresión de marcadores de regeneración en células hepáticas humanas con expresión disminuida y aumentada del miR 149-3p.
3. Determinar si la modulación del miR-149-3p correlaciona con una modificación en la expresión de GSK3- α en el contexto de las células hepáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de línea celular

Las células de hepatoma humano Huh-7 fueron cultivadas en placas de 12, 24 o 96 pozos a una densidad de 250,000, 125,000 y 96,000 células por pozo respectivamente en medio Advanced DMEM (Gibco) con glutamina 10mM y antibióticos (Penicilina-Estreptomicina), adicionalmente se complementó con suero fetal bovino al 10% en el caso del mantenimiento de las células y en ausencia de éste en el caso de sembrar las células para los tratamientos con TGF- β 1 o con los inhibidores y mimetizadores de los miRNAs. Las células, se incubaron a 37°C. en presencia de CO₂ al 5%.

Tratamiento con TGF- β 1

Las células Huh-7 sembradas en multiplacas de cultivo y a una confluencia del 80% se les retiró el medio de crecimiento y se realizó un lavado con PBS estéril para después agregar la molécula 5-10ng TGF- β 1 (Peprotech) en medio sin suplementar en incubación por 24 h a 37° al 5% de CO₂.

Transfección con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p

La línea celular fue transfectada con el mimetizador (precursor del miRNA) a una concentración de 15 nM y con el inhibidor (secuencia complementaria al miRNA) a una concentración de 50nM por medio de lipotransfección utilizando el reactivo de SiPORT Amine (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para llevar a cabo la transfección se retiró el medio de crecimiento de las células para posteriormente realizar un lavado con PBS estéril, inmediatamente después agregar la solución con mimetizadores e inhibidores a los pozos con medio sin suplementar. A las 24 h post transfección se retiró el medio de los pozos y se agregó medio completo a las células cultivadas.

Extracción de RNA total

Las células Huh-7 sembradas en placa de 12 pozos se lavaron con PBS y se incubaron con Trizol (Invitrogen, USA) por 5 min, se homogenizaron con micropipeta y se agregó el 20% de volumen de cloroformo; se mezcló y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa y se agregó un volumen de etanol en relación 1:1; posteriormente se depositaron en columnas de afinidad (Zymo Research) y se centrifugaron a 8000 rpm durante 2 min., se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con buffer del fabricante de 600 µL cada uno. Una vez realizados los dos lavados se eluyó el RNA en buffer AVE (QIAGEN) caliente (65°C), se centrifugó a 10,000 rpm y se almacenó a -70°C hasta su uso. La integridad de los RNAs se verificó corriendo una alícuota de 1 µl del extracto en gel de agarosa al 0.8%. La cuantificación del RNA se determinó por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo scientific).

RT-PCR tiempo real

Para los ensayos de RT-qPCR se realizó una amplificación en una sola etapa con el kit QuantiTect Probe RT PCR (QIAGEN) para los marcadores de regeneración (PCNA, GSK3- α y ciclofilina A) utilizando 250ng de RNA, iniciadores específicos para cada uno de los RNAm (tabla 3) y Eva Green (Biotinum). Para evaluar los niveles del miR-149-3p se utilizó una sonda específica para dicha molécula con el kit TaqMan miRNA RT (Applied Biosystems) para el miR 149-3p. Después de la obtención del cDNA se llevará a cabo la PCR usando las sondas TaqMan con el Universal Master Mix II (Applied Biosystems) para el miR-149-3p.

La amplificación se llevó a cabo en el equipo de tiempo real Applied Biosystems 7300 Real Time PCR system

La cuantificación de expresión relativa del mRNA se determinó mediante el análisis de los resultados por el método $2\Delta Ct$, utilizando el gen de PPIA (cat. 4332647) como gen constitutivo de referencia.

Gen	Iniciador	Amplicón	Tm
PCNA	Fw 5´GGC GTG AAC CTC ACC AGT AT3´ Rv 5´TTC TCC TGG TTT GGT GCT TC3´	125 pb	55.5 C°
GSK3-α	Fw 5´GGT CCC CAG CGG GCA CTAC3´ Rv 5´GGT AGG TGT GGC ATC GGT CG3´	99 pb	61 C°

Tabla 3. Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes de PCNA y GSK3-α, en la tabla se muestra el tamaño de los amplicones así como las Tm utilizadas.

Extracción de proteínas

La extracción de proteínas totales se llevó a cabo a partir de la monocapa de las células sembradas en multiplaca de 12 pozos a las cuales se les realizó un lavado con PBS estéril, luego se agregaron 150 µl de buffer Laemmli (Apéndice) a cada uno de los pozos y se dejaron incubando a temperatura ambiente 5 min. Se hirvieron y se almacenaron para su uso posterior.

Inmunodetección de proteínas mediante Western Blot

La separación de las proteínas (30 µg/µl) se hizo en geles de poliacrilamida al 10% se utilizó un buffer alcalino desnaturizante (contenido del buffer al 1x en concentración en una cámara de electroforesis vertical miniProtean II (BIO-RAD) a 80V y temperatura ambiente.

La transferencia de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD) en solución de transferencia de proteínas (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y 10 % de metanol) con ayuda de una cámara de transferencia semi seca (BIO-RAD) a 12V y 300 watts durante 45 min. por gel. Para verificar la transferencia de las proteínas se utilizó la tinción reversible de rojo de Ponceau

La inmunodetección se realizó bloqueando primeramente la membrana con una solución de leche descremada al 10% en PBS durante una hora a 37°C. Posteriormente se incubaron los anticuerpos correspondientes a 4 °C durante toda

la noche, en el caso de a-tubulina (sc-398103) se hizo una dilución de 1:1000 en PBS y en la caso de PCNA (sc pc-10) y GSK3 α (sc-5264) la dilución fue 1:1500 en PBS; Posteriormente, se realizaron 5 lavados con PBS/Triton 0.5% por 5 min. cada uno, luego el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch cat. 115-035-146)) diluido 1:100,000 en PBS que se incubo por una hora a temperatura ambiente; y después se lavaron las membranas 5 veces con PBS /Triton 0.5% por 5 min. Se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el kit West femto maximum sensitivity (Thermofisher) Las imágenes se capturaron y se analizaron en el equipo ChemiDoc (BIO-RAD). El análisis densitometrico de las bandas obtenidas se realizó con el software Image lab ver. 6.0. Los datos obtenidos fueron adicionalmente analizados y graficados con el programa Graph Pad ver. 7.04. 2017.

Inmunofluorescencia indirecta

Las células Huh-7 se sembraron en placas de 24 pozos (125,000 células/pozo) los cuales contenían cubreobjetos de 13 mm de diámetro. Después de los distintos tiempos post-tratamiento, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 min. Se permeabilizaron con acetona fría por 2 min, se realizó un lavado con PBS 1X y se bloquearon con SFB al 10% por 2 h a TA. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios requeridos toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios anti-Ki67 (Cell Signaling cat. D3B5) anti-GSK3 α (sc-5264) y anti-HGF (sc-374422) se utilizaron a una dilución 1:100 en PBS. Luego, se realizaron 5 lavados de 5 min con PBS y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados a Alexa 488 (Jackson Immunoresearch) durante 1 h a TA en oscuridad. Se realizaron 5 lavados adicionales con PBS y se tiñeron los núcleos con DAPI-vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes fueron adquiridas usando el equipo microscopio LSM 700 y se analizaron con el software Zen Blue ver. 2.5.

RESULTADOS

Relocalización de SMAD4 en el núcleo en la línea celular Huh-7 ante el estímulo de TGF- β 1

La proteína SMAD4 participa en la vía de señalización de TGF- β 1 reconociendo al complejo formado por SMAD2/SMAD3, el cual es formado después de la unión de dicho factor de crecimiento a su receptor de superficie celular. SMAD4 dirige al complejo al núcleo de la célula y de esta manera actúan como factor de transcripción para promover la expresión de diversas moléculas que son conocidas por ser inducidas por TGF- β 1. De esta forma, la localización de SMAD4 en el núcleo celular nos indicaría que la línea celular Huh-7 responde ante el estímulo de TGF- β 1, lo cual fue determinado mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo anti-SMAD4 (Figura 9).

Los resultados obtenidos muestran que hubo un aumento en la detección de SMAD4 nuclear en las células tratadas con TGF- β 1 comparadas con aquellas no tratadas. Las imágenes obtenidas en los ensayos de inmunofluorescencia se sometieron a un análisis semi-cuantitativo usando el software Zen Blue (Carl Zeiss) y los resultados nos muestran que el aumento de aproximadamente tres veces en la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 es estadísticamente significativo. Por lo tanto, se puede concluir que las condiciones del tratamiento estaban efectivamente induciendo la vía de señalización esperada y así se podía continuar con los experimentos para caracterizar otros de los efectos esperados del factor de crecimiento en las células Huh7.

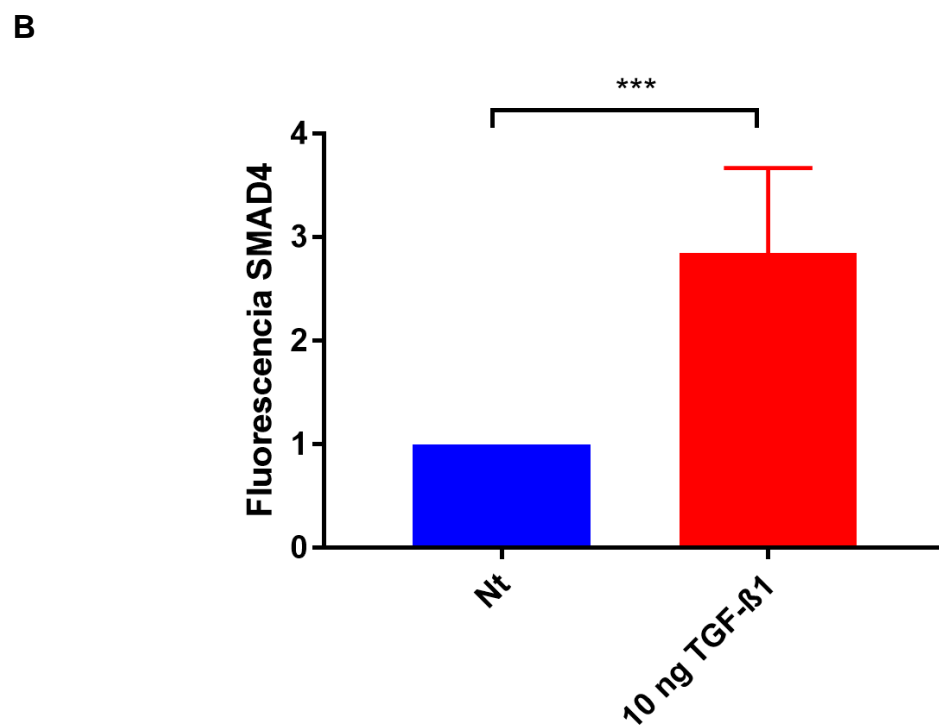
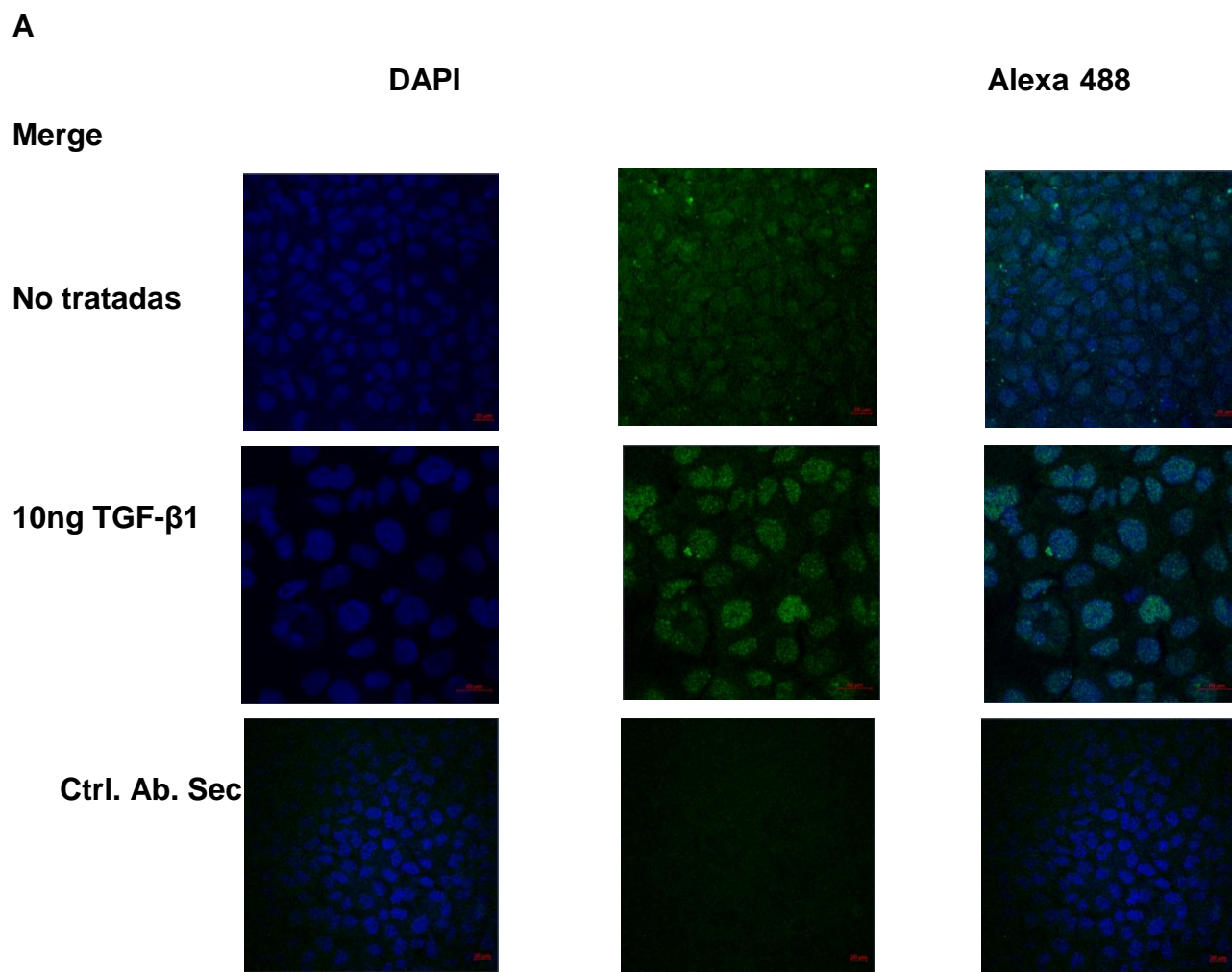


Figura 9. Relocalización de SMAD4 en células Huh-7 ante el estímulo de TGF-β1.

Las células Huh7 fueron tratadas con 10 ng de TGF-β1 y 24h después de la inducción se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-SMAD4, luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488, finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI y se fijaron. Las barras al pie de las imágenes corresponden a 20µm (A). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 se cuantificó usando el software Zen Blue (Carl Zeiss). Los datos con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (B).

Una vez que se observó que la línea celular es sensible ante el estímulo de TGF-β1 se prosiguió a realizar los ensayos de viabilidad celular (MTS) así como el análisis de expresión de los marcadores de proliferación celular mediante PCR en tiempo real (PCNA), Western Blot (PCNA) e inmunofluorescencia (Ki 67) además del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF).

Efecto del tratamiento con TGF-β1 en la viabilidad celular

Para observar el efecto del TGF-β1 en la viabilidad las células Huh-7, estas fueron tratadas por 24 h con 5 y 10ng de TGF-β1 y adicionalmente se evaluó un control positivo de muerte celular como es el cisplatino; un quimioterapéutico ampliamente usado cuyo efecto anti proliferativo ha sido bien descrito (Figura 10). Esto último con la finalidad de tener evidencia de que el ensayo de MTS estaba siendo realizado adecuadamente. La viabilidad celular se determinó mediante un ensayo de MTS mediante el cual se encontró una disminución del 20% y 35% de la viabilidad celular después del tratamiento con 5 y 10ng de TGF-β1 (respectivamente) respecto al control no tratado siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$). Así mismo, tal como se esperaba, la viabilidad de las células tratadas con 50 y 100 µM de Cisplatino disminuyó en un 55 % y 76 % respectivamente con respecto a control no tratado.

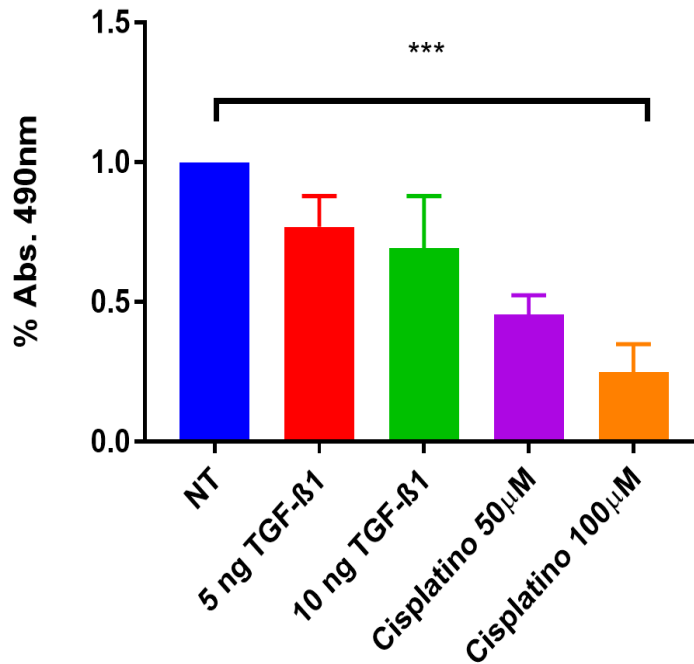


Figura 10. Determinación de la viabilidad en las células tratadas con TGF-β1 en Huh-7. Las células Huh7 fueron no tratadas (NT), tratadas con 5 y 10 ng de TGF-β1 o con 50 y 100 μM de Cisplatino y después de 24 h se llevó a cabo el ensayo de MTS. Los resultados obtenidos de tres experimentos independientes se graficaron y analizaron con el programa Graphpad Prism usando la prueba ANOVA en la que se consideró estadísticamente significativo $p \leq 0.05$ (*).

Expresión de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ki 67 en células Huh-7 tratadas con TGF-β1

El siguiente análisis fue evaluar el nivel de expresión de un marcador de proliferación o de progresión del ciclo celular con la finalidad de corroborar la capacidad anti-proliferativa del TGF-β1, en este caso como consecuencia del tratamiento realizado sobre las células Huh7. Por lo anterior, para denotar la progresión del ciclo celular se llevó a cabo la detección de dos marcadores de proliferación como lo son el antígeno de proliferación celular (PCNA) y Ki67.

La expresión relativa del RNAm de PCNA en células tratadas con TGF-β1 se llevó a cabo mediante RT-PCR en tiempo real usando iniciadores específicos para dicho mensajero y como control de normalización se llevó a cabo la determinación de la expresión de Ciclofilina A (PPIA). El cálculo de la expresión relativa se determinó mediante el método comparativo de Ct (threshold cycle) con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Como se muestra en la Figura 11, la expresión relativa del RNAm de PCNA fue menor en los extractos de RNA total correspondientes a las células tratadas con TGF- β 1 con respecto a los extractos de las células no tratadas.

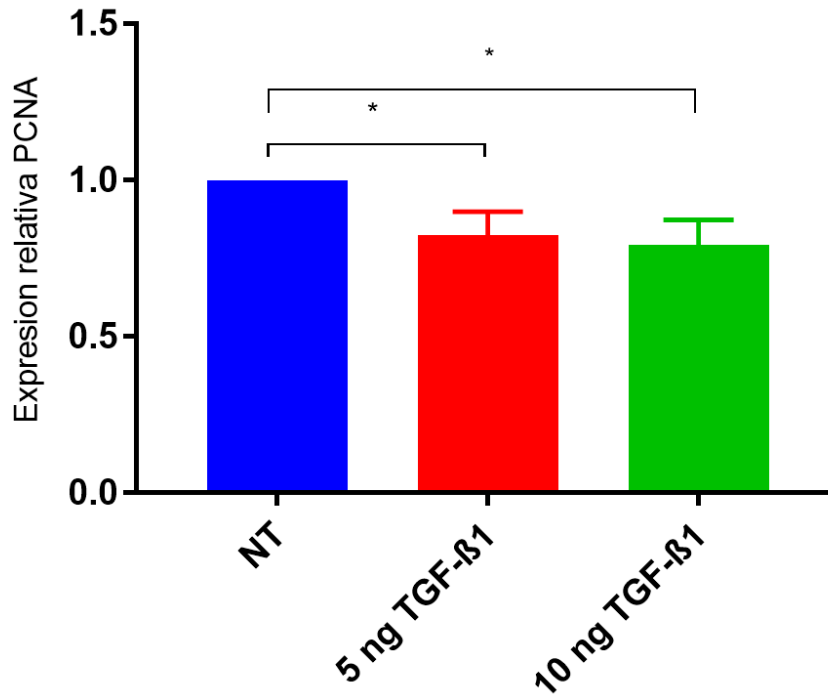


Figura 11. Expresión relativa de PCNA en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1. Las células Huh-7 fueron no tratadas (NT), tratadas con 5 y 10 ng de TGF- β 1 y después de 24 h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar RT-PCR en tiempo real con iniciadores específicos para el RNAm de PCNA y PPIA como control de normalización. La expresión relativa se calculó mediante el método de $2\Delta\Delta Ct$ y los resultados obtenidos de tres experimentos independientes se graficaron y analizaron usando la prueba de t en la que se consideró $p \leq 0.05$ (*).

Expresión de la proteína PCNA en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1

Por otro lado, el nivel de expresión PCNA como proteína partiendo de los extractos totales de proteínas de las células tratadas con 5 y 10 ng de TGF- β 1, en los cuales mediante un ensayo de Western blot se observó una disminución en la detección de PCNA en ambos casos comparadas con el control, siendo más marcada en el tratamiento con 10 ng del factor de crecimiento (Figura 12A). Las imágenes obtenidas de tres experimentos independientes fueron analizadas mediante

densitometría para cuantificar las diferencias en la expresión protéica para lo cual se utilizó la expresión de α -tubulina en la normalización de la expresión. En la figura 12B se muestra mediante un gráfico que el tratamiento de las células con 10 ng de TGF- β 1 promueve una disminución estadísticamente significativa del 53 %, mientras que la disminución observada en el tratamiento con 5 ng resultó no tener significancia estadística.

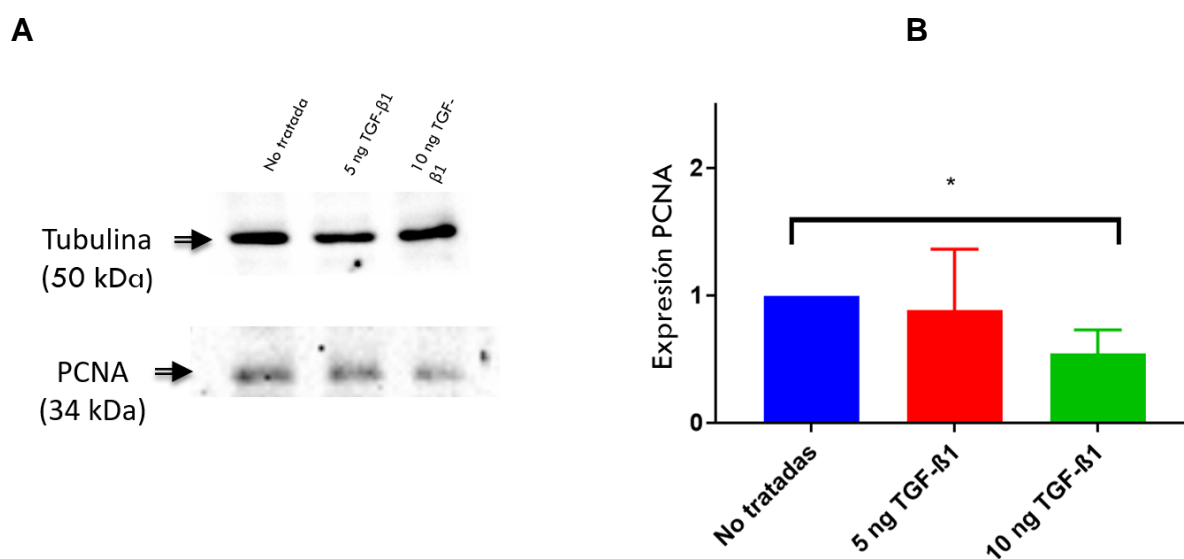


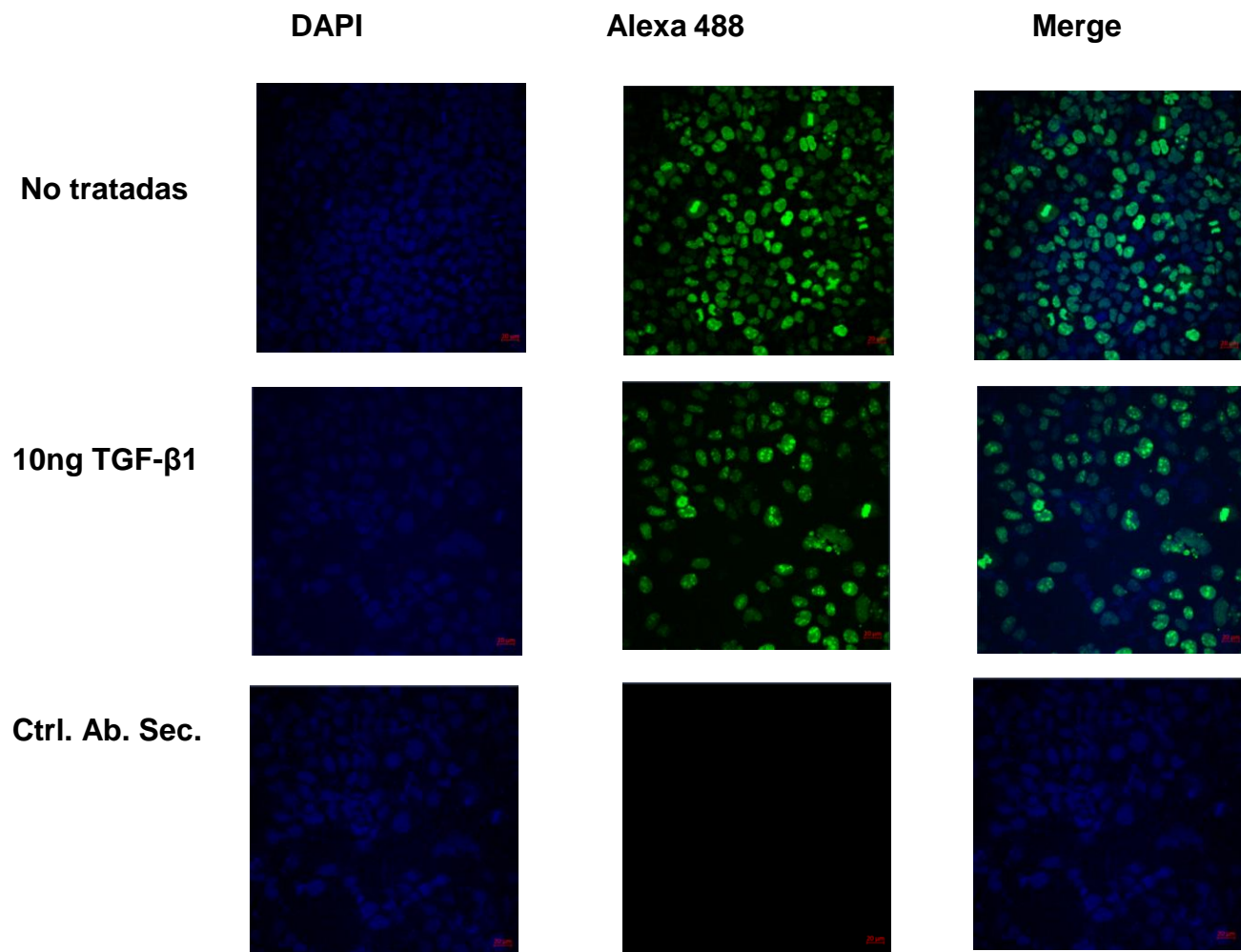
Figura 12. Expresión de PCNA en células Huh-7 en células tratadas con TGF- β 1. Las células Huh-7 fueron tratadas con TGF- β 1 [10ng] y los controles no tratados y 24h después de la inducción fueron extraídas las proteínas totales. Las muestras fueron separadas en SDS-PAGE y transferidas en membrana de nitrocelulosa. Estas fueron incubadas con un anticuerpo anti-PCNA y después con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano y fueron reveladas por quimioluminiscencia (**A**). Los experimentos se realizaron por triplicado, el análisis de la señal emitida se cuantificó usando el software ImageLab (ver. 6.0.1). Los datos se analizaron y graficaron con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (**B**).

Expresión del marcador de proliferación celular Ki 67 en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1

Adicionalmente se eligió un segundo marcador de proliferación celular, la proteína Ki 67, la cual únicamente se expresa en núcleo cuando las células se están dividiendo, ya que su función es facilitar la condensación de los cromosomas en la interfase del ciclo celular.

Los resultados obtenidos muestran que hubo una disminución en la detección de Ki 67 en las células tratadas con TGF- β 1 (54%) comparadas con aquellas que no tratadas. (Figura 13) Las imágenes obtenidas en los ensayos de inmunofluorescencia se sometieron a un análisis semi-cuantitativo usando el software Zen Blue (Carl Zeiss) y los resultados nos muestran que la disminución en la fluorescencia emitida por Alexa 488 es estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con lo obtenido con anterioridad, existe una disminución de los marcadores de proliferación en las células Huh-7 que fueron tratadas con TGF- β 1.

A



B

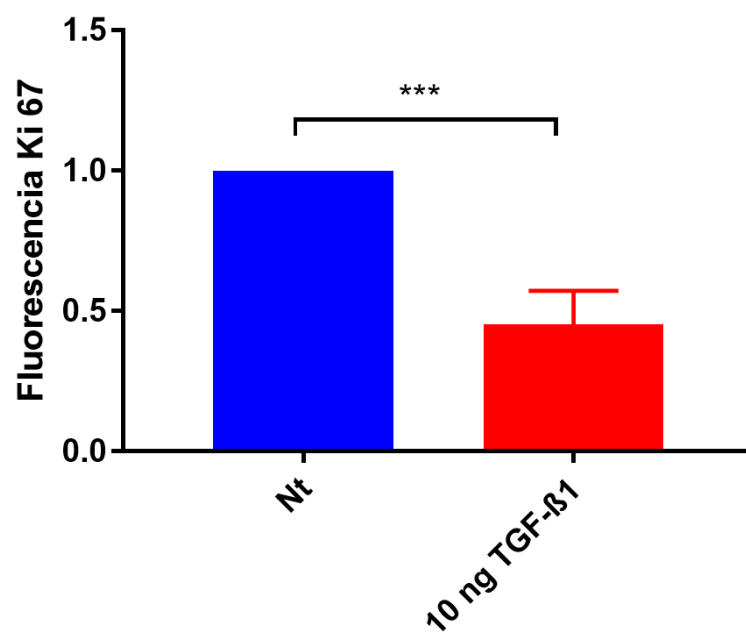


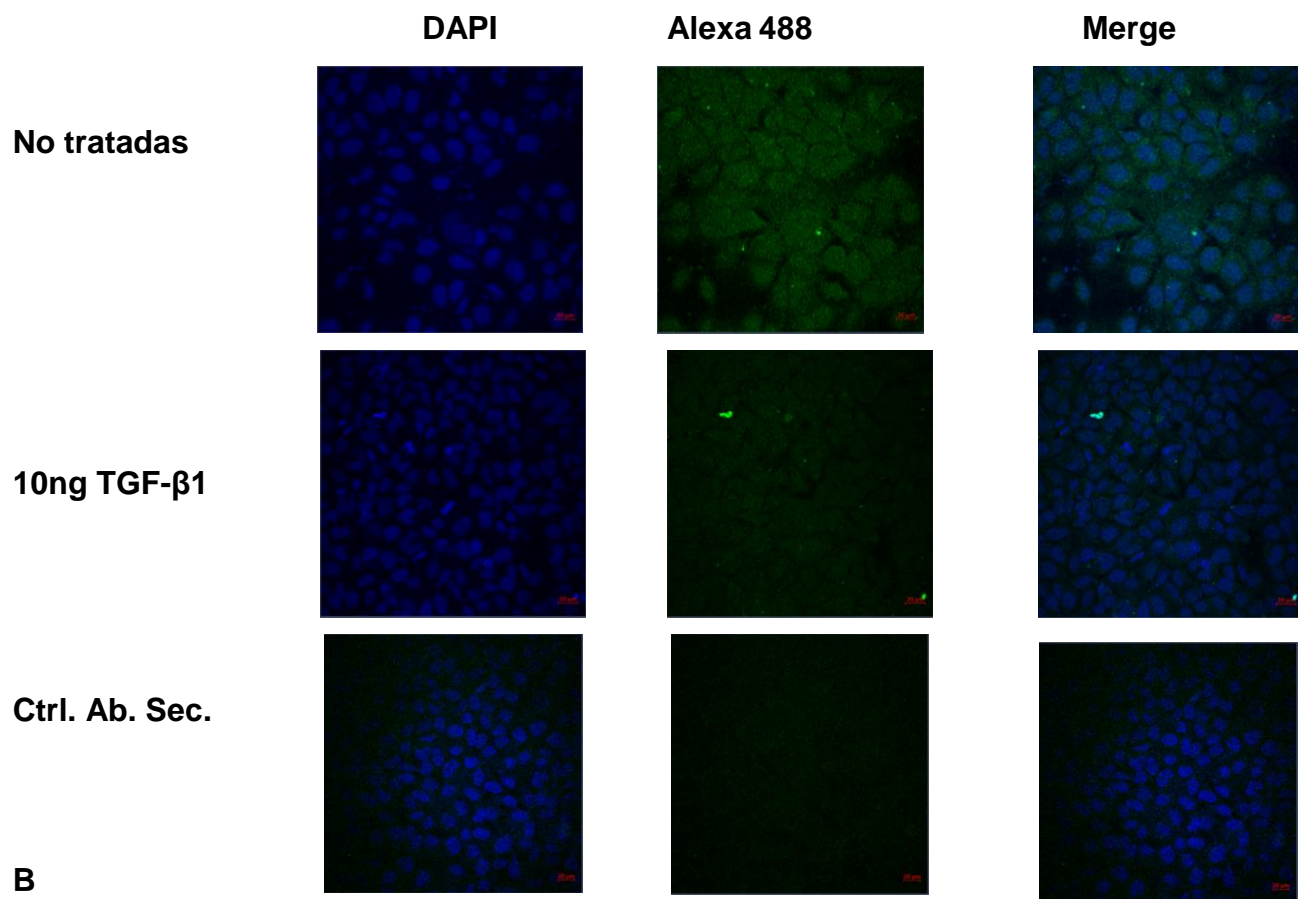
Figura 13. Expresión de Ki 67 en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1. Las células Huh-7 fueron tratadas con 10 ng de y 24 después de la inducción se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-Ki 67, luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488, finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI y se fijaron (**A**). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 se cuantificó usando el software Zen Blue (Carl Zeiss). Los datos graficaron y analizaron con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (**B**).

Análisis de la expresión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1

Además de evaluar los marcadores de proliferación anteriormente señalados, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para la detección del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) el cual durante los eventos proliferativos propios de la célula hepática aumenta su expresión.

Los resultados de estos ensayos mostraron concordantemente una disminución de la expresión del factor de crecimiento (62%) cuando las células fueron tratadas con el TGF- β 1 comparado con los controles no tratados (Figura 14). Los resultados obtenidos corroboran lo observado en los ensayos anteriores en los que se muestra el comportamiento anti-proliferativo del tratamiento en la línea celular Huh-7 tratada con TGF- β 1.

A



B

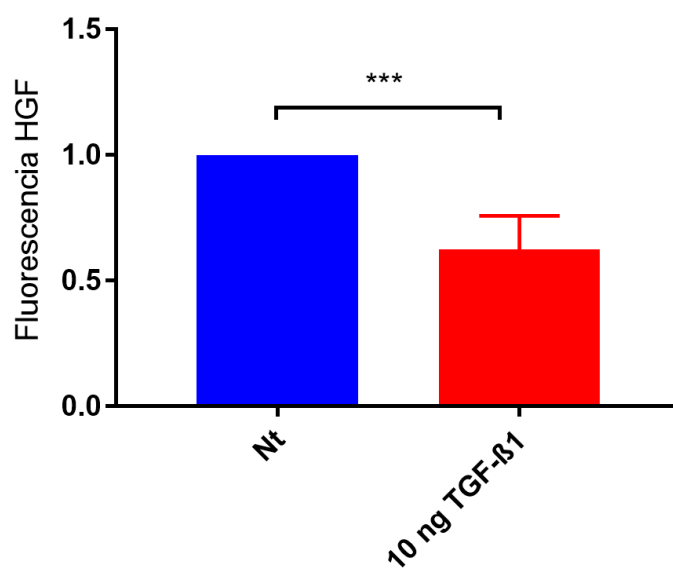


Figura 14. Expresión de HGF en células Huh-7 tratadas con TGF- β 1. Las células Huh-7 fueron tratadas con 10 ng de y 24 después de la inducción se fijaron y se incubaron con un anticuerpo HGF, luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488, finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI y se fijaron (**A**). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 se cuantificó usando el software Zen Blue (Carl Zeiss). Los datos se graficaron y analizaron con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (**B**).

Análisis de la expresión relativa del miR 149-3p en las células tratadas con mimetizadores e inhibidores de miRNA

Como se mencionó anteriormente uno de los miRNAs que disminuye su expresión ante el estímulo de TGF- β 1 es el miR-149-3p, por este motivo se planteó el objetivo de determinar los efectos del aumento o la inhibición de dicho miRNA en la expresión de marcadores de regeneración, así como en la viabilidad celular.

Con la finalidad de llevar a cabo los experimentos de modulación de la expresión del miR 149-3p se transfectaron las células Huh-7 con los 15 μ M de los mimetizadores y 50 μ M de los inhibidores de dicho miRNA. Después de 24h de transfección se hicieron extractos de RNA para determinar el nivel de expresión del miR-149-3p mediante RT-PCR en tiempo real.

Como se puede observar en la Figura 15, la transfección de los mimetizadores resultó en un aumento considerable en la expresión del miR-149-3p en las células tratadas con respecto al control, así como una disminución aproximada del porcentaje en las células transfectadas con el inhibidor de dicho miRNA con respecto a los controles. En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas. Así los resultados nos indican que los experimentos de mimetismo e inhibición efectivamente aumentan y disminuyen el miR-149-3p respectivamente,

con lo cual se puede proseguir con los experimentos para determinar el efecto de dicho miRNA en la viabilidad celular.

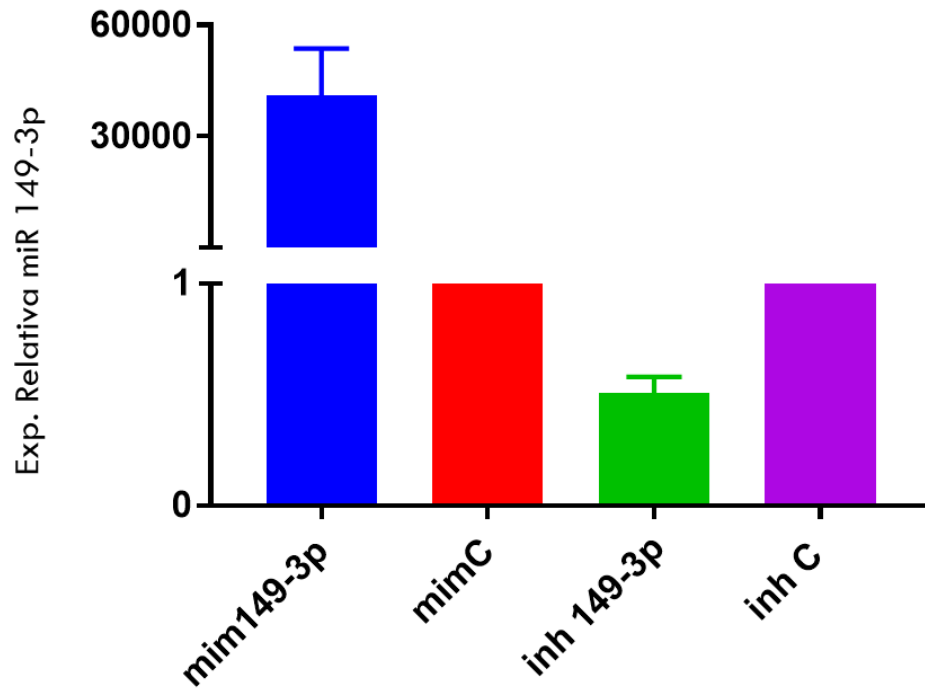


Figura 15. Expresión relativa del miR 149-3p en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miRNA. Las células Huh-7 fueron transfectadas con el mimetizador del miR 149-3p (mim 149-3p) y el inhibidor del miR 149-3p (inh 149-3p) así como sus respectivos controles (mim C e Inh C) y después de 48h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar un cDNA para después utilizar una sonda TaqMan específica para el miR 149-3p y amplificarlo. El nivel de expresión relativa se calculó con el $2\Delta Ct$ usando al RNA 18s como normalizador. Los resultados de tres experimentos independientes se analizaron con el programa GraphPad Prism 7 usando la prueba de t en la que se consideró $p \leq 0.05$ (*).

Efecto del mimetismo e inhibición del miR-149-3p en la viabilidad celular

Las células Huh-7 transfectadas con los mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p se utilizaron para determinar la viabilidad celular después de 24 h de transfección. Las células tratadas con el mimetizador del miR-149-3p mostraron una disminución en la cantidad de células viables (10%) que fue estadísticamente significativa cuando se compara con a las tratadas con el mimetizador control. Por

otro lado, el tratamiento de las células con los inhibidores del miR-149-3p produjo un incremento estadísticamente significativo (11%) de la viabilidad celular con respecto a la correspondiente al tratamiento con el inhibidor control (figura 16). El análisis de los resultados obtenidos nos indica que el miR-149-3p puede modular la viabilidad celular y así participar en los eventos proliferativos de las células hepáticas. Además, los datos obtenidos en los experimentos de inhibición del miRNA nos conducen a la idea de que éste RNA pequeño está participando como modulador positivo de la viabilidad celular, lo cual implicaría que funciona como parte de un circuito de retroalimentación negativa en el contexto de los efectos del TGF- β 1

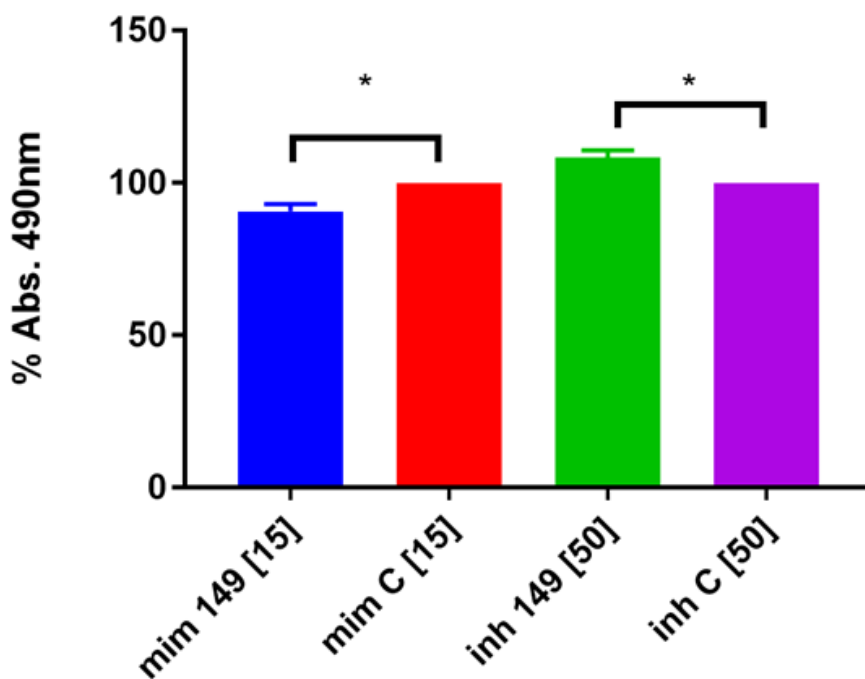


Figura 16. Viabilidad celular en las células Huh-7 tratadas con los mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p. Las células Huh7 fueron transfectadas con 15 μ m de los mimetizadores del mir-149-3p (mim 149) y 50 μ m de los inhibidores de miR-149-3p (inh 149) así como sus respectivos controles (mim C e inh C) y después de 24 h se llevó a cabo el ensayo de MTS. Los resultados obtenidos de tres experimentos independientes se graficaron y analizaron con el programa Graphpad Prism usando la prueba ANOVA en la que se consideró estadísticamente significativo $p \leq 0.05$ (*).

Expresión de PCNA en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p

Otra de las estrategias para determinar el efecto del miR-149-3p en la regeneración hepática fue la determinación de la expresión de marcadores de proliferación celular, para cumplir este propósito se buscó evaluar la expresión de PCNA, Ki67 y HGF mediante diferentes tipos de ensayos.

Primeramente, se evaluó el nivel de expresión del RNAm y la proteína de PCNA en células Huh-7 transfectadas con los mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p.

Así, se llevaron a cabo los ensayos de RT-PCR en tiempo real partiendo del RNA total de las células sometidas a los tratamientos de mimetismo e inhibición del miR-149-3p durante 48 h. El nivel de expresión del RNAm de PCNA disminuye en 44% en las células tratadas con el mimetizador específico comparado con el nivel detectado en el control y por el contrario, el tratamiento con el inhibidor del miR-149-3p produjo un aumento de 70% en la expresión de dicho mensajero con respecto al control (Figura 17).

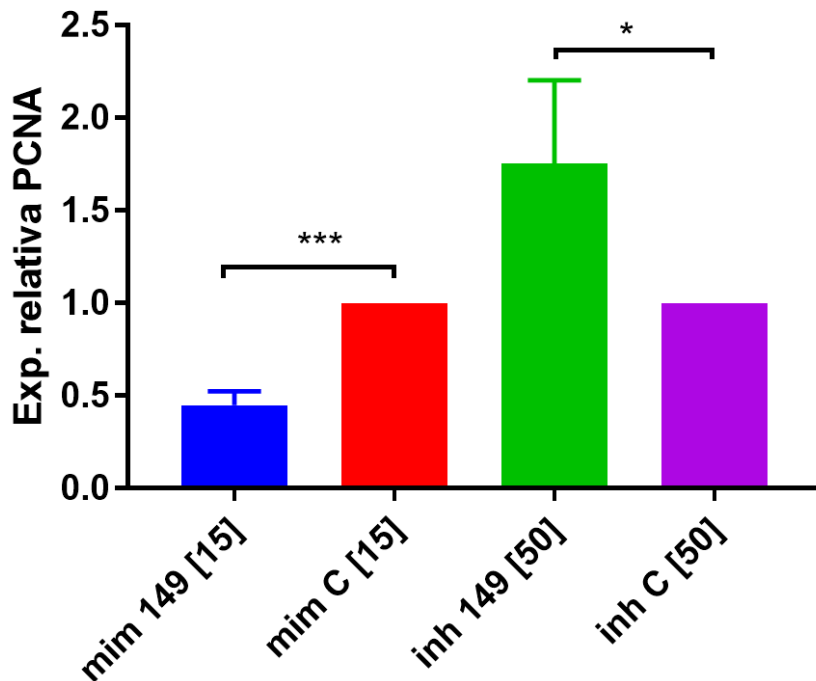


Figura 17. Expresión relativa de PCNA en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p. Las células Huh7 fueron transfectadas con 15 μ m de los mimetizadores del mir 149-3p (mim 149) y 50 μ m de los inhibidores de miR-149-3p (inh 149) así como sus respectivos controles (mim C e inh C) y después de 48 h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar RT-PCR en tiempo real con iniciadores específicos para el RNAm de PCNA y PPIA como control de normalización. La expresión relativa se calculó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los resultados obtenidos de tres experimentos independientes se graficaron y analizaron usando el programa Graphpad Prism prueba de t en la que se consideró $p \leq 0.05$ (*) como estadísticamente significativa.

En el caso de la determinación del nivel de expresión de PCNA mediante ensayos de Western Blot se observó que existe una disminución en la cantidad de dicha proteína cuando se compara con el tratamiento control, sin embargo, en el caso del tratamiento con los inhibidores la diferencia en la expresión con respecto al control fue muy sutil (Figura 18).

Las imágenes obtenidas se sometieron a un análisis densitométrico para cuantificar las diferencias de expresión detectadas y los resultados indican que los mimetizadores disminuyen significativamente la expresión de PCNA (65%) con

respecto al control y en caso del tratamiento con los inhibidores la diferencia entre ambos tratamientos no resultó estadísticamente significativa (Figura 18B).

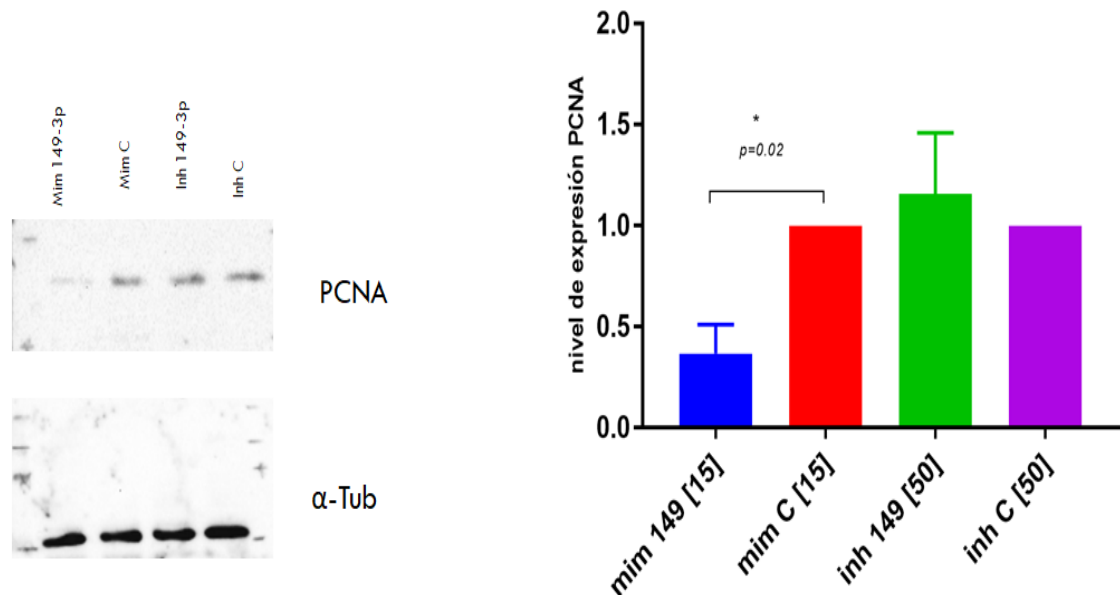


Figura 18. Expresión de la proteína PCNA en células Huh-7 en células tratadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p.

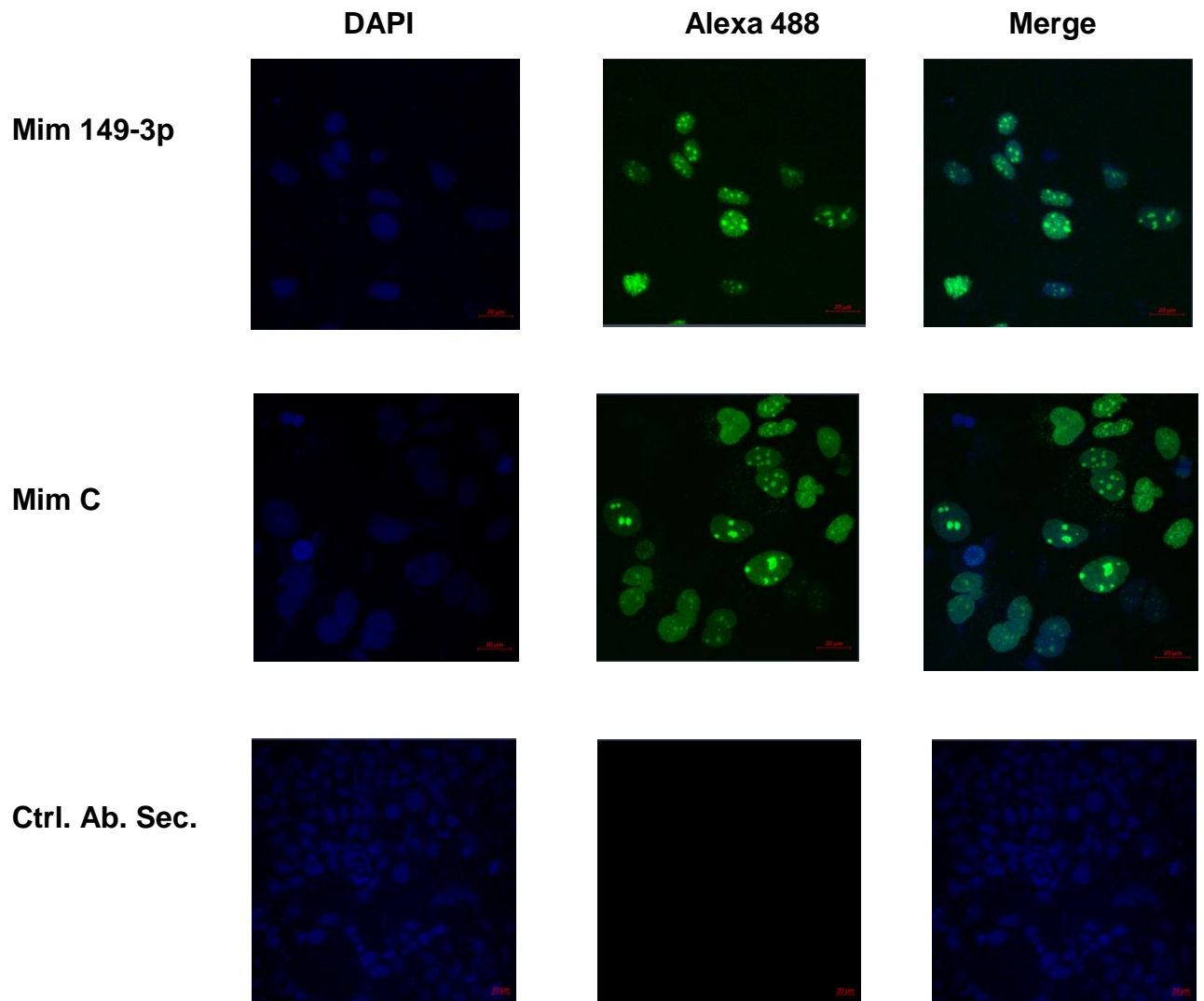
Las células Huh-7 fueron tratadas con los mimetizadores [15µM] y con los inhibidores [50µM] del miR 149-3p (mim 149-3p e inh 149-3p, respectivamente) y los controles (mim C e inh C) después de 48 de transfección fueron extraídas las proteínas totales. Las muestras se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa y después incubarlas con un anticuerpo específico anti-PCNA y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa y finalmente se reveló mediante quimioluminiscencia(A). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de las imágenes capturadas se cuantificó usando el software ImageLab (ver. 6.0.1) Los datos con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (B).

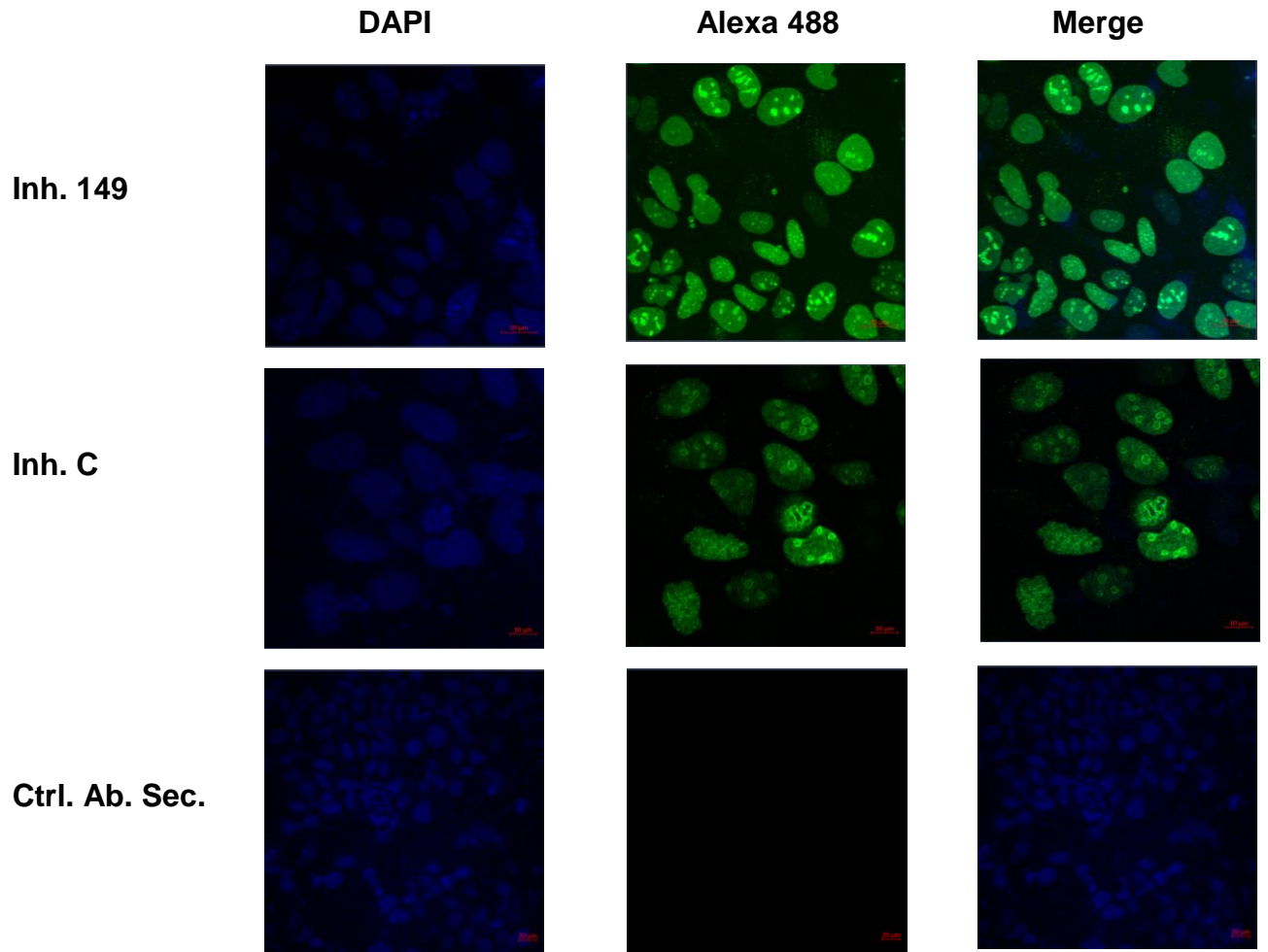
Expresión de Ki 67 en células con expresión aumentada y disminuida del miR 149-3p

Adicionalmente se realizaron inmunofluorescencias para determinar el nivel de expresión del marcador de proliferación Ki67 en células transfectadas con los mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p (Figura 19). La expresión de Ki67 en células tratadas con los mimetizadores se vio reducida en un 46% respecto a sus

controles, respecto las transfecciones con los inhibidores el aumento de la fluorescencia del Alexa 488 fue del 113%

A





B

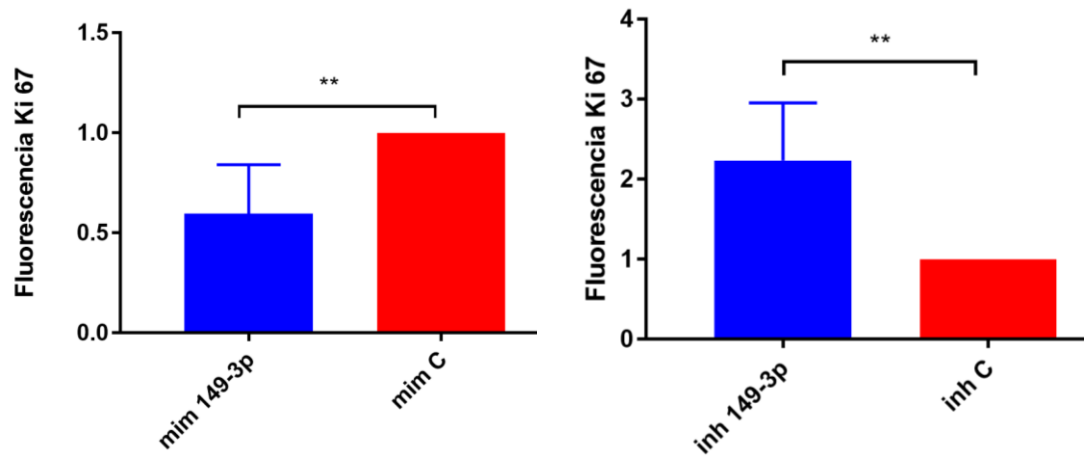
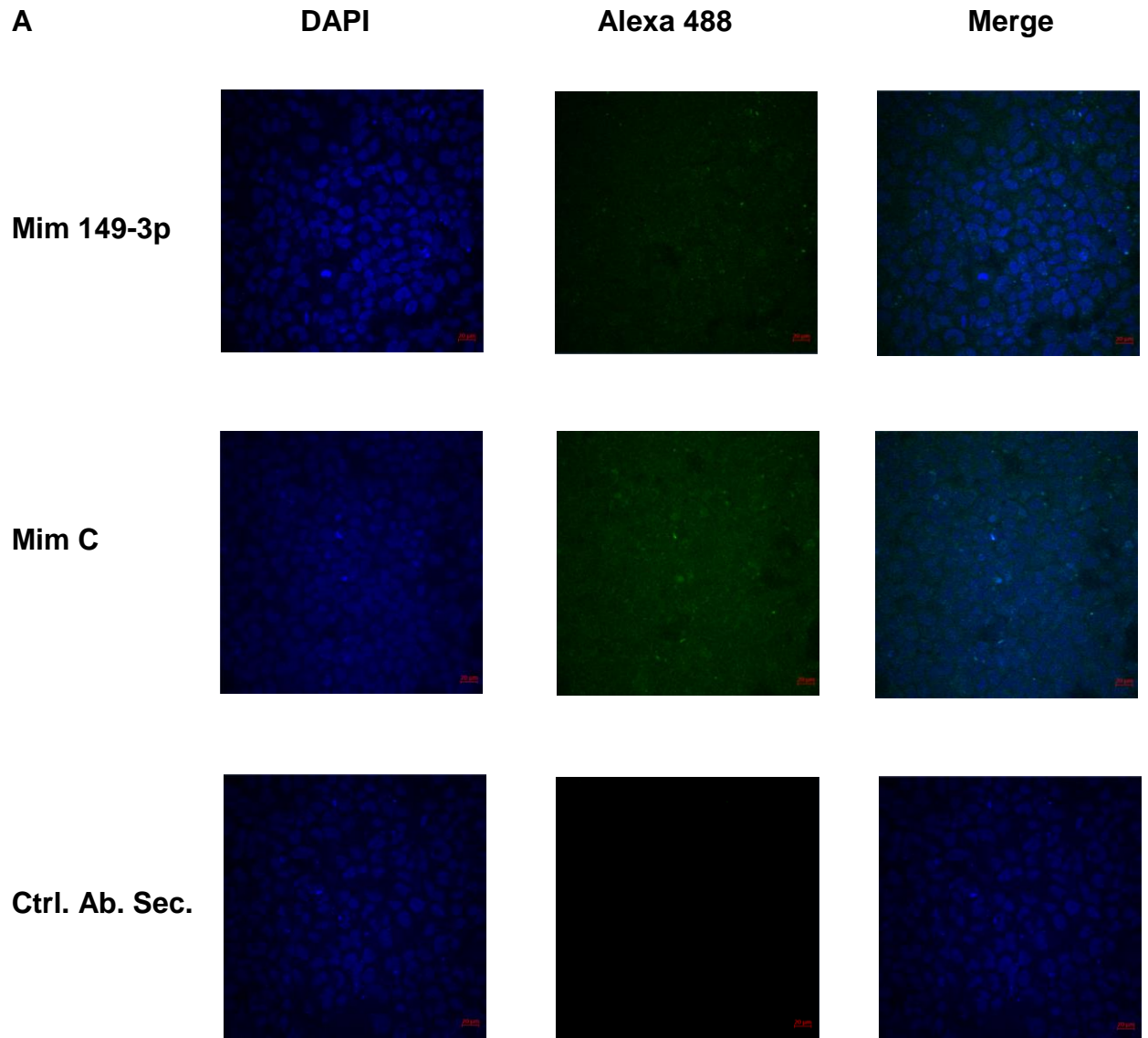


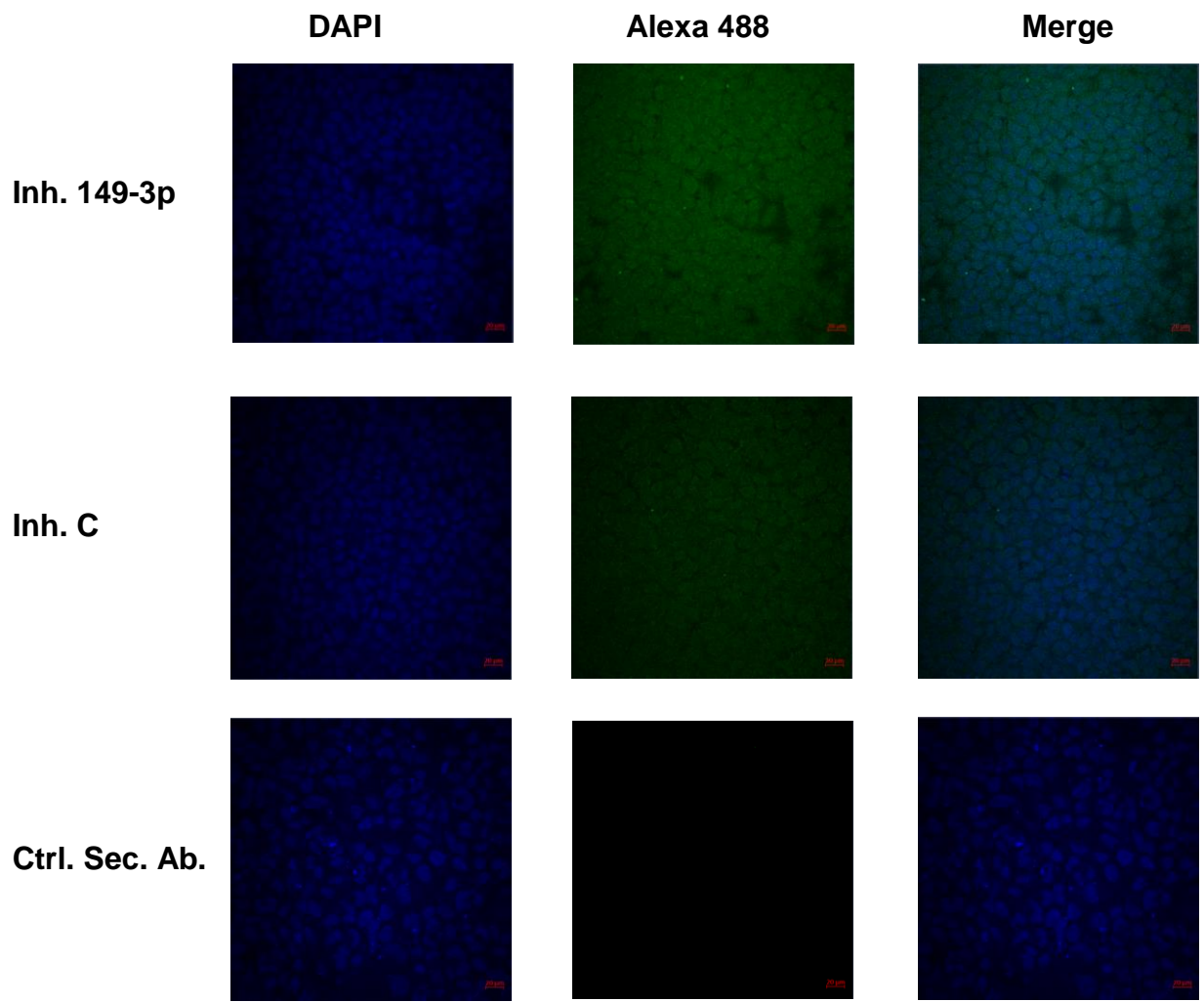
Figura 19. Inmunofluorescencia indirecta de la proteína Ki67 en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p. Las células Huh7 fueron transfectadas con 15 μ m de los mimetizadores del mir 149-3p (mim 149) y 50 μ m de los inhibidores de miR-149-3p (inh 149) así como sus respectivos controles (mim C e inh C) y 48 h después de la transfección se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-Ki67, después fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488, finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI y se fijaron (**A**). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 se cuantificó usando el software Zen Blue (Carl Zeiss). Los datos fueron analizados y graficados con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (**B**).

Expresión de HGF en las células transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p

Como se mencionó anteriormente HGF es un factor relacionado directamente con el hepatocito y su proliferación en el proceso de regeneración.

Los resultados de los experimentos de inmunofluorescencia indirecta para la detección de HGF fueron concordantes con los obtenidos en los ensayos anteriores. En éstos se observa que existe una disminución (46%) en la expresión de HGF en las células tratadas con los mimetizadores y un aumento (123%) de la expresión en los inhibidores del miR-149-3p (Figura 20).





B

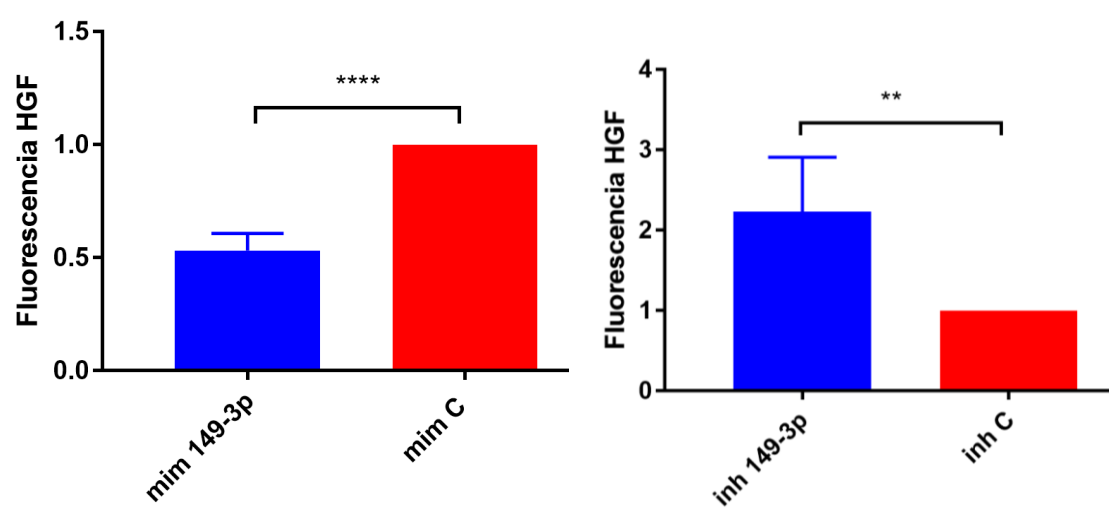


Figura 20. Inmunofluorescencia indirecta de la proteína Ki 67 en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p. Las células Huh7 fueron transfectadas con 15 μ m de los mimetizadores del mir 149-3p (mim 149) y 50 μ m de los inhibidores de miR-149-3p (inh 149) así como sus respectivos controles (mim C e inh C) y después de 48 h de la transfección se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-HGF, después fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488, finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI y se fijaron (**A**). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 se cuantificó usando el software Zen Blue (Carl Zeiss).). Los datos fueron analizados y graficados con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (**B**).

Todos los resultados anteriores indican que el miR-149-3p tiene un efecto notorio en el proceso proliferativo de la célula. Los marcadores de proliferación evaluados mostraron un decremento en su expresión cuando las células fueron tratadas con los mimetizadores del miR-149-3p y lo contrario en el tratamiento con los inhibidores del miRNA en donde el aumento de la viabilidad y de la expresión de los marcadores de proliferación incluyendo HGF fue estadísticamente significativo.

Expresión de GSK3- α en células transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p

El siguiente objetivo fue determinar si el miR 149-3p en el contexto de las células hepáticas tenía un efecto regulatorio de la expresión de la proteína GSK3- α . En el año 2010 Jin y colaboradores demostraron que el gen de esta proteína es blanco del miRNA en células de melanoma modulando su expresión, pero no así en otras líneas celulares cancerosas como en osteosarcoma o de colon. Debido a esto es interesante conocer si dentro de la línea celular Huh-7 este miRNA está regulando la expresión de GSK3- α .

Por medio de ensayos de Western Blot se determinó el nivel de expresión de GSK3- α en extractos de proteínas totales de la línea celular Huh-7 tratadas con mimetizadores e inhibidores del miRNA. Los resultados mostraron una disminución

de la expresión de GSK3- α (49%) en aquellas células que fueron tratadas con los mimetizadores del miR-149-3p y un aumento (15%) en el tratamiento con los inhibidores del miR-149-3p en comparación con sus controles (Figura 21).

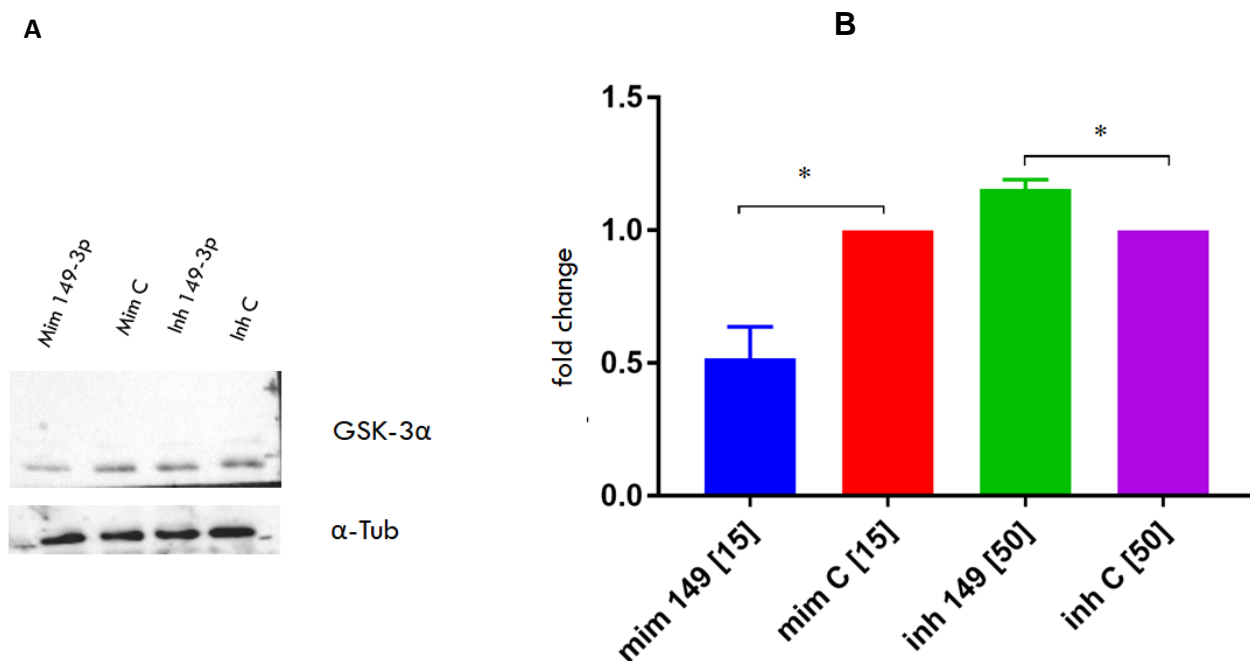


Figura 21. Expresión de GSK3- α en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p. Las células Huh7 fueron transfectadas con 15 μ m de los mimetizadores del mir 149-3p (mim 149) y 50 μ m de los inhibidores de miR-149-3p (inh 149) así como sus respectivos controles (mim C e inh C) y después de 48 h de la transfección fueron extraídas las proteínas totales. Las muestras se separaron en SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa y después incubarlas con un anticuerpo específico anti-GSK3 α y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa y finalmente se reveló mediante quimioluminiscencia (A). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de las imágenes capturadas se cuantificó usando el software ImageLab (ver. 6.0.1) Los datos se graficaron y analizaron con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (B).

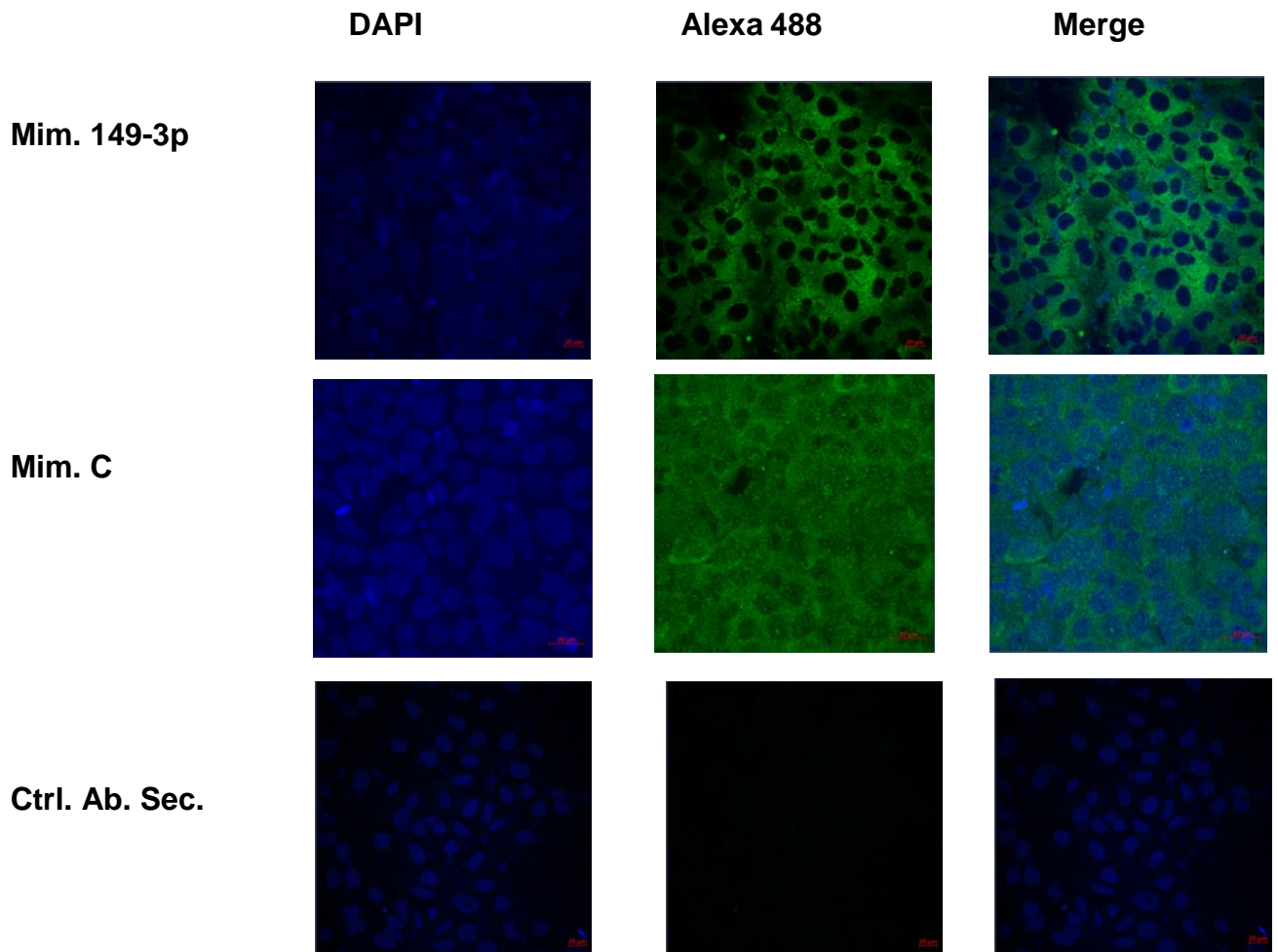
Inmunofluorescencia indirecta de la proteína GSK3- α en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p

Para corroborar el efecto del micro RNA en la expresión de la proteína GSK-3 α en las células Huh-7 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en donde se

evaluó de manera semicuantitativa el nivel de la fluorescencia emitida (figura 22). Los resultados muestran una disminución en la expresión de la proteína (45%) en aquellas células que fueron transfectadas con los mimetizadores del miR 149-3p y un aumento de la expresión cuando presentan inhibido el micro RNA (96%); siendo estos resultados concordantes con los obtenidos por Jin et. al. Los cuales confirmaron al gen de GSK3- α como un blanco del miR 149-3p en células de melanoma.

Estos resultados apoyan la idea de que GSK3- α podría estar participando, regulando los eventos proliferativos en el hepatocito por actividad del miR 149-3p.

A



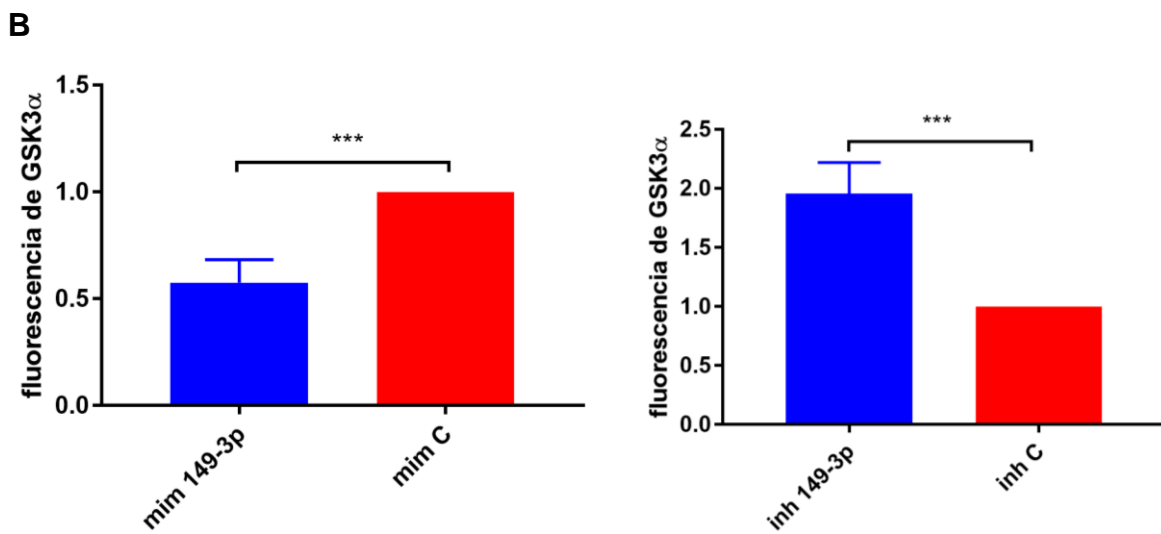
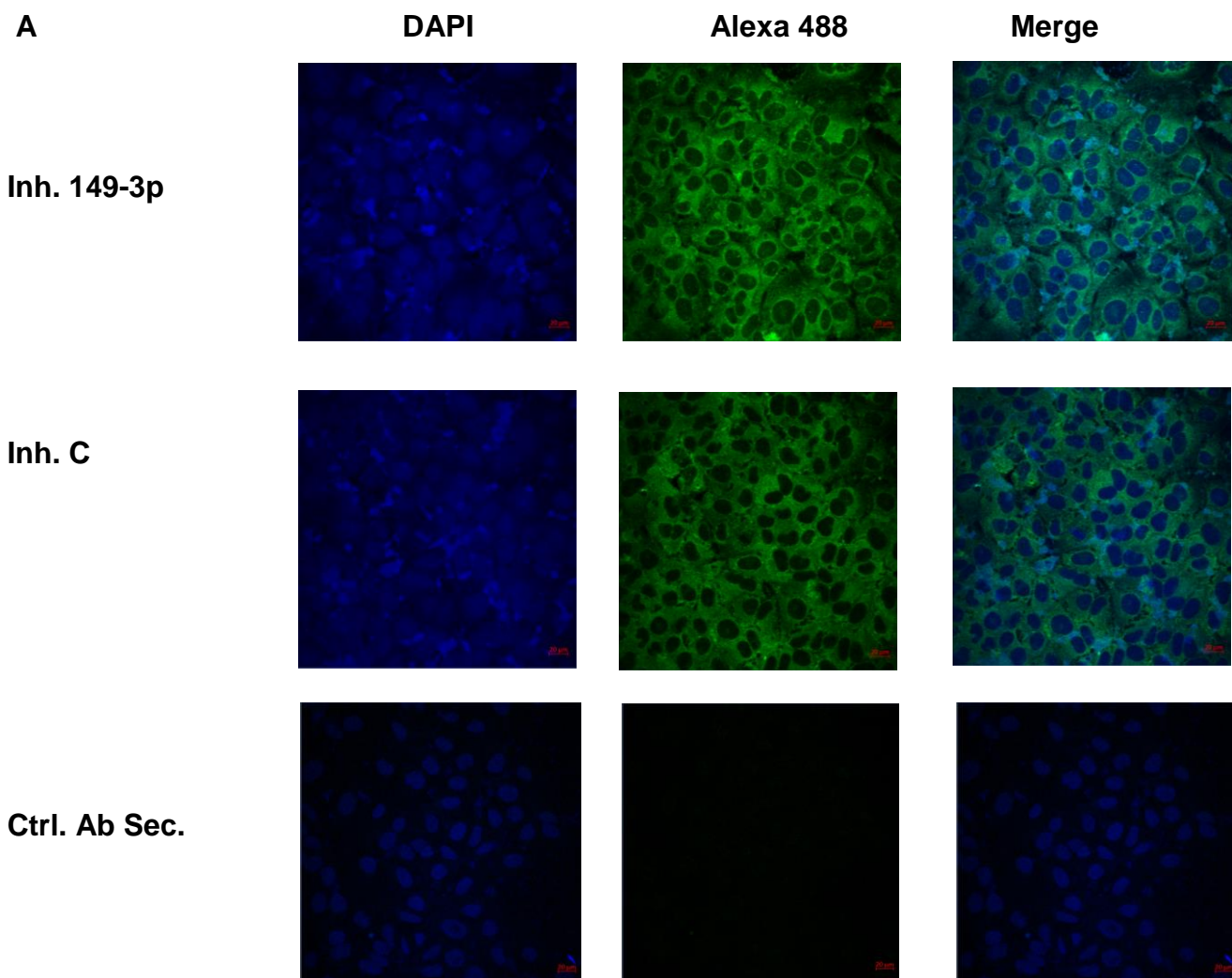


Figura 22. Visualización de la proteína GSK3- α en células Huh-7 transfectadas con mimetizadores e inhibidores del miR149-3p.

Las células Huh-7 fueron tratadas con 15 μ M de mimetizadores (mim 149-3p) y con 50 μ M de los inhibidores del miR 149-3p (inh 149-3p) y 48 h después de la transfección se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti- GSK3- α , después fueron incubadas con un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488, finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI y se fijaron (**A**). Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis de la fluorescencia nuclear emitida por Alexa 488 se cuantificó usando el software Zen Blue (Carl Zeiss). Los datos se graficaron y analizaron con el programa Graphpad Prism y los resultados con un valor de $p \leq 0.05$ (*) fueron considerados estadísticamente significativos (**B**).

DISCUSIÓN

En los últimos años se han buscado y propuesto modelos que mejoren y hagan más eficiente el proceso de regeneración en el hígado con la finalidad de reestablecer la estructura del órgano y recuperar la función perdida producto del estado patológico y a su vez que esto ayude a reducir las muertes causadas por las distintas hepatopatías presentes en la población.

Desde el descubrimiento del papel regulador que tienen los miRNAs en los múltiples procesos biológicos se ha tratado de identificar cuáles de éstos y en que eventos celulares están participando, de tal manera que se pueda mejorar el diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades.

En este trabajo se ha determinado el posible papel del miR-149-3p en el proceso proliferativo del hepatocito, cuya expresión disminuye en las células hepáticas cuando éstas fueron estimuladas con TGF- β 1, una molécula que regula negativamente el proceso proliferativo en el hepatocito, especialmente caracterizada por diversos grupos de investigación en los modelos murinos expuestos a eventos de daño hepático o hepatectomía parcial. Se demostró por medio de ensayos en los que se determinó la viabilidad celular y la relocalización de un factor de transcripción al núcleo que la línea celular Huh-7 fue sensible ante el estímulo del TGF- β 1, así que es capaz de activar la vía de señalización y tener un efecto anti proliferativo. Adicionalmente, los ensayos en los que se determinó la expresión de marcadores de proliferación y regeneración mediante RT-qPCR, Western Blot e inmunofluorescencia indirecta demostraron que el nivel de expresión de PCNA, Ki67 y de HGF disminuyen ante el estímulo por TGF- β 1. inmunofluorescencia. Con todos estos resultados se ha corroborado el papel anti-proliferativo del tratamiento con TGF- β 1 en las células Huh-7.

Después de haber corroborado el efecto del TGF- β 1 en la proliferación celular continuamos con los experimentos que nos ayudarían a determinar si el miR-149-3p funciona como un mediador de los efectos anti-proliferativos de dicho factor de crecimiento. Así, las células fueron transfectadas con los mimetizadores y los inhibidores y los resultados obtenidos nos mostraron datos interesantes en donde se obtuvo una disminución de la viabilidad celular en el caso de las células tratadas con los mimetizadores y como era de esperarse, se tuvo un efecto contrario en las que fueron tratadas con los inhibidores. Estos resultados fueron comprobados mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real y de Western Blot en donde se corroboró una disminución en la expresión del marcador de proliferación PCNA.

A su vez los ensayos en los que se detectó a la molécula Ki67 mediante inmunofluorescencia se demostró que hubo una disminución en la expresión de este marcador de proliferación en aquellas células con una expresión aumentada del miR-149-3p y lo contrario en las células con la expresión inhibida del miRNA. El mismo resultado se obtuvo en los experimentos en que se llevó a cabo la detección de un factor de crecimiento de hepatocitos, HGF, así el aumento en su nivel de expresión nos indica que existe un estímulo regenerativo en las células tratadas con los inhibidores del miRNA y lo contrario en las células tratadas con los mimetizadores.

Los resultados obtenidos en los ensayos en los que la línea celular hepática nos indican que, cuando se disminuye la expresión del miR-149-3p utilizando inhibidores sintéticos de éste, se induce un efecto de aumento en proliferación celular y viceversa. Por lo tanto, se postula que el miR-149-3p estaría participando en un circuito de retroalimentación negativa con respecto al estímulo anti-proliferativo del TGF- β 1.

Como se abordó en los antecedentes de este trabajo de investigación, GSK3- α ha sido caracterizada por ser un blanco del miR-149-3p en células de melanoma en donde la actividad de esta molécula resulta favorable para la apoptosis.

En este trabajo, también se evaluó en nivel de expresión de GSK3- α en células transfectadas con los mimetizadores e inhibidores del miR 149-3p y se encontró lo contrario después del tratamiento con los inhibidores del miRNA. La expresión de GSK3- α se encontró disminuida en las células que sobre expresan al miR 149-3p. La expresión de la proteína fue determinada mediante ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia. De esta manera, se confirma a la proteína GSK3- α como un blanco del miR-149-3p en el contexto de la línea celular de hepatoma humano estudiada en este estudio.

La modulación de la viabilidad celular, así como de los marcadores de proliferación y de la proteína GSK3- α mediada por el miR-149-3p, lo hace un blanco de estudio muy interesante en especial por las aplicaciones que pudiera tener su modulación en los procesos en los que se busca hacer más eficiente el proceso de regeneración tisular en general y en específico en el tejido hepático.

CONCLUSIONES

1. La línea célula Huh-7 es sensible ante la inducción de TGF- β 1 y esta inducción tiene una actividad anti-proliferativa.
2. La actividad del mimetizador del miR-149-3p en células Huh-7 reduce su viabilidad así como los niveles de expresión de los marcadores proliferativos.
3. Los inhibidores del miR-149-3p aumentan la viabilidad de las células Huh-7 así como la expresión de los marcadores de proliferación.
4. El miR-149-3p modula la expresión de la proteína GSK3 α en la línea celular Huh-7
5. El aumento en la expresión de GSK3 α correlaciona con un aumento en la con la expresión de los marcadores de proliferación y viceversa.
6. Por todo lo anterior, se postula que el miR-149-3p podría funcionar en un circuito de retroalimentación negativa ante la inducción de las células Huh-7 con el TGF- β 1. Así, el tratamiento con TGF- β 1 disminuye la expresión del miR-149-3p y esto promueve un aumento en la viabilidad celular y marcadores de proliferación, contrarrestando los efectos que dicho factor de crecimiento produce en las células de hepáticas Huh-7.

APENDICE

Medios de cultivo

DMEM, SFB 10%, (50 ml):

40 ml de Advanced DMEM, alto glucosa y sin glutamina, Gibco), 5 ml de Suero fetal bovino (Gibco), previamente inactivado durante 30 min a 56 °C, 5 ml de Glutamina y 500 ml de solución de Penicilina (10.000 U/ml)- Estreptomicina (10.000 ug/ml).

Soluciones para Western Blot

Geles de acrilamida

Separador

Reactivos	10 %
Tris-HCl pH 8.8 [1.5 M]	2.5 mL
Acrilamida 30 %	5.0 mL
SDS 10 %	150 µL
PSA 10 %	150 µL
TEMED	15 µL
H ₂ O	6.25 mL

Concentrador

Reactivos	5 mL
Tris-HCl pH 6.8 [1.5 M]	2.5 mL
Acrilamida 30 %	1.3 mL
SDS 10 %	150 µL
PSA 10 %	150 µL
TEMED	15 µL
H ₂ O	6.1 mL

Tris Glicina 10 X:

Tris-base...30 g

Glicina.....144 g

H₂O.....cbp 1 L

Buffer de corrida:

Tris-glicina 10 x...100 mL

SDS 10 %.....200 mL

H₂O.....cbp 1 L

Buffer de transferencia:

Tris-glicina 10x 100mL

Metanol.....200 mL

H₂O.....cbp 1 L

TBE (10X):

Tris-base 108g

Ácido Borico 55g

EDTA [0.05M] pH 8 40ml

H₂O cbp 1 L

Buffer Laemmli (2X):

2.5 ml de Tris-HCl 0.5 M, 0.4 mg de SDS, 2ml de glicerol, 200 µg de β-mercaptoetanol y 0.1 mg de azul de bromofenol en un volumen final de 10 ml. pH 6.8.

BIBLIOGRAFÍA

- Böhm, F., Köhler, U. A., Speicher, T., & Werner, S. (2010). Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine*, 2(8), 294–305. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000085>
- Cao, D., Jia, Z., You, L., Wu, Y., Hou, Z., Suo, Y., ... Cao, X. (2016). 18β-glycyrrhetic acid suppresses gastric cancer by activation of miR-149-3p-Wnt-1 signaling. *Oncotarget*, 7(44). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12443>
- Chen, L., Charrier, A., Zhou, Y., Chen, R., Yu, B., Agarwal, K., ... Brigstock, D. R. (2015). NIH Public Access, 59(3), 1118–1129. <https://doi.org/10.1002/hep.26768>.Epigenetic
- Choupani, J., Nariman-Saleh-Fam, Z., Saadatian, Z., Ouladsahebmadarek, E., Masotti, A., & Bastami, M. (2019). Association of mir-196a-2 rs11614913 and mir-149 rs2292832 Polymorphisms With Risk of Cancer: An Updated Meta-Analysis. *Frontiers in Genetics*, 10(March). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00186>
- Dimitrova, N., Zamudio, J. R., Jong, R. M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., ... Jacks, T. (2017). Public Access NIH Public Access. *PLoS ONE*, 32(7), 736–740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Ding, H., Zheng, S., Garcia-Ruiz, D., Hou, D., Wei, Z., Liao, Z., ... Jiang, X. (2016). Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. *Nature Communications*, 7(May), 1–17. <https://doi.org/10.1038/ncomms11533>
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., ... Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting, (February), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>
- Fan, S., Li, H., Cui, G., Kong, X., Sun, L., Zhao, Y., ... Zhou, J. (2015). mediating JunB in T-cell acute lymphoblastic leukemia, 1, 1–9.

- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of miRNAs - Supplementary. *Genome Research*, (19), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>.
- Hazra, S., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R. A., Chatterjee, V. K. K., & Tsukamoto, H. (2004). Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Induces a Phenotypic Switch from Activated to Quiescent Hepatic Stellate Cells *. *Hepatology*, 39(12), 11392–11401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310284200>
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- He, Yingli, Jin, L., Wang, J., Yan, Z., Chen, T., & Zhao, Y. (2015). Mechanisms of fibrosis in acute liver failure. *Liver International*, 35(7), 1877–1885. <https://doi.org/10.1111/liv.12731>
- He, Yunjie, Yu, D., Zhu, L., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2017). miR-149 in human cancer: A systemic review. *Journal of Cancer*, 9(2), 375–388. <https://doi.org/10.7150/jca.21044>
- Lee, S. R., Shin, J. W., Kim, H. O., Son, B. H., Yoo, C. H., & Shin, J. H. (2013). Determining the effect of transforming growth factor- β 1 on cdk4 and p27 in gastric cancer and cholangiocarcinoma. *Oncology Letters*, 5(2), 694–698. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1024>
- Mann, J., Chu, D. C. K., Maxwell, A., Oakley, F., Zhu, N., & Mann, D. A. (2011). NIH Public Access, 138(2), 1–18. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.002.MeCP2>
- Manuscript, A., & Immunology, L. (2014). NIH Public Access, 3(2), 567–598. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120011.Liver>
- Ng, R., Song, G., Roll, G. R., Frandsen, N. M., & Willenbring, H. (2012). A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin .pdf, 122(3). <https://doi.org/10.1172/JCI46039.We>

- Roderburg, C., Luedde, M., Cardenas, D. V., Vucur, M., Mollnow, T., Zimmermann, H. W., ... Luedde, T. (2013). miR-133a mediates TGF- β -dependent derepression of collagen synthesis in hepatic stellate cells during liver fibrosis. *Journal of Hepatology*, *58*(4), 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.11.022>
- Sandhu, C., Garbe, J., Bhattacharya, N., Daksis, J., Pan, C. H., Yaswen, P., ... Stampfer, M. R. (1997). Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(5), 2458–2467. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111314> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC232094>
- Schueller, F., Roy, S., Vucur, M., Trautwein, C., Luedde, T., & Roderburg, C. (2018). The role of miRNAs in the pathophysiology of liver diseases and toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms19010261>
- Shin, C. H., Lee, H., Kim, H. R., Choi, K. H., Joung, J. G., & Kim, H. H. (2017). Regulation of PLK1 through competition between hnRNPk, miR-149-3p and miR-193b-5p. *Cell Death and Differentiation*, *24*(11), 1861–1871. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.106>
- Siegel, P. M., & Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *3*(11), 807–820. <https://doi.org/10.1038/nrc1208>
- Urien, A. M. M., & Robles, M. D. P. (2012). Manguitos periportales por ultrasonografía : diagnóstico Objetivo docente.
- Yu, E., & Son, W. (2016). Liver Injury in Rats, *17*(1), 45–51.
- Yu, F., Guo, Y., Chen, B., Dong, P., & Zheng, J. (2015). MicroRNA-17-5p activates hepatic stellate cells through targeting of Smad7. *Laboratory Investigation*, *00*(2), 1–9. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.58>

- Zang, X. Y., Geng, X. F., Zhang, C. Y., & Xu, C. S. (2017). Role of microRNAs in liver regeneration. *Acta Anatomica Sinica*, 48(2), 230–235. <https://doi.org/10.16098/j.issn.0529-1356.2017.02.020>
- Zheng, X. B., Chen, X. B., Xu, L. L., Zhang, M., Feng, L., Yi, P. S., ... Xu, M. Q. (2017). miR-203 inhibits augmented proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma residual in the promoted regenerating liver. *Cancer Science*, 108(3), 338–346. <https://doi.org/10.1111/cas.13167>
- Zhou, J., Ju, W., Wang, D., Wu, L., Zhu, X., Guo, Z., & He, X. (2012). Down-regulation of microRNA-26A promotes mouse hepatocyte proliferation during liver regeneration. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033577>
- Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), 7312–7324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7312>