



UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA HEPÁTICA ANTE UN DAÑO CAUSADO POR  
ESTRÉS OXIDANTE EN CÉLULAS ESTELARES Y EN HÍGADO DE RATONES  
DE DIFERENTES EDADES**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta

**M. en B.E. Viridiana Yazmín González Puertos**

Directora de Tesis: Dra. Mina Königsberg Fainstein  
Asesora: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz  
Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Asesor: Dr. Guillermo Robles Díaz

México, D.F. 2011

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Profesor titular C. Tiempo completo

Responsable del Laboratorio de **ENVEJECIMIENTO CELULAR**

Dpto. Ciencias de la Salud. C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

**mkf@xanum.uam.mx**

### **Asesores:**

**Dra. . María Concepción Gutiérrez-Ruiz**

Profesor titular C. Tiempo completo

Responsable del Laboratorio de Fisiología

Dpto. Ciencias de la Salud. C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Depto. de Ciencias de la Salud C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa

**Dr. Guillermo Robles Díaz**

Dpto. Medicina Experimental

Facultad de Medicina, UNAM

## **JURADO EVALUADOR**

Dra. María concepción Gutiérrez Ruiz  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. José Luis Gómez Olivares  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana

Dr. Armando Luna López  
Departamento de Investigación Básica  
Instituto de Geriatria

**“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Número de registro de la beca otorgada por CONACyT Y CVU: 192839 y 168104.**

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la directora de tesis Dra. Mina Königsberg Fainstein. El trabajo de investigación fue apoyado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. 45921-M.**

## RESUMEN

El hígado está expuesto a diversos tóxicos que provocan diferentes respuestas dependiendo de la magnitud del estímulo, que en muchos casos culminan con la muerte de una gran cantidad de células que lo componen. Para contrarrestar el daño, las células del hígado pueden responder de distintas maneras. Por ejemplo, los hepatocitos, que normalmente están en estado quiescentes, comienzan a proliferar, para restablecer el tejido dañado. Por otro lado, las células estelares proliferan para producir matriz extracelular. No obstante, si el estímulo y el daño son continuos, las células estelares pueden continuar proliferando y se acumula un exceso de matriz extracelular generando fibrosis.

En este trabajo se estudió la respuesta hepática desde dos puntos de vista, el primero fue intentar disminuir la proliferación descontrolada de las células estelares, tratando de inducir senescencia replicativa mediante la sobreexpresión de la proteína Bcl-2, ya que se ha reportado que induce senescencia en otras líneas celulares. Para ello se transfectó la línea de células estelares CFSC-2G. Nuestros resultados indicaron que aún y cuando la sobreexpresión de Bcl-2 no indujo la senescencia celular replicativa, sí protegió a las células estelares en contra del daño por estrés oxidante.

Puesto que se sabe que los organismos viejos presentan una disminución en la capacidad regenerativa después de una agresión, en la segunda parte de este trabajo, se evaluó la capacidad de respuesta que poseen las células hepáticas provenientes de ratones viejos, después de ser agredidas de manera moderada con  $\text{CCl}_4$ , y se comparó con la respuesta que presentan las células de ratones jóvenes. Para ello, se evaluaron los niveles de algunas de las proteínas relacionadas con la respuesta de proliferación. Los resultados mostraron que los animales viejos si fueron capaces de aumentar algunas de las proteínas relacionadas con la proliferación como la ciclina D1, pero también aumentaron proteínas inhibidoras del ciclo como p27. De manera interesante, se encontró que en los animales viejos control había un aumento en varias proteínas.

## ABSTRACT

The liver is exposed to a diversity of toxic agents that induce different responses depending on the dose. These responses can sometimes end with the demise of a large part of the liver cells. In order to counteract these damages, hepatic cells can respond in different ways. For example, hepatocytes, that are normally quiescent cells, can bring on proliferation in an effort to restore the damaged tissue. On the other hand, stellate cells can also proliferate to produce extracellular matrix. However, if the toxic stimulus and the damage persist, stellate cells might keep on proliferating, and the extracellular matrix would accumulate, producing fibrosis.

Here we studied the hepatic response from two stand points; the first one was an attempt to diminish the stellate cells uncontrolled proliferation, by inducing senescence through overexpressing Bcl-2 protein, which is known to induce senescence in several cell lines. In order to do it, the stellate cell line CFSC-2G was transfected. Our results showed that although Bcl-2 did not induce replicative senescence, it protected the cells against oxidative damage.

Since it is known that older organisms have a diminished regenerative competence after an aggression; in the second part of this work, the capability to respond against a moderate insult with CCl<sub>4</sub>, of cells derived from old animals was compared to the response observed in cells from young animals insulted with the same toxic. In order to answer this question, some cells cycle related proteins were evaluated. Our results showed that the old animals were able to respond to the treatment and increased some proliferation proteins such as cyclin D1 however, they also increased cell cycle inhibitors like p27. Interestingly, control old animals also presented a generalized increase in several of the analyzed proteins.

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Hígado, importancia y conformación celular.....	1
1.2 Regeneración y reparación hepática.....	4
1.3 Hígado y envejecimiento.....	6
1.4 Estrés oxidante en el hígado.....	8
1.5 Senescencia replicativa.....	10
1.6 La proteína Bcl-2.....	12
2. Justificación.....	14
<b>Parte 1</b> .....	<b>18</b>
3. Objetivo general.....	18
3.1 Objetivos particulares.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Material y método.....	20
5.1 Cultivo celular.....	20
5.2 Transfección de las células CFSC-2G por lipofección.....	20
5.3 Selección con el antibiótico y eficiencia de la transfección en las células CFSC-2G.....	22
5.4 Inmunodetección de proteínas transferidas del gel a una membrana PVDF (Western blot).....	23
5.4.1 Extracción de proteínas totales.....	23
5.4.2 Determinación de la proteína total por el método de bradford.....	23

5.4.3 Electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida-SDS.....	24
5.4.4 Transferencia de proteínas totales a la membrana de PVDF.....	25
5.4.5 Anticuerpo primario, secundario y revelado.....	25
5.5 Proliferación celular.....	26
5.6 Incorporación de timidina tritiada.....	27
5.7 Senescencia asociada a la $\beta$ -Galactosidasa.....	28
5.8 Tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).....	29
5.9 Oxidación de proteínas.....	29
5.10 Análisis estadístico.....	30
6. Resultados.....	31
6.1 Sobreexpresión de Bcl-2.....	31
6.2 Proliferación celular.....	32
6.3 Síntesis de DNA.....	33
6.4 Determinación de senescencia.....	34
6.5 Tratamiento agudo con $H_2O_2$ .....	36
6.6 Oxidación de proteínas.....	37
7. Discusión.....	40
<b>Parte 2</b> .....	46
8. Objetivo general.....	46
9. Objetivos particulares.....	46
10. Hipótesis.....	47

11. Material y método.....	48
11.1 Animales.....	48
11.2 Tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl <sub>4</sub> ).....	48
11.3 Extracción de proteínas totales.....	49
11.4 Determinación de la proteína total por el método de bradford.....	49
11.5 Inmunoensayo tipo western blot.....	50
11.5.1 Electroforesis de proteínas totales en el gel de poliacrilamida- SDS.....	50
11.5.2 Transferencia de proteínas totales a la membrana de PVDF.....	51
11.5.3 Anticuerpo primario, secundario y revelado.....	51
11.5.4. Normalización de los datos.....	52
11.6 Análisis estadístico.....	52
12.- Resultados.....	53
12.1 Determinación de proteínas asociadas a la vía de proliferación.....	53
12.1.1 c-Met.....	53
12.1.2 AKT.....	56
12.1.3 Proteína p27.....	59
12.1.4 Ciclina D1.....	61

12.1.5 Proteína p16.....	63
12.1.6 Cambio en las proteínas de hígado de ratones jóvenes después del tratamiento con CCl <sub>4</sub> .....	65
12.1.7 Análisis de las proteínas de hígado de ratones viejos sin tratamiento.....	67
12.1.8 Cambio en las proteínas de hígado de ratones viejos después del tratamiento con CCl <sub>4</sub> .....	69
13.- Discusión.....	71
14.- Comentarios generales.....	83
15.- Conclusiones.....	86
16.- Perspectivas.....	87
17.- Referencias.....	89

# ESTUDIO DE LA RESPUESTA HEPÁTICA ANTE UN DAÑO CAUSADO POR ESTRÉS OXIDANTE EN CÉLULAS ESTELARES Y EN HÍGADO DE RATONES DE DIFERENTES EDADES

## 1.-INTRODUCCIÓN

### 1.1 HÍGADO, IMPORTANCIA Y CONFORMACIÓN CELULAR

El hígado es considerado el segundo órgano más importante para el ser humano, después del cerebro. Su importancia radica en que lleva a cabo funciones vitales como la síntesis de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, ácidos biliares, colesterol, lípidos y algunas vitaminas de reserva (Bloom y Fawcett, 1975, LaBrecque, 1994, Burt y Day, 2002, Malarkey et al, 2005), así mismo, regula el volumen de la sangre. De igual manera es el sitio de biotransformación y defensa contra xenobióticos.

El hígado presenta una morfología y fisiología muy heterogénea, el lóbulo hepático está formado por hepatocitos, los cuales ocupan el 80% del total del volumen del órgano y realizan la mayoría de las funciones. Por otro lado, las células no parenquimatosas hepáticas que contribuyen sólo con el 6.5% del volumen (Hernández, 2004), y el 13.5% restante está conformado por otros tipos celulares como las células dendríticas, las células de Kupffer, entre otras. Estructuralmente, puede decirse que el 40% de todos los tipos celulares se encuentran localizados en el compartimiento sinusoidal y de ahí la importancia de este compartimiento.

Las células estelares hepáticas, conocidas anteriormente como células de Ito, lipocitos o células perisinusoidales (Kmiec, 2001), son de origen mesenquimal, se localizan en el espacio de Disse y en el hígado sano se encuentran en estado

quiescente (Friedman, 2004). Su función principal es la de almacenar retinoides (Vitamina A) en el citoplasma, reteniendo el 80% del total de retinoides en el cuerpo (Senoo, 2004). Sin embargo, también se les ha relacionado de manera importante con el desarrollo de la fibrosis hepática (Arteel, 2003; Friedman, 2008). Como se mencionó antes, las células estelares hepáticas se encuentran en estado quiescente, pero son capaces de activarse en respuesta a diferentes estímulos agresores o xenobióticos (Gressner, 1995, 1996; Friedman, 1996; Friedman et al, 2008). Al activarse, estas células se des-diferencian presentando cambios en su fenotipo. En general, se dice que semejan a miofibroblastos, debido a que presentan contractilidad e incrementan la síntesis de proteínas de matriz extracelular hasta ocho veces con respecto a un hígado sano (Friedman, 2004 y 2008). Es por ello, que han sido consideradas como las principales productoras de colágena tipo I y III, así como de la fibronectina y de proteoglicanos modificando las propiedades de la matriz extracelular, lo cual aumenta drásticamente la rigidez y favorece la inducción de la fibrosis (Wells, 2008).

Por otro lado, además de modificar las propiedades de la matriz extracelular, las células estelares activadas son capaces de proliferar, se sabe que responden a factores de crecimiento, como es el caso del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Gressner, 1996; Borkham-Kamphorst et al, 2007).

Se han reportado dos fases en el proceso de activación de las células estelares hepáticas: la primera fase es la iniciación, en la cual ocurren los cambios en la expresión génica y de fenotipo; y la segunda fase es la perpetuación, que es en donde las células presentan la mayor parte de los cambios como proliferación,

quimiotaxis, fibrogénesis, contractibilidad, así como la pérdida de retinoides (Hernández-Gea y Friedman, 2011).

Dependiendo del agente agresor y del tiempo al cual el hígado se encuentre expuesto, será la magnitud de la respuesta de las células estelares. En el caso de un daño agudo, las células estelares se activan, proliferan y tienden a migrar; se induce la producción de proteínas de matriz extracelular y se lleva a cabo la fibrólisis, activando algunas proteinasas, todo ello da como resultado la reparación del daño agudo en el tejido. En este caso, se piensa que cuando las células estelares activadas terminan su función, mueren por apoptosis. Sin embargo, esto no ocurre cuando el daño es crónico, es decir, cuando el agente agresor se mantiene o las agresiones son constantes. En esta circunstancia, las células estelares también se activan, proliferan y migran, pero nunca se presenta la señal para que las células mueran por apoptosis; aparentemente las células continúan con una autoestimulación en la activación y en la producción de matriz extracelular. Además, se sabe que ésta puede modular la activación y proliferación de las células estelares, la angiogénesis y la actividad de los factores de crecimiento, e inducir señales para que se polaricen, se adhieran, migren, proliferen y se diferencien (Hynes, 2009). Por lo que, en presencia de un estímulo crónico, el daño se perpetúa, dando como resultado una fibrosis hepática, la cual es una respuesta de tipo herida-cicatrización exacerbada, caracterizada por la acumulación de matriz extracelular (Hernández-Gea y Friedman, 2011).

## 1.2 REGENERACIÓN Y REPARACIÓN HEPÁTICA

Es importante considerar que después de un daño hepático, el tejido lesionado debe ser reemplazado por tejido nuevo, que cumpla con la misma función. A este proceso se le conoce como regeneración. En el hígado humano esta capacidad está limitada, ya que los hepatocitos se encuentran en estado quiescente y en condiciones normales no se duplican (Fausto et al, 2006); solo lo hacen después de sufrir un daño.

La capacidad de las células para empezar a multiplicarse y regenerar el tejido responde principalmente a dos factores relacionados con la muerte celular circundante:

- a.) La señal dada por el aumento del RNA mensajero del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y de la interleucina 6 (IL-6);
- b.) La señal que se genera en respuesta a la liberación de citocinas como IL-6, factores de transcripción como NF-kB, STAT3 de las células vecinas, que tratarán de fomentar la proliferación para poder suplir a las células muertas.

En el hígado, esta respuesta está determinada y coordinada por las células de Kupffer y las células estelares hepáticas, ya que se propone que secretan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento como respuesta al daño en el tejido (Fausto et al, 2006; Fugiyoski y Ozaki, 2011).

Algunos de los factores más importantes que se han estudiado en relación a los eventos antes mencionados son: el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el

factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Friedman 2006, Povero et al 2010). Estos factores de crecimiento activan varias vías de señalización relacionadas con los procesos de proliferación de los hepatocitos en respuesta a un daño. Una de las principales vías que se activan es la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en donde se ven involucradas varias cinasas como MAPK, la proteína cinasa reguladora de la señal externa (ERK), MERK1/2, ERK1/2 que activan básicamente la remodelación del citoesqueleto, la proliferación y la diferenciación celular (Brow y Sacks, 2008). Otra vía de señalización relacionada con la regeneración de los hepatocitos es la de la cinasa asociada al receptor (Janus cinasa, JAK por sus siglas en inglés) y activadores de la transcripción y transductores de señales (STAT, por sus siglas en inglés), que están relacionadas a la respuesta inflamatoria, de proliferación y supervivencia después de un daño hepático (Schindler y Plumleec, 2008).

Por otro lado, la regeneración hepática también involucra a la vía señalización de AKT/PI3K. PI3K es una cinasa lipídica intracelular, que fosforila a la proteína AKT, ésta es una cinasa de serina-treonina. Dicha cascada de señalización regula el metabolismo celular, la supervivencia, mitogénesis, motilidad, polaridad y el tráfico de vesículas (Krasilvnicov, 2000).

Existen una gran cantidad de estudios sobre la activación de los factores de transcripción clásicos como AP1 y NFκB (Lee et al, 2000; Suko et al, 2005), sin embargo, existen otros factores que también han resultado ser de interés para este fenómeno. Por ejemplo, los factores de transcripción de la familia de los fork head (FOXO, por sus siglas en inglés) que son fosforilados por AKT. Los FOXO

son factores que se caracterizan por tener un dominio de unión al DNA que está involucrado en el metabolismo, diferenciación, apoptosis y proliferación celular. Activan productos génicos relacionados con el control o inhibición del ciclo celular, como a la proteína p27 e inhiben a otros productos génicos relacionados con la proliferación como la ciclina D1 (Ho et al, 2008).

En resumen, se puede decir que el daño hepático estimula la activación de las células de Kupffer que secretan citocinas y factores de crecimiento como HGF, PDGF entre otros, y es entonces cuando se activan varias vías de señalización, siendo la vía PI3K/ AKT una muy interesante y poco estudiada, que al fosforilar a FOXO3 reprime su activación; este último factor regula a las proteínas relacionadas con el control del ciclo celular como p27 y ciclina D1.

Queda claro que la participación de todos estos factores en las distintas vías de señalización es un evento sumamente importante que debe ser estudiado y comprendido para poder entender, y después, posiblemente manipular, la regeneración celular después de un daño agudo en el hígado, y así lograr contrarrestar algunas enfermedades hepáticas, además de lograr con éxito la regeneración en pacientes de edad avanzada.

### 1.3 HÍGADO Y ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un fenómeno biológico complejo e inevitable que se caracteriza por la pérdida o decaimiento de varias funciones bioquímicas estructurales y fisiológicas de los organismos, así como la acumulación de

diversos cambios en la expresión génica (Harman, 1998). Se ha reportado que con la edad disminuyen los factores que regulan el mantenimiento y la reparación del DNA. La acumulación de daños al DNA provocados a lo largo de la vida, incrementa la probabilidad de muerte y la aparición de diversas enfermedades (Pérez-Campo et al, 1998; Krishnan et al, 2011).

Se ha observado que durante el envejecimiento el hígado disminuye su tamaño, lo que aunado a una reducción del 30- 40 % del flujo de sangre, se producen cambios estructurales y bioquímicos (McClean y Lecounter, 2004). Los cambios hepáticos en la microvascularización promueven implicaciones clínicas, como la aterosclerosis y la susceptibilidad a toxinas, entre otros (LeCouteur et al, 2005). Dicho deterioro correlaciona con un funcionamiento alterado en la biotransformación de los fármacos y xenobióticos (González-Chamaro et al, 1998). Asimismo, se ha reportado en el hígado de ratones viejos, que la reducción del flujo sanguíneo sinusoidal asociado a la agrupación de leucocitos en el sinusoides, genera un estrechamiento en el diámetro que forma una pseudo-capilarización, la cual induce una disfunción en las células endoteliales sinusoidales (Ito et al, 2007).

Existen una gran cantidad de evidencias en donde relacionan el envejecimiento hepático con la disminución de la biotransformación de toxinas en la fase I (LeCouteur et al, 2001), el contenido de ATP (Selzner et al, 2007) e hipoxia en los hepatocitos (Cheluvappa et al, 2007), así como un incremento en la síntesis de lípidos (Finlay et al, 2011) y el factor de riesgo para contraer hepatocarcinoma (Nakajima et al, 2011).

En nuestro grupo de trabajo se ha observado una mayor susceptibilidad al daño oxidativo en el DNA aislado del hígado de ratones hembra de la cepa CD1 tratados con  $\text{CCl}_4$  (López-Diazguerrero et al, 2005).

Todos estos antecedentes muestran que el hígado de los organismos viejos es más susceptible al daño y tiene menos mecanismos de defensa y reparación que el hígado de animales jóvenes, así como una menor capacidad regenerativa. Es por ello que parte de los objetivos de este trabajo se centran en conocer cómo se encuentran algunos de los factores antes mencionados en el hígado de animales viejos después de un daño agudo en comparación con los de los animales jóvenes, ello para ayudar a explicar parte del deterioro funcional y la pérdida de la capacidad regenerativa durante el envejecimiento.

#### 1.4 ESTRES OXIDANTE EN EL HÍGADO

Un factor importante que se asocia a la generación del daño crónico en el hígado es el estrés oxidante. Este es un estado celular que se presenta cuando hay un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y las moléculas antioxidantes, debido a que aumentan las primeras y disminuyen las últimas. Dentro de las moléculas oxidantes se encuentran los radicales libres, que son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados (Halliwell y Gutteridge, 1994). La principal fuente generadora de radicales intracelulares es el metabolismo del oxígeno, ya que al recibir un electrón, éste da origen al radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el cual es producto de diferentes procesos fisiológicos. Entre los más importantes

destacan la biotransformación de fármacos por la familia de los citocromos P450 (Hasler et al, 1999; Orellana y Guajardo, 2004), la enzima NADPH oxidasa (Lamberth, 2004; Pendyala y Natarajan, 2010), el metabolismo catalítico de los ácidos nucleicos y principalmente la cadena respiratoria mitocondrial (Turnes et al, 1985; Kowaltowski et al, 2009), entre otros.

El radical  $O_2^{\cdot-}$  puede aceptar otro electrón y formar el anión peróxido ( $O_2^{-2}$ ), esta molécula, se protona dando lugar al  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  no es propiamente un radical, pero puede llegar a tener un rompimiento homolítico del enlace O-O, dando origen al anión hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ) y al radical libre hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ). Esta reacción es catalizada por el fierro y el cobre, y se conoce como la reacción de Fenton (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hansberg, 2008). A todo este conjunto de moléculas se les denomina especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y pueden reaccionar dañando a las biomoléculas.

Se ha reportado que cuando el hígado se encuentra ante una agresión, como el estrés oxidante, la hipoxia transitoria y los productos de la biotransformación del etanol como el acetaldehído y las ROS, se ve afectada la función hepática de manera importante, produciendo enfermedades, tales como la fibrosis (Rojkind et al, 2002; Urtasun et al, 2008).

Es interesante comentar que el hecho de poder controlar o minimizar el estrés oxidante, se ha considerado como parte de las posibles terapias para evitar la progresión del daño hepático crónico (Arriazu et al, 2010), en particular disminuyendo los niveles de las ROS provenientes de la mitocondria (Serviddio et

al, 2010). El minimizar los niveles de ROS contribuiría disminuir el daño producido por el estrés oxidante y detener el mecanismo por el cual las células estelares activadas continúan proliferando y produciendo matriz extracelular.

Por otro lado, se ha sugerido que al inducir la senescencia replicativa podría ser una intervención interesante para tratar de detener la proliferación de las células estelares activadas y disminuir la producción de matriz extracelular (Hernández-Gea y Friedman, 2011). Por lo anterior, el tratar de disminuir los niveles de las ROS e inducir la senescencia es uno de los objetivos planteados durante este trabajo.

## 1.5 SENESENCIA REPLICATIVA

Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hayflick y Moorehead (1961); estos investigadores observaron que los cultivos primarios solo se dividían un determinado número de veces y luego dejaban de dividirse; a la etapa donde las células pierden su capacidad de proliferar le llamaron senescencia replicativa. A partir de entonces, se han realizado numerosos estudios que sugieren que la senescencia es un mecanismo de supresión de tumores, así como un factor que contribuye al envejecimiento celular (Campisi, 2000; López-Diazguerrero et al, 2005). Las células senescentes están detenidas en la fase G0/G1 del ciclo celular y no proliferan en respuesta a estímulos mitogénicos (Dimri et al, 1994, 1996; Muller, 2009). Asimismo, son resistentes a estímulos apoptóticos y presentan cambios en su fenotipo, ya que se distinguen como células grandes, aplanadas y

con una gran cantidad de vacuolas. Se ha reportado que presentan un incremento en la expresión de genes que detienen el ciclo celular, tales como p16 y p21 (Dulic et al, 2000; Fridman y Tainsky 2008).

La senescencia entonces, puede verse como una respuesta celular al estrés, que limita la proliferación de células dañadas (Campisi, 2001, Mathon y Lloyd, 2001). Se ha reportado que las células senescentes presentan un incremento en la actividad de la enzima beta-galactosidasa, y aunque no se sabe la implicación fisiológica de este evento, tal evento se ha usado como un marcador enzimático (Dimri, 1995; Sasaki et al, 2005), ampliamente por nuestro grupo de investigación demostrando ser confiable y reproducible (López-Diazguerrero et al, 2006).

Inicialmente, se pensaba que el acortamiento progresivo de los telómeros después de divisiones celulares sucesivas, era lo que hacía que las células perdieran su capacidad de proliferar (Von Zgliniki, 2000; Schnabl et al, 2003). Sin embargo, esta idea con el tiempo ha ido perdiendo fuerza, debido a que se ha logrado inducir la senescencia celular sin el acortamiento de los telómeros (Bree et al, 2002). Ahora, se piensa que la célula censa el acortamiento al DNA como daño y activa la vía de señalización de ATM o ATR que activan a las proteínas Chk y a p53, que a su vez induce la transcripción de inhibidores del ciclo celular como p21 y un posterior incremento de p16 (Pearson et al, 2000; Muller, 2009).

Se mencionó antes que el estrés oxidante es la pérdida del equilibrio entre los antioxidantes y los oxidantes, encontrándose en mayor cantidad estos últimos, de modo que se ha propuesto, que el estrés oxidante podría promover la interrupción

del ciclo celular, ya sea por el daño a nivel del DNA o por otros mecanismos. Este fenómeno se ha denominado senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, por sus siglas en inglés) (Bladier et al, 1997; Chen et al, 2000,) para diferenciarlo de la senescencia replicativa.

Nuestro grupo de trabajo reportó que al sobreexpresar a la proteína Bcl-2 en fibroblastos de pulmón de ratón, también se induce la senescencia (López-Díazguerrero et al, 2006). De igual manera el grupo Bonnefoy-Berard (2004) encontró que al sobreexpresar a Bcl-2 en la línea celular murina BAF3, en ausencia de interleucina 3 (IL-3) ocurría un arresto del ciclo celular en la fase G1. Por otro lado, se ha reportado en una línea celular de carcinoma de pulmón, H1299 que la sobreexpresión de Bcl-2, se indujo una detención permanente en el ciclo celular con características de senescencia prematura (Crescenzi et al, 2003). Tang y colaboradores (2005) sugieren que al dar un pretratamiento a bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno, protegen a las células PC12 contra la apoptosis, ya que se incrementan los niveles de ROS y se promueve la sobreexpresión de Bcl-2. Todos estos antecedentes apoyan la idea de que si se lograra sobreexpresar a la proteína Bcl-2 en células estelares hepáticas, cabría la posibilidad de disminuir el estrés oxidante y detener el ciclo celular induciendo senescencia.

## 1.6 LA PROTÉINA Bcl-2

La proteína Bcl-2 se descubrió originalmente en linfomas de células B en folículos de ganglios humanos, en la translocación intercromosómica t (14; 18), por lo que se conoce como el proto-oncogene *bcl-2* (McDonnell et al, 1989). Bcl-2 tiene una

masa molecular de 26 kDa. Su extremo carboxilo terminal es hidrofóbico, lo que le permite estar anclada en las membranas del núcleo, retículo endoplásmico y mitocondria (Bakhshi et al, 1985). Además, su orientación es hacia el lado citosólico (Hockenbery, 1993).

Bcl-2 es una proteína relacionada con la supervivencia celular y es la representante de alrededor de 20 miembros de esta familia en células de mamífero. Los miembros de la familia están agrupados en proteínas antiapoptóticas (como es el caso de Bcl-2 y Bcl-xL con 4 dominios) y proteínas proapoptóticas (como Bax y Bid con 1 a 3 dominios) (Adams y Cory, 2007). A pesar de que *bcl-2* se caracterizó en un principio como un oncogen, no estimula la proliferación, pues se ha visto que retrasa la entrada al ciclo celular (Winter et al, 1998). El mecanismo molecular por el cual la proteína Bcl-2 altera el ciclo celular se desconoce. Sin embargo, se ha reportado que tanto la inhibición de la apoptosis, como el efecto antiproliferativo, pueden tener mecanismos diferentes (Huang et al, 1997; Youle y Strasser, 2008). Así mismo, se ha relacionado a esta proteína con la protección contra el estrés oxidante (Luna-López et al, 2010) y la regulación del ciclo celular (Vairo et al, 2000; López-Diazguerrero et al, 2006).

## 2.-JUSTIFICACIÓN

Se sabe que las enfermedades hepáticas son un problema de salud en nuestro país, sin embargo, se ha prestado poca atención a este tipo de enfermedades en el sector de personas mayores de 65 años. Esta es una población que se ha descuidado por mucho tiempo, y que actualmente se está dando la atención deseada, se sabe que los adultos mayores no responden igual que los jóvenes a los tratamientos clínicos. Lo anterior, es relevante ya que según las proyecciones elaboradas por el Consejo Nacional de Población (CONAPO), el crecimiento poblacional de nuestro país está cambiando; es decir, el número de niños en edades preescolares (0 a 5 años) se habrá reducido de 12.2 por ciento en 2005 a 6.6 por ciento en 2050. En cambio, la población en edad de trabajar (15 a 64 años) de 63.5 por ciento en 2005 descenderá a 61.9 por ciento en 2050 y los adultos mayores (65 años o más) abarcarán una proporción cada vez más importante de la población total. En este caso, la población de mayores de 65 años se incrementará de 5.2 por ciento a 21.2 por ciento para el 2050 (Partida Bush, 2006).

Las personas mayores presentan enfermedades degenerativas que se asocian a los daños acumulados por la edad, en particular en cuanto a las enfermedades hepáticas, son la segunda causa de muerte en individuos con edades entre 16-64 años y en el caso de 65 años en adelante, la sexta causa de muerte (Secretaría de Salud Pública, 2008).

Se sabe que en las personas mayores de 65 años, la capacidad de regenerar el tejido es menor y esto afecta a la calidad de vida de las personas con padecimientos hepáticos, así como un mayor gasto en el sector salud. Por lo que resulta importante entender que sucede en un hígado de un animal viejo en respuesta a un daño agudo y si este es capaz de activar a las proteínas asociadas a la proliferación celular. Por otro lado, el estudiar el fenómeno de envejecimiento y senescencia nos ha llevado a proponer a esta última como una posibilidad para tratar de detener el daño que se genera por la activación de las células estelares durante la fibrosis. Ya que el inducir la senescencia en las células estelares activadas, lograría mantenerlas vivas, sin permitirles que continúen dividiéndose. Esto es importante ya que hasta la fecha no existe una terapia adecuada para la reversión de esta enfermedad.

Es por ello, que los resultados de este trabajo podrían servir para después desarrollar métodos de diagnóstico y tratamientos para el control de las enfermedades hepáticas. El proyecto que se desarrolló es parte fundamental en la generación de conocimiento científico vinculado al daño hepático, principalmente porque pretende ayudar a describir los procesos moleculares relacionados con las enfermedades hepáticas y con ello contribuir a una mejor calidad de vida en los habitantes de México.

Sin embargo, como se decidió abordar dos vertientes distintas: inducir senescencia en las células estelares hepáticas y estudiar las vías de proliferación celular en el hígado de animales viejos, se decidió dividir este trabajo en dos partes, que juntas tratarán de estudiar algunos de los problemas hepáticos a los

que se enfrentan los adultos mayores en nuestro país. A continuación se enumeran las preguntas que pretendemos contestar en las dos partes de este trabajo:

#### PREGUNTAS A RESPONDER PARTE 1: FIBROSIS

¿La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 protegerá a las células estelares hepáticas contra el estrés oxidante?

¿Se logrará disminuir la proliferación celular y la síntesis de DNA al inducir la senescencia en las células estelares hepáticas sobreexpresando a la proteína Bcl-2?

¿La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 será suficiente para inducir senescencia replicativa en las células estelares hepáticas?

¿La senescencia replicativa sería una alternativa para disminuir la fibrosis hepática?

#### PREGUNTAS A RESPONDER PARTE 2: MARCADORES DE PROLIFERACIÓN DESPUÉS DE UN INSULTO OXIDANTE

¿Existirán modificaciones en los niveles de las proteínas relacionadas con la progresión del ciclo celular en el hígado de animales viejos en comparación con los animales jóvenes?

¿Responderán diferente las células de animales viejos que las de animales jóvenes ante un estímulo tóxico agudo?

¿La disminución en la capacidad regenerativa en los organismos viejos estará asociada a cambios en los niveles de las moléculas que participan en la regulación del ciclo celular?

Para una mejor comprensión, la tesis se dividirá en dos partes, por lo que primero se describirá y discutirá la parte 1, enfocada al fenómeno de Fibrosis (objetivo 1, hipótesis 1, materiales y métodos 1, resultados 1, discusión 1) y después de igual manera la parte 2 enfocada al fenómeno de marcadores de proliferación después de un insulto oxidante (objetivo 2, hipótesis 2, materiales y métodos 2, resultados 2, discusión 2). Al final se darán unas consideraciones generales y una conclusión global.

## PARTE 1

### 3.-OBJETIVO

Determinar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 induce la senescencia en la línea de células estelares hepáticas (CFSC-2G).

#### 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en la línea de células estelares CFSC-2G.
- Evaluar si la sobreexpresión de Bcl-2 induce senescencia celular determinando diversos parámetros celulares como proliferación y la síntesis de DNA
- Determinar si la sobreexpresión de Bcl-2 induce los cambios la expresión de beta-galactosidasa para evidenciar la presencia de células senescentes (SA-beta-Gal).
- Analizar si la sobreexpresión de Bcl-2 confiere protección durante la respuesta proliferativa posterior a un reto oxidante.
- Evaluar si la sobreexpresión de Bcl-2 confiere protección en cuanto a los niveles de oxidación de las proteínas, posterior a un reto oxidante.

#### 4.- HIPÓTESIS

Puesto que Bcl-2 es una proteína multifuncional que modula el ciclo celular, se espera que su sobreexpresión en la línea CFSC-2G induzca la senescencia replicativa, disminuya la proliferación celular y la producción de matriz extracelular.

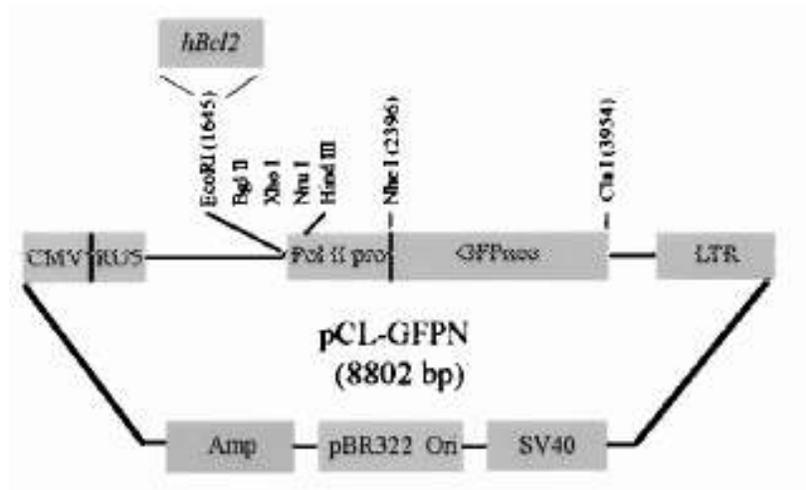
## 5.-MATERIALES Y MÉTODO

### 5.1 CULTIVO CELULAR

En esta parte del trabajo se utilizó la línea de células estelares hepáticas CFSC-2G, obtenida de hígado de rata con cirrosis hepática. Esta fue aislada y amablemente donada por el Dr. Marcos Rojkind de la Escuela de Medicina de la Universidad George Washington. Esta línea celular representa un modelo de células estelares recién aisladas que en el segundo pasaje después de descongeladas adquieren el fenotipo de células estelares activadas (Greenwel et al, 1991). El presente trabajo se realizó con células de más de dos pasajes para tener el fenotipo activado.

### 5.2 TRANSFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CFSC-2G POR LIPOFECCIÓN

Un día antes de llevar a cabo la transfección, se sembraron las células CFSC-2G a una densidad de 2000 células/cm<sup>2</sup> por pozo en las placas (Corning, Inc. USA). Se utilizaron los plásmidos pCL-*gfpN-Hbcl-2* o bien pCL-*gfpN* como control de transfección. Ambos plásmidos presentan resistencia a geneticina y fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Luis Covarrubias del IBT y amablemente donados a nuestro laboratorio. La caracterización de dichos plásmidos se encuentra reportada por Cárdenas-Aguayo y colaboradores (2003) y su representación se muestra a continuación:



La transfección se realizó utilizando 2 $\mu$ g para cada plásmido pCL-*gfpN-Hbcl-2* o pCL-*gfpN* diluido en 100  $\mu$ L de Opti-MEM sin suero, etiquetado en el tubo 1, mientras que en el tubo 2 se le agregó 10  $\mu$ L de lipofectina (Invitrogen, USA) en 100  $\mu$ L de Opti-MEM y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente (TA). Pasado ese tiempo se mezclaron los tubos (1 y 2) suavemente en el tubo 3 y se dejaron 15 min a TA. Por otra parte, se lavaron las células con Medio Esencial Mínimo (MEM; GIBCO-BRL, USA) sin suero y otra vez con Opti-MEM. Al tubo 3 se le adicionaron 800  $\mu$ L de Opti-MEM suavemente. Se les quitó el Opti-MEM y se les adicionó la mezcla del tubo 3 y se dejaron incubando 24 h a 37 $^{\circ}$  C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. Al día siguiente se les cambió el medio a MEM (GIBCO-BRL, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; HYCLONE, USA) y 1 % de Antibiótico -Antimicótico (AB-AM; GIBCO, USA).

### 5.3 SELECCIÓN CON EL ANTIBIÓTICO Y EFICIENCIA DE LA TRANSFECCIÓN EN LAS CÉLULAS CFSC-2G

Puesto que los plásmidos confieren resistencia frente a un antibiótico determinado, para seleccionar las clonas celulares de expresión estable y no transitoria, las células se retaron con geneticina (SIGMA, USA), el antibiótico de resistencia elegido, y se obtuvieron las células que adquirieron el plásmido. Para ello primero se realizó una curva para conocer la dosis necesaria (concentraciones 500, 600, 700, 800, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se sembraron las células CFSC-2G a una densidad de 2000 células/  $\text{cm}^2$  por pozo en las placas de 4 pozos (Corning, Inc, USA), en 1 mL de MEM completo por cada concentración de geneticina y se determinaron durante 3 días continuos. De acuerdo a los resultados se eligió la concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para seleccionar a las células transfectadas. Así mismo, se usó el citómetro de flujo marca FAC SCAN con el programa Cell Quest, para verificar la intensidad media de fluorescencia de la proteína GFP (525-530 nm) y confirmar la transfección de las células (no se muestran estos resultados). A la clona que sobreexpresó a la proteína Bcl-2 de aquí en adelante se le denominará Bcl-2+ y a la que sobreexpresó a la proteína GFP como control de la transfección se le denominará GFP+, mientras que a las células sin transfectar se les llamará CFSC-2G.

## 5.4 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS TRANSFERIDAS DE GEL A LA MEMBRANA (WESTERN BLOT)

### 5.4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se cultivaron las células CFSF-2G, Bcl-2+ y GFP+ en una incubadora con una temperatura de 37 °C con una atmosfera de 95% de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>. El cultivo celular se llevó a cabo con MEM (GIBCO-BRL, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; HYCLONE, USA) y 1 % de Antibiótico -Antimicótico (AB-AM; GIBCO, USA) 1 % aminoácidos no esenciales para MEM (MICROLAB, Mex.). Se sembraron 50000 células/cm<sup>2</sup> por caja de Petri (CORNING, COSTAR, USA).

Se extrajeron las proteínas y se le agregaron 200 µL de solución de lisis (10 ml de M-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific), 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Complete Mini) 100 µL 0.1M PMSF y 100 µL 1M DTT). Posteriormente, se incubó en frío por 15 min. Se centrifugaron a 20,000 X g por 15 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en donde se encontraba la proteína total y se guardó a – 20 ° C.

### 5.4.2 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Las proteína totales se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Como curva patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma).

Se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la proteína total extraída y se colocó en cubetas para espectrofotómetro con 800  $\mu\text{L}$  de agua destilada cada uno. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (BIO RAD, USA) a cada cubeta y se mezcló por inversión. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteína para cada caso usando la curva patrón.

#### 5.4.3 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS TOTALES EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Para el corrimiento de las proteínas totales se prepararon 10 mL del gel de separación al 12 % (3.35 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 100 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 4 mL de acrilamida/bis 30%, 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio 10%, 5  $\mu\text{L}$  de N,N,N',N'-tetrametiletildamina (TEMED) y 10 mL del gel concentrador al 4% (6.1 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 100 mL de SDS 10%, 1.3 mL de bis-acrilamida al 30%, 50  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio al 10%, 10  $\mu\text{L}$  de TEMED). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical (BIO RAD, USA).

En tubos Eppendorf se colocaron 70  $\mu\text{g}$  de las proteínas totales de cada muestra, en un volumen final de 40  $\mu\text{L}$  con buffer 4X (2-mercaptoetanol, SDS, azul de bromofenol y glicerol) y agua destilada.

Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, el marcador de bajo peso molecular y las muestras de las proteínas totales se colocaron en los carriles del gel.

Para el corrimiento electroforético se utilizó un buffer de corrida (Tris 0.25, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó con un voltaje de 120 V durante 1:30 h

#### 5.4.4 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS TOTALES A LA MEMBRANA DE PVDF

Transcurrido el tiempo de corrimiento, se identificó el rango de la posición de la proteína a estudiar: Bcl-2, 26 KDa.

El gel de acrilamida se dividió en dos secciones. Se utilizó el gel que contenía a las proteínas de interés. El gel se transfirió a una membrana de PVDF (GE HELDTHCARE), y en una cámara que contenía el buffer de transferencia frío (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.05%, Metanol 20% y tween 20 1X). La transferencia se realizó con un voltaje de 120 V durante 2 h.

#### 5.4.5 ANTICUERPO PRIMARIO, SECUNDARIO Y REVELADO.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 60 min a temperatura ambiente con TBS-tween (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, tween 20 0.1%, pH 7.5) más 8 % de leche descremada. Después de este tiempo, se lavó 2 veces con TBS-tween.

La membrana se colocó en una solución que contenía el anticuerpo primario. El anticuerpo empleado fue Bcl-2 (Santa Cruz, USA), en TBS-tween durante 1 h y en agitación ligera.

La membrana se lavó durante 5 min con TBS-tween 3 veces. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario,  $\alpha$ -ratón IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce, USA) en TBS-tween, durante 1 h y en agitación ligera. Se lavó la membrana durante 5 min con TBS-tween 2 veces y 1 vez con TBS solo. Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 2 mL de luminol Super Signal West Pico y 2 mL de peróxido Super Signal West Pico Stable.

La identificación se realizó en un fotodocumentador (Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la luminiscencia generada en la reacción de la peroxidasa, indicando la presencia de la proteína.

## 5.5 PROLIFERACIÓN CELULAR

Se cultivaron las células CFSF-2G, Bcl-2+ y GFP+ en una incubadora con una temperatura de 37°C con una atmosfera de 95% de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>. El cultivo celular se llevó a cabo con MEM (GIBCO-BRL, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; HYCLONE, USA) y 1 % de Antibiótico -Antimicótico (AB-AM; GIBCO, USA) 1 % aminoácidos no esenciales para MEM (MICROLAB, Mex.). Se sembraron 50, 000 células/cm<sup>2</sup>, en placas de 24 pozos. Se sembraron tres pozos para realizar cada una de las siguientes determinaciones en los elegidos: viabilidad celular, incorporación de timidina y SA- $\beta$ -Gal.

Para determinar la tasa de proliferación celular, se contó el número total de células vivas cada tercer día por la técnica de exclusión de azul de tripano, de la siguiente manera, las células se lavaron con PBS una vez y se les agregó 200  $\mu\text{L}$  de Tripsina- EDTA 0.25 % (Sigma). Después de despegar las células se inactivó la enzima con 200  $\mu\text{L}$  de MEM + SFB 10 %; se tomó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y 20  $\mu\text{L}$  de azul de tripano. Se homogenizó la mezcla y se tomaron 10  $\mu\text{L}$  para contar el número de células viables en 4 campos del hemocitómetro:  $\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = (\text{el promedio de células}) (2) (10^4)$  (López-Diazguerrero et al, 2006).

## 5.6 INCORPORACIÓN DE TIMIDITA TRITIADA

Para conocer la tasa de síntesis de DNA relacionada con la duplicación celular, se determinó la incorporación de timidita tritiada en cada uno de los grupos celulares antes mencionados. A cada pozo se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio MEM con SFB que contenía 1  $\mu\text{Ci/mL}$  de timidina tritiada (NEN, USA). Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se aspiró con cuidado el medio y se lavó dos veces con PBS, cuidando de no despegar a las células. Las células se fijaron con 500  $\mu\text{L}$  de una solución con metanol al 95% + 5% de PBS y se dejaron incubando durante 15 min a 37 °C. Se retiró el metanol y se lavó cuidadosamente con PBS dos veces. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.2N a cada pozo para hidrolizar y despegar las células adheridas y se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37 °C. Pasado ese tiempo, el contenido de cada pozo se

transfirió a un vial que contenía 5 mL de líquido de centelleo (120g de Naftaleno, 8g de PPO, 0.4g de POPOP, 200 mL de metanol, 40 mL de etilenglicol, 2000 mL de Dioxano). La radiactividad se cuantificó utilizando un contador de centelleo (BECKMAN LS 6500) y se reportó como cuentas por minuto, cpm, de timidina tritiada incorporada/número de células.

## 5.7 SENESCENCIA ASOCIADA A LA $\beta$ -GALACTOSIDASA

Se ha observado que la actividad de la hidrolasa lisosomal  $\beta$ -galactosidasa a pH 6 se encuentra sobreexpresada en las células senescentes. De tal modo se le considera un marcador bioquímico de este estado. El ensayo SA  $\beta$ -galactosidasa se basa en la utilización del sustrato x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactosido) que es degradado por la enzima, produciendo un precipitado de color azul que se observa mediante un microscopio óptico (Dimri *et al*, 1995). Para realizar la técnica, a cada pozo se le agregaron 300  $\mu$ L de solución fijadora (paraformaldehído 2 %,  $MgCl_2$  2 mM, EGTA 1.35 mM y Buffer piperazina-N, N'-bis (2-etanol-ácido sulfónico) (PIPES) 0.1 M provenientes de soluciones stock a pH 6.9 y pH 8, respectivamente). Las células se incubaron 1 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se retiró la solución y se lavó cada pozo tres veces con PBS. Se agregaron 300  $\mu$ L de solución X-gal que contenía 5 mM de  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM de  $K_3Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ , 2 mM  $MgCl_2$  y 1 mg/mL de X-gal (PROMEGA, USA) el pH se ajustó a 6. Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se contaron 100 células en un microscopio óptico. El total de células teñidas y no teñidas correspondieron al 100%. Las células fijadas se almacenaron a 4 °C.

## 5.8 TRATAMIENTOS CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se cultivaron células CFSC-2G, Bcl-2 + y GFP+ en una incubadora con una temperatura de 37°C con una atmosfera de 95% de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>. El cultivo celular se llevó a cabo con MEM (GIBCO-BRL, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; HYCLONE, USA) y 1 % de Antibiótico-Antimicótico (AB-AM; GIBCO, USA) 1 % aminoácidos no esenciales para MEM (MICROLAB, Mex.). Se sembraron 50,000 células/cm<sup>2</sup>. Se realizaron tratamientos con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno: 150, 300, 450 y 600 µM durante 1 h. Posteriormente se llevó a se contó el número de células vivas como se describió anteriormente.

## 5.9 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

Se sembraron 50,000 células/cm<sup>2</sup> y después de 24 h se realizó el tratamiento con 300 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h. Se llevó a cabo la extracción de proteínas totales de las cajas de cultivo de la siguiente manera: se lavaron las células con PBS y se despegaron con gendarme. Se recuperaron las células y se resuspendieron en 200 µL del buffer de lisis M-per, el cual está suplementado con inhibidor de proteasas (DTT y PMSF). Se incubaron 15 min en hielo y posteriormente se centrifugaron a 14,000 g durante 5 min; se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas por medio de la técnica de Bradford. A partir de 50 µg de proteína, se determinaron los niveles de proteína oxidada con el kit oxy-blot, siguiendo las especificaciones del proveedor.

## 5. 10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos de proliferación celular, síntesis de DNA y el ensayo SA- $\beta$ -gal se realizaron por triplicado en 3 experimentos independientes. Mientras que el experimento con tratamiento agudo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó por duplicado en 4 experimentos independientes. Para analizar los datos se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA seguida por Tukey con una  $p < 0.05$

## 6.-RESULTADOS

### 6.1 SOBREENPRESION Bcl-2

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos con respecto a la sobreexpresión de la proteína Bcl-2. Se observa que las células transfectadas con la técnica de lipofectamina, son las únicas que sobreexpresan a la proteína Bcl-2 (Bcl-2+). Como control de transfección se obtuvieron las células las GFP+ que sobreexpresan a la proteína verde fluorescente. Las células control son las que no se transfectaron (CFSC-2G).

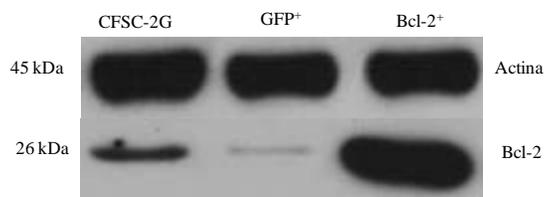


Figura 1. Niveles de sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en células CFSC-2G.

Western blot representativo en el cual se muestra que solo las células CFSC-2G incorporaron el cDNA de la proteína Bcl-2. Como control de carga se usó actina. La figura es una imagen representativa de los geles obtenidos en tres experimentos independientes.

## 6.2 PROLIFERACIÓN CELULAR

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de proliferación celular. Se graficó el número de células en función del día de cultivo. Se observa que hay una tendencia a incrementar el número de células hasta el día 5. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tres tipos celulares. Cabe mencionar que al día 5 las células llegaban a confluencia por lo que se tenían que despegar y resembrar, y cuando se volvieron a contar (datos no mostrados) mostraban el mismo comportamiento. Esto se realizó durante dos meses y nunca se encontró diferencia entre ellas.

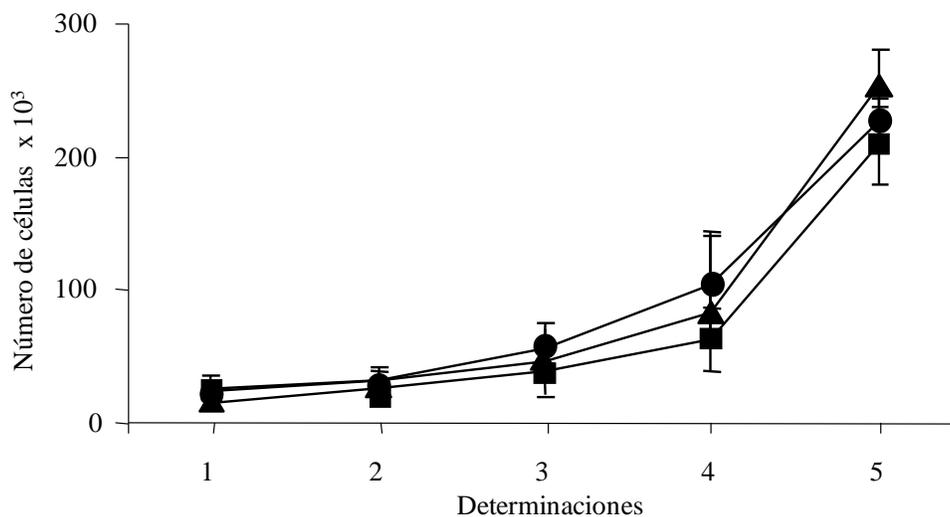


Figura 2. Tasa de proliferación celular.

El número de células se determinó como se describe en materiales y métodos. La gráfica muestra los valores obtenidos para las células estelares hepáticas CFSC-2G (círculos), GFP+ (cuadrados) y Bcl-2+ (triángulos). Se muestran los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado en tres experimentos independientes.

### 6.3 SÍNTESIS DE DNA

En la figura 3 se observan los resultados obtenidos al cuantificar la síntesis de DNA. EN la figura se graficó el número de cuentas por minuto (CPM) obtenidas en función de los días de cultivo del experimento. Se observa claramente que hasta el día 5 hay un incremento continuo en la incorporación de timidina tritiada, pero no se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar los tres tipos de células.

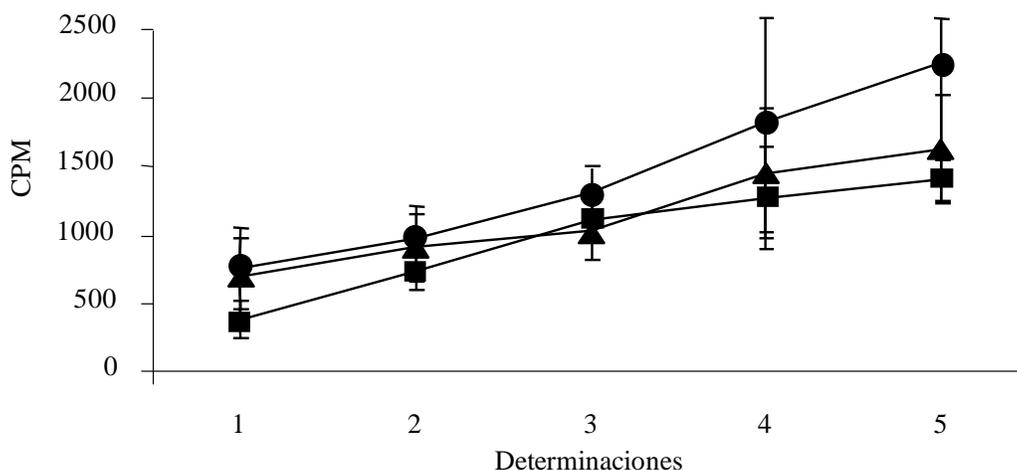


Figura 3. Síntesis de DNA en células estelares hepáticas.

En la figura se muestra la incorporación de timidina tritiada en los diferentes tipos celulares células estelares hepáticas CFSC-2G (círculos), GFP+ (cuadrados) y Bcl-2+ (triángulos). Se muestran los valores promedio  $\pm$  desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado en tres experimentos independientes. CPM (cuentas por minuto).

#### 6.4 DETERMINACIÓN DE SENESCENCIA

En la figura 4 se observan las imágenes de las células que fueron teñidas con la técnica SA- $\beta$  Gal. Las imágenes 4A (CFSC-2G), 4B (GFP+) y 4C (Bcl-2+) corresponden a las células estelares. En las fotografías no se observan células teñidas en ningún tipo celular. En la imagen 4D se presenta, a manera de control positivo, una muestra de fibroblastos primarios de pulmón de ratón teñidos con la técnica SA- $\beta$  Gal, en los cuales si se observan células teñidas de color azul, lo cual nos indica que son positivas a la tinción de  $\beta$ -galactosidasa y por lo tanto son células senescentes. Estos datos, aunados a los de síntesis de DNA y proliferación celular sugieren que la sobreexpresión de Bcl-2 en estas células no indujo senescencia.

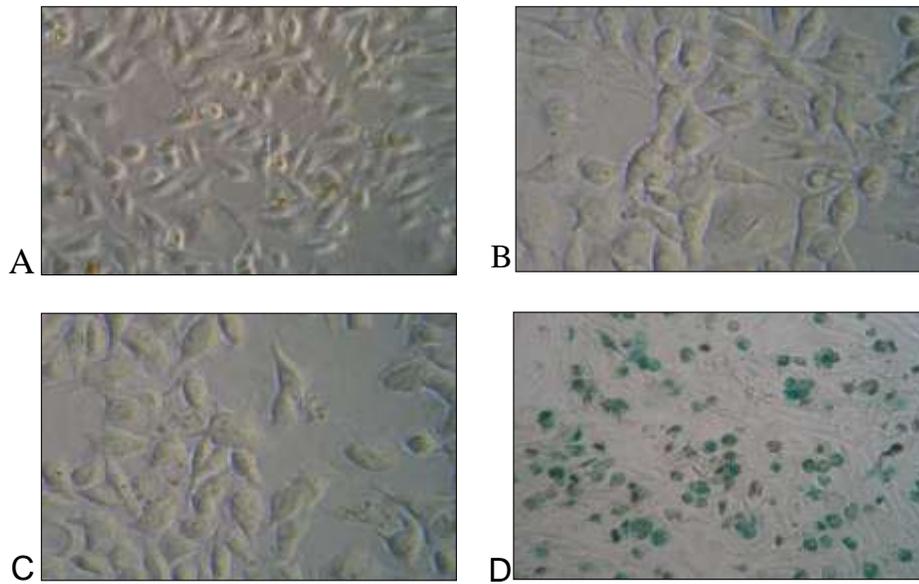


Figura 4. Tinción de  $\beta$ -Galactosidasa asociada a la senescencia

A. CFSC-2G 100X; B. GFP+ 200X; C. Bcl-2+ 200X; D. Control positivo: una muestra de fibroblastos primarios de pulmón de ratón teñidos con la técnica SA-  $\beta$  -Gal, en los cuales si se observan células teñidas de color azul, lo cual nos indica que son positivas a la tinción de  $\beta$  -galactosidasa y por lo tanto son células senescentes, 200X. Las determinaciones se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes.

## 6.5 TRATAMIENTO AGUDO CON H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En la figura 5 se presentan los resultados obtenidos al tratar a las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 h. Las células Bcl-2+ presentan una protección estadísticamente significativa con respecto a las GFP+ y control. Se observa una protección a partir del tratamiento con 150 μM. En este caso, la protección fue del 13 %, mientras que se encontró una protección del 29 % para el tratamiento con 300 μM, y un 18 y 15 % respectivamente para los tratamientos de 450 y 600 μM.

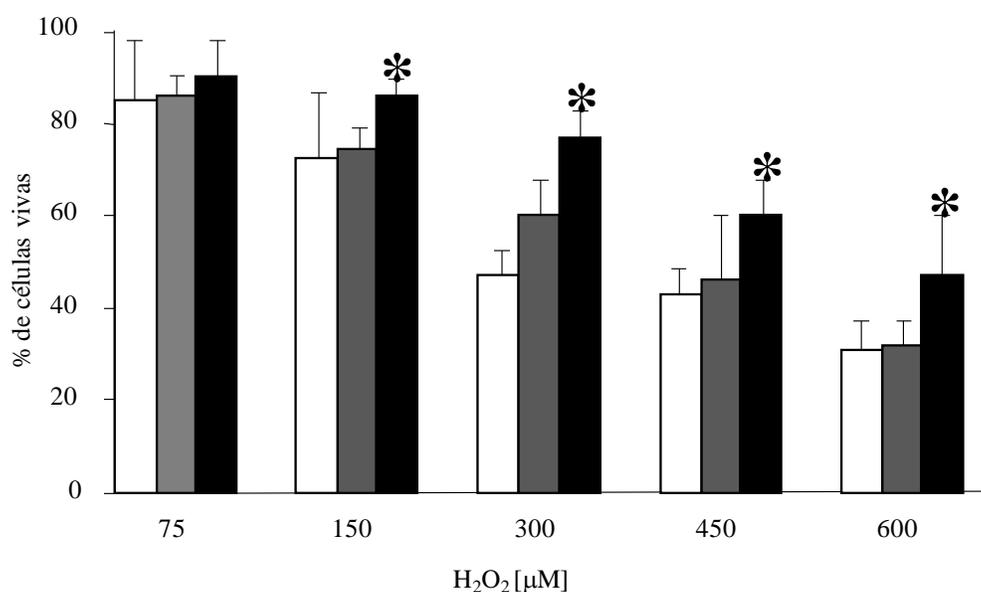


Figura 5. Células estelares hepáticas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las células fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h como se describe en materiales y métodos. Las columnas blancas representan a las células CFSC-2G, las grises a las células GFP+ y las negras a las Bcl-2+. Los datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

\*  $p < 0.05$

## 6.6 OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

En la figura 6 (A y B) se representan los resultados obtenidos al tratar a los tres tipos celulares con 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 1 h. Los carriles 1 y 2 representan el control de transfección CFSC-2G y GFP+, el carril 3 representa a las células Bcl-2+ células tratadas con peróxido. Los carriles 4, 5 y 6 son las células CFSC-2G, GFP+, y Bcl-2+ sin tratar. El análisis densitométrico reveló que la sobreexpresión de Bcl-2 protege a las células de la oxidación de proteínas en aproximadamente el 35 %.

300 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	-	-	-
Línea	1	2	3	4	5	6

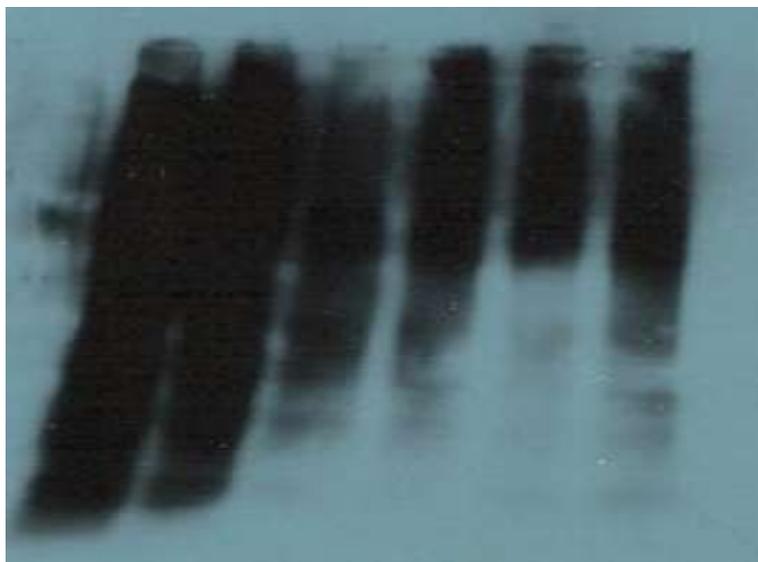


Figura 6 A. Gel de la oxidación de proteínas.

Las células se trataron con 300  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 h como se describe en materiales y métodos. En la línea 1 y 2 se corrieron las proteínas aisladas de las células CFSC-2G y GFP+ respectivamente, en la línea 3 las proteínas de las células Bcl-2. Las líneas 4, 5, y 6 son sus controles respectivos. La imagen es un gel representativo n = 2.

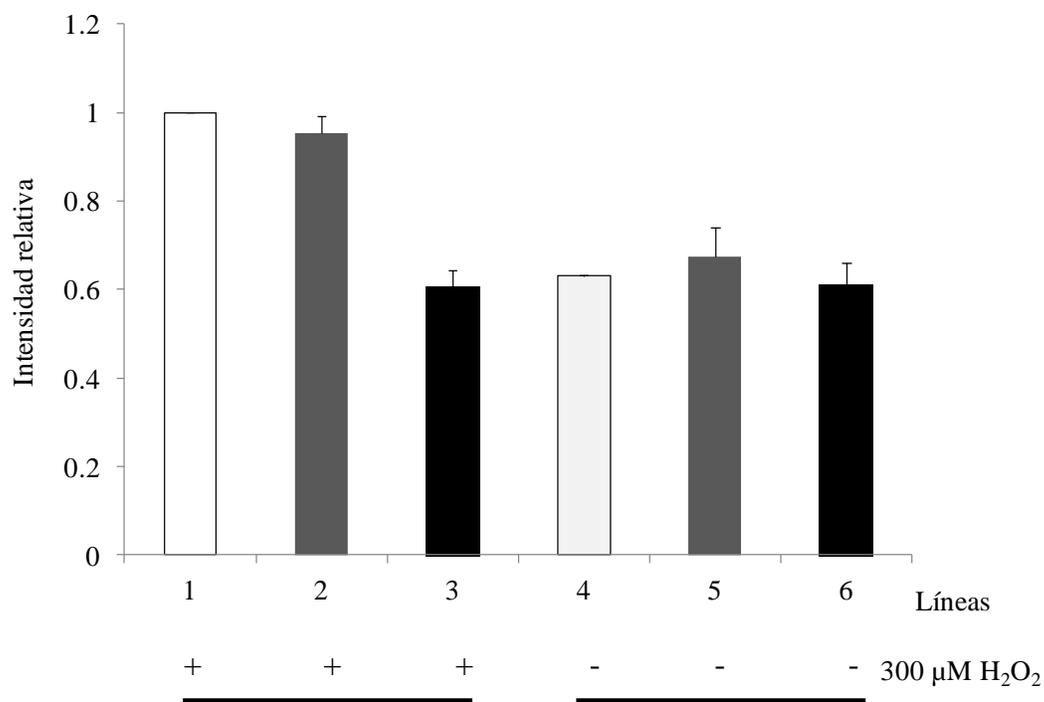


Figura 6 B. Intensidad relativa para cuantificar la oxidación de proteínas.

En la figura se grafica el promedio del análisis densitométrico realizado a los resultados de la oxidación de proteínas de la figura 6A. Las columnas blancas representan a las células CFSC-2G (líneas 1 y 4 de la figura 6A), las grises a las células GFP+ (líneas 2 y 5 de la figura 6A) y las negras a las Bcl-2+ (líneas 3 y 6 de la figura 6A). Las barras 1, 2 y 3 representan a las células tratadas con  $H_2O_2$ , mientras que las barras 4, 5, y 6 representan a las células sin tratamiento.

## 7. DISCUSION

Para el estudio de los fenómenos relacionados con la fibrosis hepática a nivel celular y/o molecular existen diversos modelos que pueden ser utilizados. Es común que los experimentos se lleven a cabo en cultivos primarios, ya que se asemejan más a lo que estaría ocurriendo realmente *in vivo*. Sin embargo, en este trabajo se decidió emplear una línea celular de células estelares y no un cultivo primario, puesto que dichas células provenían de animales cirróticos, que además de seguir proliferando de manera constante como las células estelares activadas, permite mantener controladas una gran cantidad de variables, tener cultivos homogéneos, así como estudiar un fenómeno de manera particular. Es por eso que se utilizó la línea celular CFSC-2G donada por el Dr. Rojkind, la cual fue extraída de ratas cirróticas. Dicha línea celular es un modelo que presenta ciertas ventajas como el hecho de que la tasa de crecimiento es rápida, las células mantienen la viabilidad en un período ilimitado, el rendimiento del cultivo es alto y se tiene la homogeneidad, etc. (Schaefer et al, 2003).

Es por ello, que el primer objetivo de este trabajo fue determinar si la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en una línea de células estelares hepáticas lograría inducir la senescencia celular y proteger a las células contra el estrés oxidante. Existen reportes en donde al introducir un oncogen, se logró inducir la senescencia en líneas celulares (Crescenzi et al, 2003). De manera que como Bcl-2 es una proteína que retrasa el ciclo celular, induce senescencia y protege a las células del daño oxidante (López-Diazguerrero et al, 2005) se esperaba que indujera senescencia en las células CFSC-2G.

Para determinar los efectos de la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en la línea celular hepática, se realizaron ensayos para evaluar la proliferación celular, la síntesis de DNA y conteo de células senescentes. Los resultados obtenidos en la evaluación de la proliferación celular e incorporación de la timidina tritiada a lo largo 5 días continuos, denotaron que las células control CFSC-2G, Bcl-2+ y GFP+ presentaban un crecimiento constante, y no se encontró ninguna diferencia estadística significativa cuando se realizó la comparación. Cabe mencionar que estas células se siguieron monitoreando por dos meses y mantuvieron la capacidad de proliferación.

Con respecto a los resultados del ensayo SA- $\beta$ -Gal, no se presentó ninguna diferencia en los tres tipos celulares (Bcl-2 +, GFP+ y CFSC-2G), ya que no se tiñeron con el reactivo de X-gal, además la línea Bcl-2+ continuó proliferando desde que se llevó a cabo la transfección, hasta varios meses después. Esto nos permitió deducir que las células no se encontraban en etapa senescente, a este respecto, se ha reportado que las células senescentes, presentan una interrupción irreversible del ciclo celular en la fase G0/G1 y no responden a estímulos mitogénicos (Muller, 2009).

Resulta interesante analizar porque la sobreexpresión de Bcl-2 en nuestro modelo no indujo senescencia, ya que se ha reportado que en las células humanas como de ratones, el fenotipo senescente es dominante sobre el fenotipo pre-senescente o inmortal (Wang, 1995); es decir que sí se presenta la acumulación de células senescentes puede alterar el entorno en el que se sitúan (Wang, 1995). Además se sabe que la proteína Bcl-2 tiene una participación en la regulación del ciclo

celular relacionando el incremento en los niveles de p27 (inhibidor de CDKs), y de p130 que pertenece a la familia de pRb. Cuando aumenta p130, se une a E2F4, impidiendo que se lleve a cabo la transcripción de E2F1 necesaria para la progresión del ciclo celular (Vairo et al, 2000).

Por otro lado, el grupo de Crescenzi (2003) reportó que la expresión constitutiva de la proteína Bcl-2 en una línea celular de carcinoma de endometrio humano, inducía la detención del ciclo en la fase G1 del ciclo celular de manera irreversible. En este caso, las células adquirieron un fenotipo senescente con características morfológicas alteradas y un aumento en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Sin embargo, en este trabajo no se encontró efecto de Bcl-2 sobre la proliferación, la síntesis de DNA, ni en la senescencia.

En este punto es posible sugerir varias hipótesis, una de ellas pudiera ser por el tipo de células que se utilizaron. La línea CFSC-2G fue modificada al ser extraída de ratas que tenían cirrosis hepática y posteriormente inmortalizadas. Se sabe que para que un cultivo primario se immortalice y se convierta en línea celular, se deben producir una serie de mutaciones sobre genes que regulan el ciclo celular. Un ejemplo claro de ellos, es que se da un incremento de la expresión de proteínas que favorecen la proliferación celular, como la ciclina D1 y se disminuyen algunas proteínas que detienen el ciclo, como podrían ser los inhibidores de las CDK, y supresores de tumores pRb, p53 (Chen et al, 2001). Por lo que es posible que en la línea CFSC-2G se encuentren elevados los niveles de la ciclina D1, lo cual haría difícil la detención del ciclo celular.

Por otro lado pudiera ser que esta línea celular CFSC-2G tuviera incrementada la actividad de la enzima telomerasa. Se sabe que las células inmortalizadas tienen elevados los niveles de ésta enzima que podría elongar los telómeros y mantener la capacidad proliferativa, y por tanto evitar la disminución en la proliferación (Steinert et al, 2000). Se han reportado bajos niveles en la actividad de la enzima telomerasa en el hígado normal (Park et al, 1998). Sin embargo se sabe que la telomerasa puede llegar a ser activada en las enfermedades crónicas del hígado (Aikata et al, 2000; Brown et al, 2007; Calado y Young, 2009).

En cuanto a la protección contra el estrés oxidante, los resultados mostraron que la sobreexpresión de Bcl-2 efectivamente protege de la muerte por el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35.7%) en comparación con lo que se observó para las células GFP+ y CFSC-2G. Estos datos corroboran algunos reportes en donde el demuestra que Bcl-2 puede activar mecanismos antioxidantes, posiblemente induciendo la síntesis de glutatión reducido (Lee et al, 2001). Así mismo se sabe que la proteína Bcl-2 incrementa la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) (Hildeman et al, 2003), y también disminuye la oxidación de los lípidos (Hockenbery et al, 1993), además de mantener niveles bajos de fragmentación del DNA, así como una disminución en las especies reactivas de oxígeno (Kowaltowski y Fiskum, 2005; Jiang et al, 2011).

Lo anterior apoya los reportes donde se menciona que la proteína Bcl-2 promueve la supervivencia celular. Asimismo, es bien sabido que las células que sobreexpresan Bcl-2 no son susceptibles a la muerte por apoptosis, lo cual pone a esta proteína en un lugar difícil en cuanto a la supervivencia celular, ya que al ser

una proteína de supervivencia, protege a las células de la muerte, a pesar de presentar daños, que en condiciones de no haber un exceso de Bcl-2, inducirían muerte por apoptosis. Se ha reportado que las células cancerosas que sobreexpresan a Bcl-2 no son susceptibles a los tratamientos que promueven la apoptosis. Sin embargo, se ha reportado que al silenciar a Bcl-2 si se logra inducir dicha muerte (Novo et al, 2006). Así mismo, este grupo ha reportado resultados al parecer contradictorios con otros artículos de la literatura donde encuentran que las células estelares senescentes presentan una expresión disminuida de la proteína Bcl-2 y por lo tanto, no son resistentes a estímulos apoptóticos (Novo et al, 2006).

Bcl-2 es una proteína que se ha relacionado con la senescencia celular, regula el ciclo celular, es anti-apoptótica, y que protege contra el estrés oxidante. Por lo que, pudiera pensarse que la proteína Bcl-2 es una molécula que lleva a cabo diversas funciones que están relacionadas con la supervivencia celular. En el caso del :estrés oxidante protegiendo y evitando los daños producidos por el peróxido de hidrógeno en las células Bcl-2+. Aun se desconocen los mecanismos por los que se lleva a cabo esta protección. Los resultados obtenidos con el tratamiento agudo demuestran que la proteína Bcl-2 pudiera actuar de manera importante en la preservación de la supervivencia celular. De modo que sería interesante que posteriormente se realicen algunos experimentos relacionados con los niveles de enzimas antioxidantes, el estado redox, así como cuantificar el daño producido por el estrés oxidante en las células que sobreexpresan a la proteína Bcl-2, que nos

permita entender el mecanismo de regulación por el que se rige esta proteína y seguir proponiendo alternativas terapéuticas.

## PARTE 2

### 8.- OBJETIVO

Determinar si existen diferencias en función de la edad, en cuanto a la expresión de proteínas que participan en la respuesta proliferativa de las células hepáticas, después de un daño agudo.

### 9.-OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los patrones de activación de las proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular: c-MET y AKT después de la inducción de un daño agudo con CCl<sub>4</sub> en ratones hembra jóvenes y viejas.
- Comparar los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular, ciclina D1, p27, p16, después de la inducción de un daño agudo con CCl<sub>4</sub> en ratones hembra jóvenes y viejas.

## 10.- HIPÓTESIS

Puesto que los organismos viejos tienen una mayor susceptibilidad al daño y una menor capacidad proliferativa después del mismo, se esperaría encontrar en el hígado de los ratones viejos posterior a un insulto agudo con  $\text{CCl}_4$  una disminución en los niveles de las moléculas que participan en la proliferación celular,

## 11.-MATERIALES Y MÉTODOS

### 11.1 ANIMALES

Se utilizaron ratones hembra vírgenes de la cepa CD1 de 2 meses de edad con apertura vaginal como adultos jóvenes totalmente desarrollados (jóvenes, J), así como hembras de pie de cría, de 18 meses multíparas como animales deteriorados y viejos (viejos, V) según el modelo que se ha usado por nuestro grupo y reportado previamente (Königsberg et al, 2007). Los animales se obtuvieron del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y se trataron según las normas éticas aprobadas por la norma oficial mexicana 062-ZOO-1999. Se utilizaron 5 animales por grupo.

### 11.2 TRATAMIENTOS CON TETRECLORURO DE CARBONO (CCl<sub>4</sub>)

A los animales jóvenes (JT) como a los viejos (VT) se les aplicó una sola dosis por vía intraperitoneal con CCl<sub>4</sub> a una concentración de 0.4 mg/g de peso en aceite mineral. La dosis empleada fue una dosis subletal moderada, para inducir una respuesta celular frente a un insulto oxidante agudo.

De igual manera, se inyectaron otros dos grupos de animales jóvenes (JC) y viejos (VC) únicamente con aceite mineral, siendo estos los grupos controles. Los ratones se sacrificaron después de las 24 h y se obtuvieron los hígados. Se extrajeron las proteínas totales que se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976), previo a realizar los inmunoensayos correspondientes de las proteínas de interés.

### 11.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Se homogenizaron 100 µg de hígado en 200 µL de solución de lisis (10 ml de M-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA) a la cual se le agregó una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete Mini), 100 µL 0.1M PMSF y 100 µL 1M DTT). Posteriormente, se incubó en hielo durante 15 min. Los homogenados se centrifugaron a 20,000 X g por 15 min a 4 °C. Se colectaron los sobrenadantes en donde se encontraba la proteína total y se guardaron a – 20 °C, para posteriormente determinar su concentración.

### 11.4 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA TOTAL POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para elaborar la curva patrón se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma).

Se tomó 1 µL de la proteína total extraída y se colocó en cubetas para espectrofotómetro con 800 µL de agua destilada cada uno. Se agregaron 200 µL de reactivo de Bradford (BIO RAD) a cada cubeta y se mezcló por inversión. Cada muestra se leyó en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteína para cada caso usando la curva patrón.

## 11.5 INMUNOENSAYO TIPO WESTERN BLOT

### 11.5.1 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS TOTALES EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Para la separación electroforética de las proteínas totales se prepararon 10 mL del gel de separación al 12 % (3.35 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 100 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, 4 mL de acrilamida/bis 30%, 50  $\mu$ L de persulfato de amonio 10%, 5  $\mu$ L de N,N,N',N'-tetrametiletilendmina (TEMED) y 10 mL del gel concentrador al 4% (6.1 mL de agua destilada, 2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 100 mL de SDS 10%, 1.3 mL de bis-acrilamida al 30%, 50  $\mu$ L de persulfato de amonio al 10%, 10  $\mu$ L de TEMED). Se utilizó una cámara de electroforesis vertical (BIO RAD).

En tubos Eppendorf se colocó el volumen correspondiente a 70  $\mu$ g de las proteínas totales de cada muestra, para completar un volumen final de 40  $\mu$ L con buffer 4X (2-mercaptoetanol, SDS, azul de bromofenol y glicerol) y agua destilada.

Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 5 min para desnaturalizar a las proteínas. Posteriormente, el marcador de bajo peso molecular y las muestras de las proteínas totales se colocaron en los carriles del gel.

Para el corrimiento electroforético se utilizó un buffer de corrida (Tris 0.25, glicina 1.92 M, SDS 1%, pH 8.3). El corrimiento se realizó con un voltaje de 120 V durante 1:30 h

### 11.5.2 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS TOTALES A LA MEMBRANA DE PVDF

Transcurrido el tiempo de corrimiento, se identificó el rango de la posición de la proteína a estudiar: c-Met y pc-Met 180 KDa, AKT y pAKT 60 KDa, p27 y p16, 16 y 27 KDa respectivamente, Ciclina D1 35 KDa, actina 45 KDa.

El gel de acrilamida se dividió en dos secciones. Se utilizó el gel que contenía a las proteínas de interés. El gel se transfirió a una membrana de PVDF (GE HELDTHCARE, USA), y en una cámara que contenía el buffer de transferencia frío (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.05%, Metanol 20% y tween 20 1X). La transferencia se realizó con un voltaje de 120 V durante 2 h.

### 11.5.3 ANTICUERPO PRIMARIO, SECUNDARIO Y REVELADO.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó durante 60 min a temperatura ambiente con TBS-tween (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, tween 20 0.1%, pH 7.5) mas 8 % de leche descremada. Después de este tiempo, se lavó 2 veces con TBS-tween.

La membrana se colocó en una solución que contenía el anticuerpo primario. Los anticuerpos empleados de manera independiente fueron: pc-M1234ET Tyr 1234 (Santa Cruz, USA), p AKT ser473 (Santa Cruz), p27 (Santa Cruz), Ciclina D1 (Santa Cruz), p16 (Santa Cruz), en TBS-tween durante 1 h y en agitación ligera.

La membrana se lavó durante 5 min con TBS-tween 3 veces. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario dependiendo del caso,  $\alpha$ -ratón IgG o conejo

conjugado con peroxidasa de rábano (Pierce) en TBS-tween, durante 1 h y en agitación ligera. Se lavó la membrana durante 5 min con TBS-tween 2 veces y 1 vez con TBS solo. Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 2 mL de luminol Super Signal West Pico y 2 mL de peróxido Super Signal West Pico Stable.

La identificación se realizó en un fotodocumentador (Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la luminiscencia generada en la reacción de la peroxidasa, indicando la presencia de cada proteína.

#### 11.5.4. NORMALIZACIÓN DE LOS DATOS

Cabe mencionar que todas las densitometrías se normalizaron considerando al contenido de proteína obtenido de los ratones jóvenes sin tratamiento, como control y se le adjudicó el valor de uno.

#### 11.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada animal tratado con  $\text{CCl}_4$  o control se consideró como un experimento independiente, por lo que se realizaron por 5 experimentos independientes por triplicado o cuadruplicado para cada caso. Para analizar los datos se utilizó la prueba paramétrica de ANOVA seguida por Tukey con una  $p < 0.05$ .

## 12.- RESULTADOS

Para los resultados de la segunda parte de la tesis, es importante mencionar que se analizaron dos cuestiones en cuanto a los niveles de proteínas relacionadas con la respuesta de proliferación.

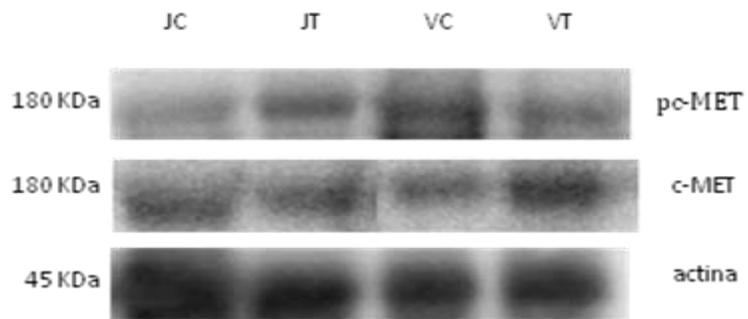
1. Se analizó la capacidad tanto de los animales jóvenes, como de los animales viejos para desarrollar una respuesta primaria frente a un tratamiento agudo, no severo, con CCl<sub>4</sub>.
2. Se determinó la diferencia entre los niveles basales de las proteínas antes mencionadas entre animales jóvenes y viejos. Es decir, la diferencia absoluta en función a la edad, sin ningún tratamiento.

### 12.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA VÍA DE PROLIFERACIÓN

#### 12.1.1 c-Met

En la figura 7 se observan los resultados obtenidos al tratar a los ratones jóvenes y viejos con CCl<sub>4</sub> por 24 h. Como resultado del análisis densitométrico se puede observar la activación del receptor c-Met. Como se muestra, los ratones jóvenes responden al tratamiento con CCl<sub>4</sub> incrementando al doble la activación de c-Met. En el caso de los ratones viejos, no se encontró ninguna diferencia con respecto a los animales jóvenes sin tratamiento, sin embargo si se observa una ligera respuesta ante el tratamiento. La respuesta no es tan notoria como en el caso de

los animales jóvenes, ya que los ratones viejos presentan un incremento de 0.65 veces con respecto a su control después del tratamiento con CCl<sub>4</sub>.



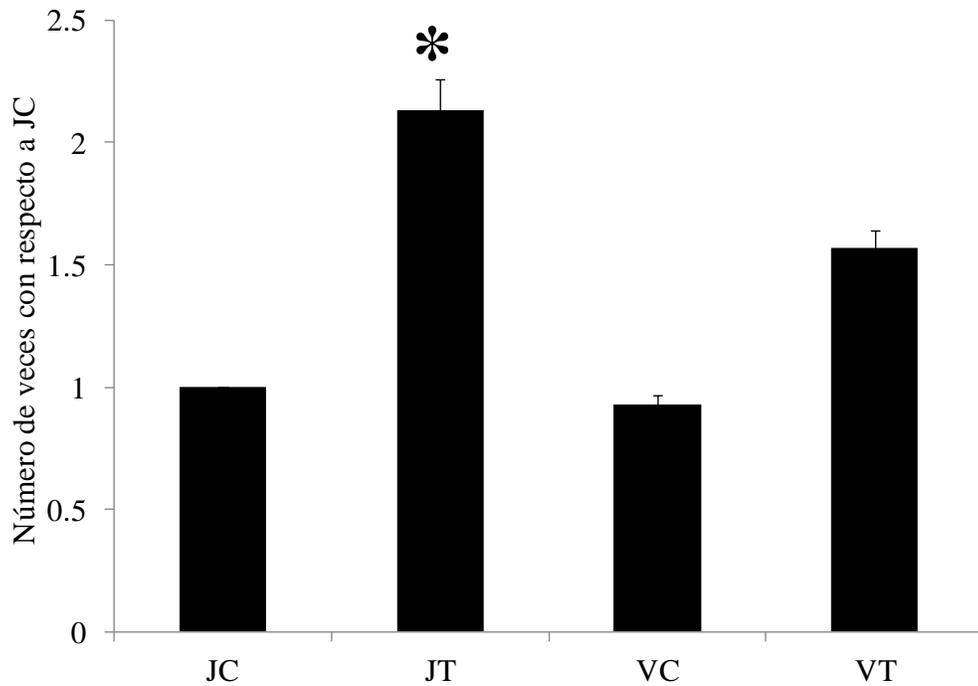


Figura 7. Activación de c-Met.

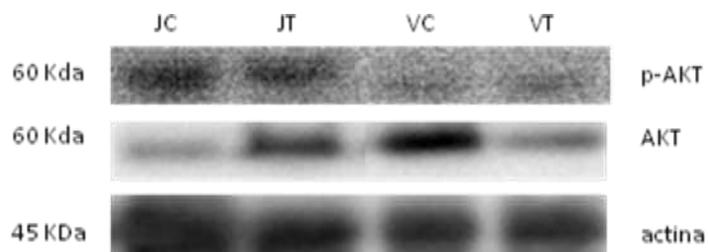
En la figura se ilustra un Western blot representativo. Como control de carga se utilizó actina. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados) VC (viejas control) VT (viejas tratadas). Los datos empleados para la gráfica son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC.

### 12.1.2 AKT

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos después del tratamiento con  $\text{CCl}_4$  en cuanto a la activación de AKT en los ratones jóvenes y viejos. En los resultados del análisis densitométrico se puede apreciar que los animales jóvenes presentaron una activación de AKT de 0.3 veces comparado con el control, como respuesta al insulto oxidante.

En el caso de los animales viejos, se encontró que previo al tratamiento, estos ya tenían niveles mayores de AKT fosforilado que los jóvenes (0.3 veces). Sin embargo, esta activación no se modificó después del tratamiento con  $\text{CCl}_4$ .

En la figura 9 se aprecia la densitometría realizada para la expresión de AKT total. El análisis de los datos reveló que los animales jóvenes tratados presentaron un incremento del 100% en la expresión de AKT total, como respuesta al daño sub-agudo, sin embargo, este dato no es significativo. De manera interesante, en el caso de los ratones viejos, se encontró que los niveles basales de AKT fueron 2.7 veces más altos que los encontrados en los controles jóvenes ( $p < 0.05$ ), no obstante, la expresión de AKT no se modificó después del tratamiento con  $\text{CCl}_4$ .



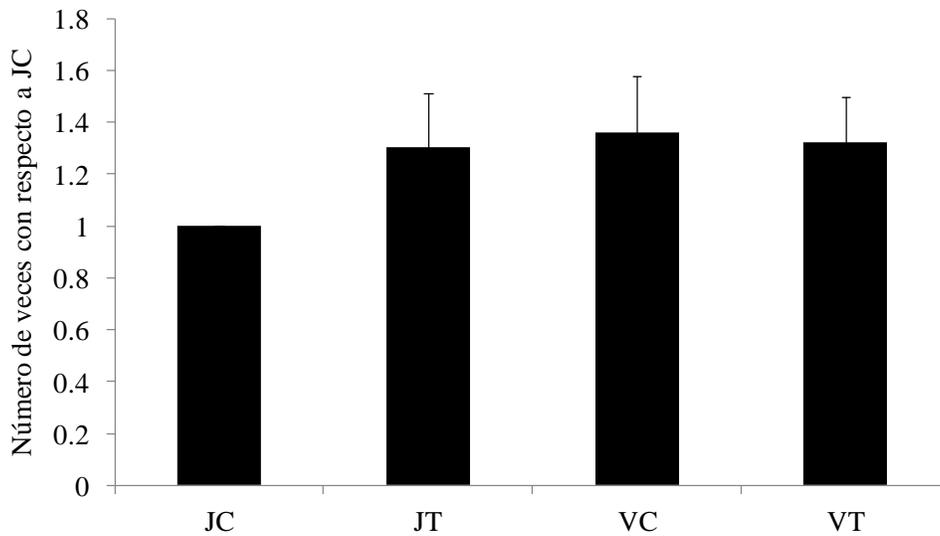


Figura 8. Activación de AKT.

En la figura se ilustra un Western blot representativo. Como control de carga se utilizó actina. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados) VC (viejas control) VT (viejas tratadas). Los datos empleados para la gráfica son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC.

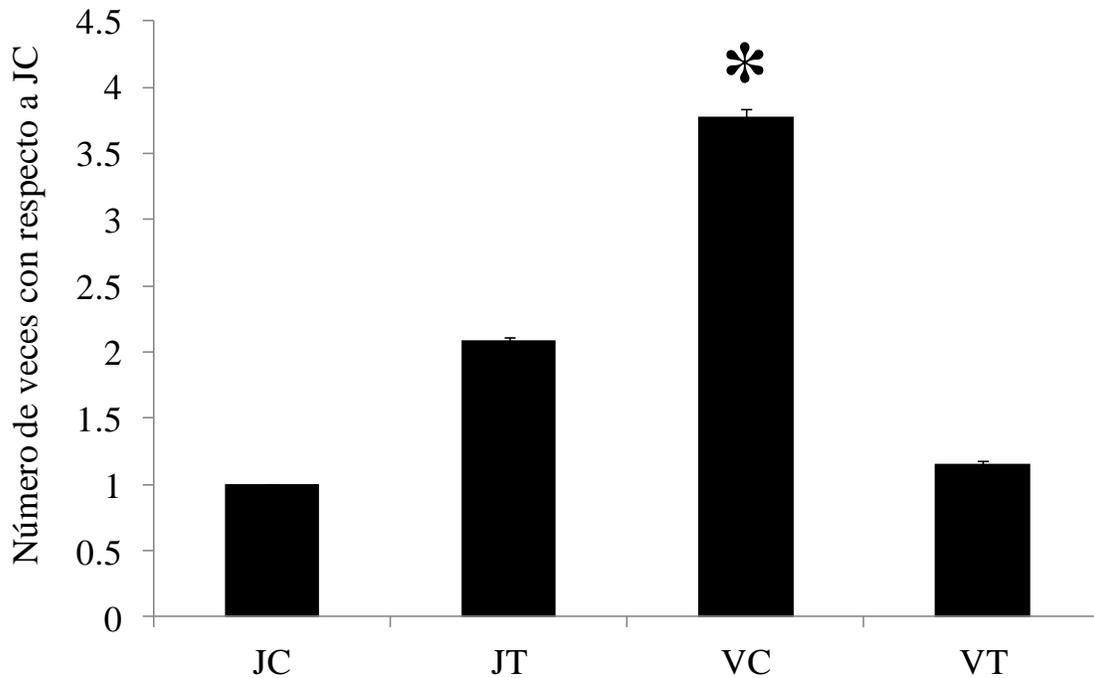
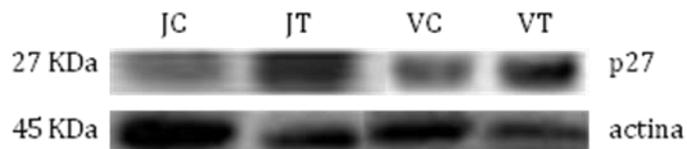


Figura 9. Expresión de AKT.

En la figura se ilustra un Western blot representativo. Como control de carga se utilizó actina. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados) VC (viejas control) VT (viejas tratadas). Los datos empleados para la gráfica son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC.

### 12.1.3 PROTEÍNA p27

En la figura 10 puede observarse que los animales jóvenes tratados con CCl<sub>4</sub> incrementaron sus niveles de la proteína p27 en 1.5 veces con respecto al control. Asimismo los ratones viejos sin ningún tratamiento también mostraron un incremento en la expresión dicha proteína de 1.5 veces. De manera muy interesante se encontró que al tratar a los organismos viejos el aumento de p27 fue mayor, siendo de 2.8 veces con respecto al control. Todos estos cambios en la proteína p27 fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).



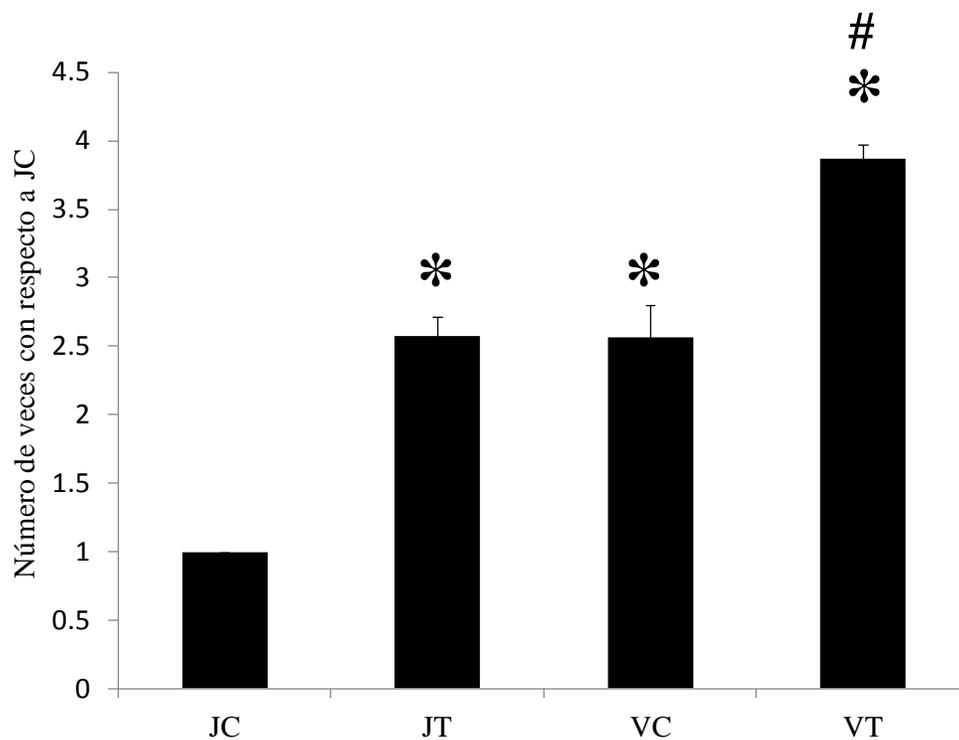


Figura10. Expresión de p27.

En la figura se ilustra un Western blot representativo. Como control de carga se utilizó actina. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados) VC (viejas control) VT (viejas tratadas). Los datos empleados para la gráfica son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC. #  $p < 0.05$  vs VC.

#### 12.1.4 CICLINA D1

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos al analizar la expresión de la proteína ciclina D1. No se encontró ninguna diferencia significativa en el contenido de ciclina 1 en los ratones jóvenes después del tratamiento. No obstante, es claro que la expresión de la ciclina D1 presentan un incremento en los organismos viejos (V), tanto los no tratados como los que si lo fueron, el incremento fue de 0.8 y 4 veces respectivamente en comparación al control, aunque únicamente el aumento en los ratones viejos tratados con CCl<sub>4</sub> fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).



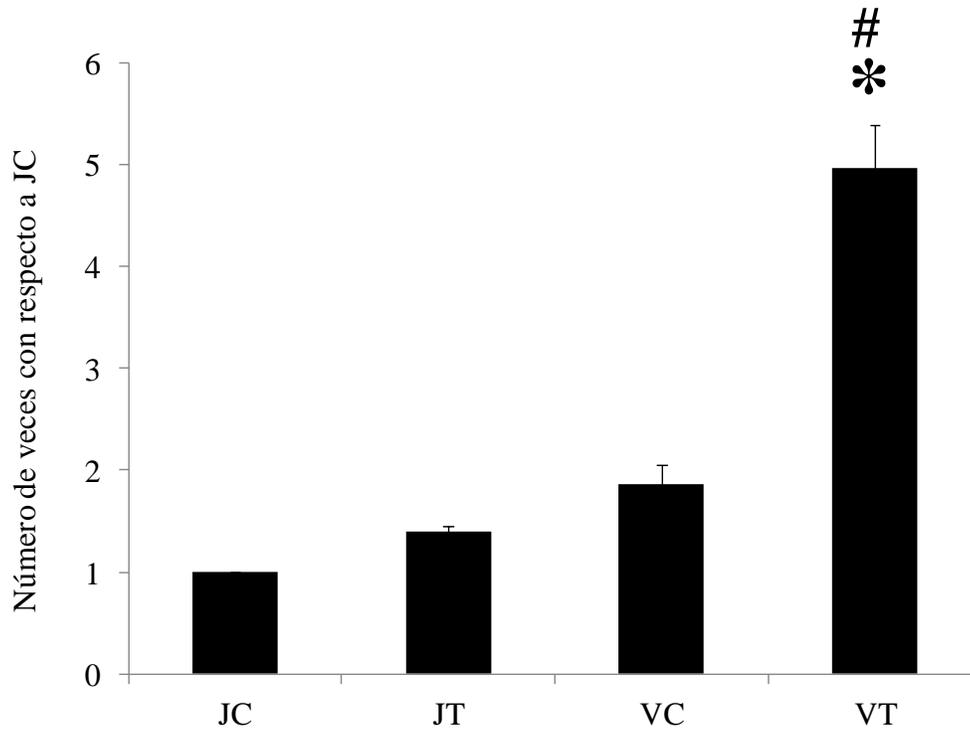
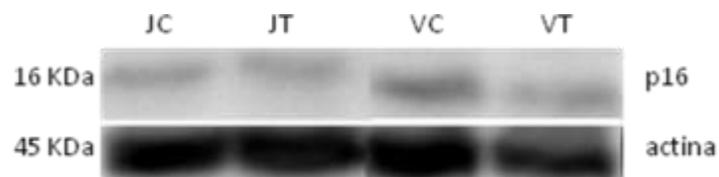


Figura 11. Expresión de la Ciclina D1.

En la figura se ilustra un Western blot representativo. Como control de carga se utilizó actina. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados) VC (viejas control) VT (viejas tratadas). Los datos empleados para la gráfica son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC. #  $p < 0.05$  vs VC.

### 12.1.5 PROTEÍNA p16

De manera muy sorprendente, se observó una disminución en la expresión de la proteína p16 en los animales jóvenes después del tratamiento con CCl<sub>4</sub>, (figura 12). Por otro lado, los ratones viejos presentaron un incremento en la expresión de p16, de 2.8 veces sin ningún tratamiento ( $p < 0.05$ ). Asimismo, en los animales viejos tratados no se observó diferencia alguna con respecto al control, pero sí con respecto a los niveles de expresión encontrados en los ratones viejos no tratados.



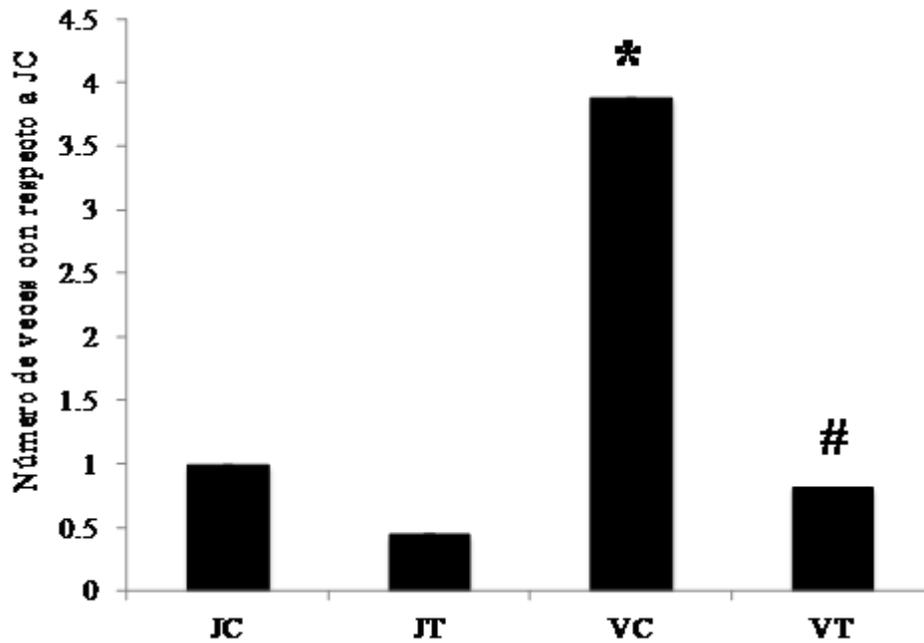


Figura 12. Expresión de p16.

En la figura se ilustra un Western blot representativo. Como control de carga se utilizó actina. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados) VC (viejas control) VT (viejas tratadas). Los datos empleados para la gráfica son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC. #  $p < 0.05$  vs VC.

### 12.1.6 CAMBIO EN LAS PROTEÍNAS DE HÍGADO DE RATONES JÓVENES DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON CCl<sub>4</sub>.

En la figura 13 se presentan los resultados de las figuras anteriores, pero agrupados de tal manera que permitan analizar de manera comparativa como fue la activación de las proteínas pc-Met, pAKT y la expresión de las proteínas AKT, ciclina D1, p27 y p16 en ratones jóvenes tratados con CCl<sub>4</sub> por 24 h.

Aún y cuando se sabe que el contenido de cada una de ellas puede variar, en este caso es posible compararlas porque todas están normalizadas contra lo que se encontró de proteína en cada caso en los animales jóvenes sin tratamiento, y que se le otorgó el valor de 1.0

Este análisis muestra una diferencia significativa en la activación de pc-Met y la expresión de la proteína p27 comparándolos con los ratones jóvenes control ( $p < 0.05$ ). No fue significativo el incremento en la activación de pAKT, y en la expresión de la proteína AKT total, así como la ciclina D1, pero si se observa una tendencia a incrementar (0.3, 1.2 y 0.4 veces respectivamente). Por otro lado el tratamiento con tetracloruro inhibió la expresión de la proteína p16 a la mitad con respecto al control.

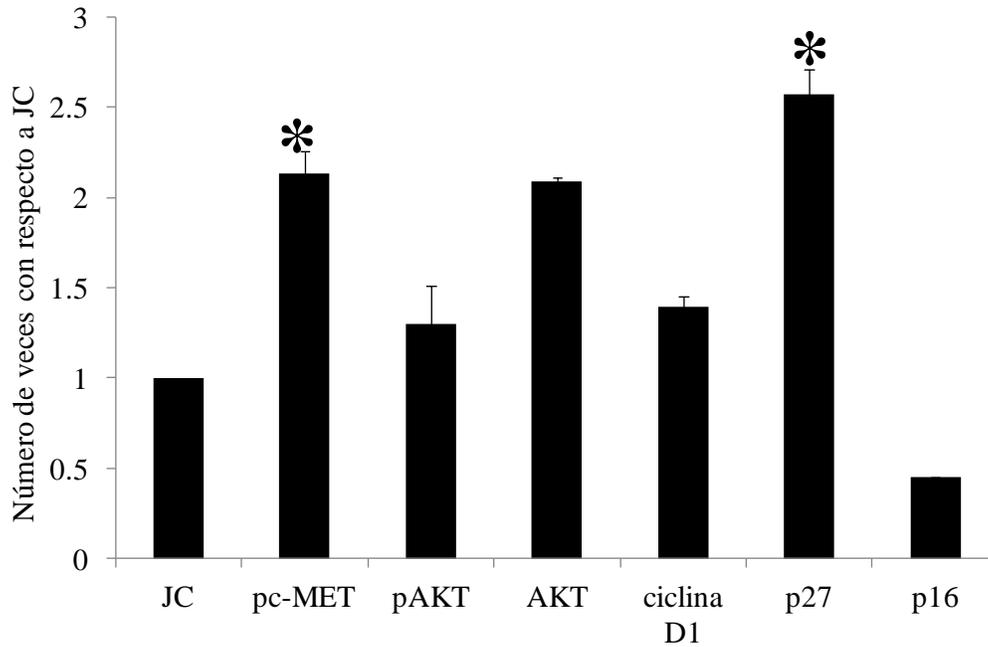
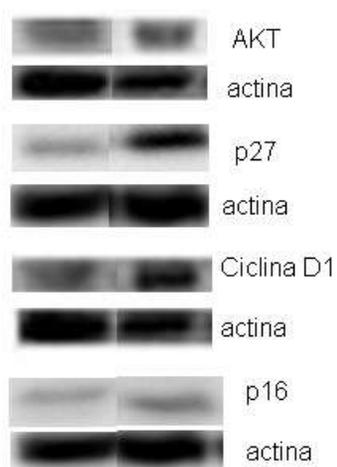


Figura 13. Activación y expresión de proteínas en ratones jóvenes tratados.

En la figura se observa la activación pc-Met, pAKT, y la expresión de las proteínas AKT, ciclina D1, p27 y p16. Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control) JT (jóvenes tratados). Los datos empleados para la gráfica fueron tomados de las gráficas anteriores y son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC

### 12.1.7 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS DE HÍGADO DE RATONES VIEJOS SIN TRATAMIENTO.

En la figura 14 se observan los resultados analizados como en la figura anterior. Es decir, se tomaron los valores obtenidos para la expresión de las proteínas AKT, ciclina D1, p27, p16, así como la activación de las proteínas pc-Met y pAKT de los ratones viejos sin tratamiento y se compararon contra el control joven. Como resultado de este análisis, se puede observar que no hay un cambio en la activación del receptor pc-Met, ni de la proteína pAKT comparándolos con los ratones jóvenes sin tratamiento. Sin embargo si se muestra una diferencia estadísticamente (\*  $p < 0.05$ ) en la expresión de las proteínas AKT total (2.7 veces), p27 (1.5 veces) y p16 (2.8 veces).



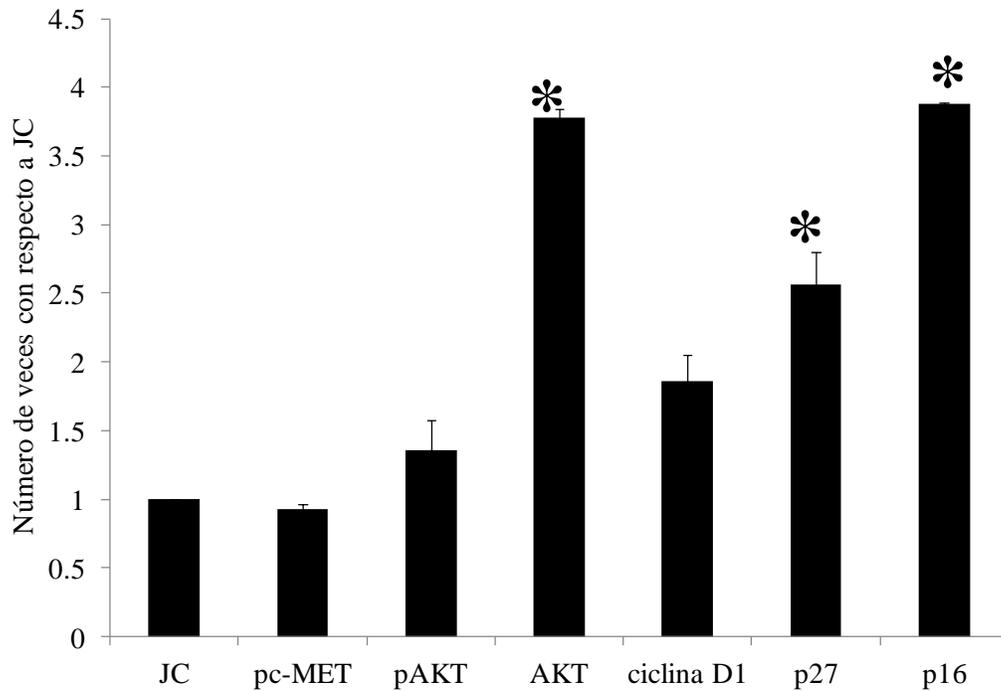


Figura 14. Activación y expresión de las proteínas en organismos viejos sin tratamiento.

Los datos empleados para la gráfica fueron obtenidos de las gráficas anteriores y son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de las proteínas pc-Met, pAKT, AKT, ciclina D1, p27 y p16; de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. JC (jóvenes control) vs proteínas de los ratones hembra viejas sin tratamiento \*  $p < 0.05$ .

#### 12.1.8 CAMBIO EN LAS PROTEÍNAS DE HÍGADO DE RATONES VIEJOS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON CCl<sub>4</sub>.

En la figura 15 se observan el análisis de los resultados obtenidos al tratar a los ratones viejos con CCl<sub>4</sub> por 24 h. El análisis muestra que no hay diferencia significativa con respecto a la activación de pc-Met y pAKT, así como en la expresión de las proteínas AKT total y p16, sin embargo, se puede observar que la expresión de las proteínas ciclina D1 y p 27 resultaron con una diferencia significativa de 4 y 2.8 veces comparándola con los ratones jóvenes sin tratamiento.

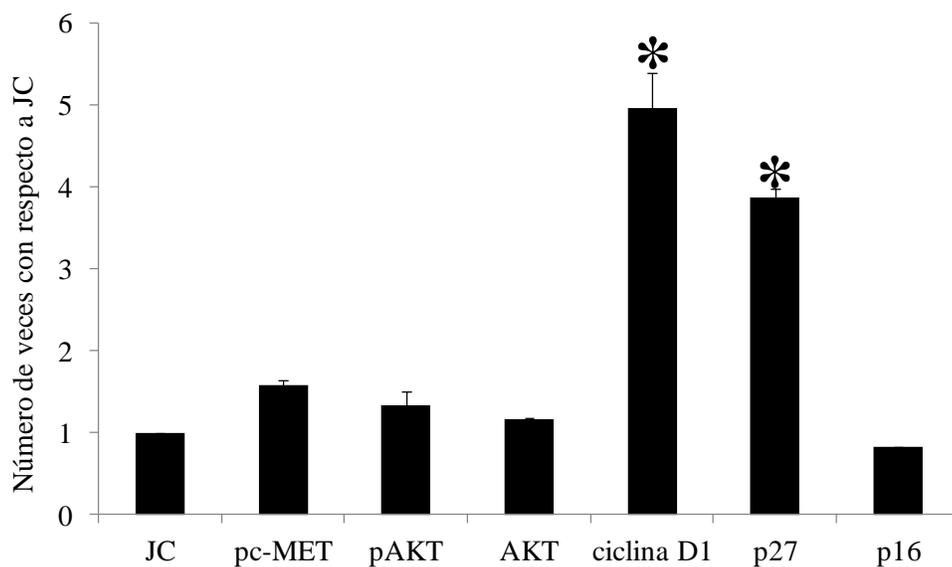


Figura 15. Activación y Expresión de las proteínas en ratones viejos tratados.

Los ratones fueron tratados con  $\text{CCl}_4$  durante 24 h. JC (jóvenes control). Las proteínas estudiadas fueron pc-Met, pAKT, AKT, ciclina D1, p27 y p16. Los datos empleados para la gráfica fueron obtenidos de las gráficas anteriores y son el promedio  $\pm$  el error estándar, de los resultados de la densitometría de cinco experimentos independientes y se encuentran normalizados contra el valor obtenido para los animales jóvenes control. \*  $p < 0.05$  vs JC

### 13.- DISCUSIÓN

Para cumplir con el segundo objetivo general de este proyecto, se utilizó un modelo de envejecimiento prematuro como consecuencia de la multiparidad (Konigsberg et al, 2007). Por lo que se emplearon ratones hembra vírgenes de 2 meses de edad, que representan a los jóvenes, y ratones hembra multíparas de 18 meses que representan a los organismos viejos.

Se usó tetracloruro de carbono para inducir un insulto oxidante, debido a que este es un tóxico que se utiliza ampliamente para dañar al hígado de manera aguda y crónica, simulando una fibrosis o cirrosis dependiendo de la dosis empleada (Lopez-Diazguerrero et al, 2005, Wang et al, 2011, Choi et al, 2011, Diosa et al, 2011). Se ha postulado que el daño generado en los hepatocitos, se da por la participación de varios intermediarios tóxicos durante la biotransformación del  $\text{CCl}_4$ . Dentro de los que se encuentran el radical libre triclorometilo ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ), así como los radicales triclorometilperoxilo ( $\text{OOCCL}_3^\bullet$ ), y el cloruro ( $\text{Cl}^\bullet$ ), además de otros compuestos como aldehidos producidos por la lipoperoxidación. El mecanismo anterior se lleva a cabo gracias a la acción del sistema microsomal P450 hepático, que cataliza las reacciones de conversión oxidante de la mayoría de las drogas y xenobióticos, con el fin de mantener la homeostasis celular (Hasler et al, 1999).

En este trabajo se enfocó en conocer la respuesta de un daño sub-agudo, no severo para los organismos, por lo que se decidió usar un tratamiento sub-agudo en una sola dosis, a una concentración 4 mg de  $\text{CCl}_4$ /gr de peso y se determinó la respuesta después de 24 h. Este tratamiento tuvo la ventaja de que nos permitió

observar si los animales viejos eran capaces de detectar y responder ante un estímulo tan sutil, pero al mismo tiempo tenía la desventaja de que las respuestas que se observaron, en algunos casos fueron muy pequeñas y no siempre significativas.

Se determinaron los niveles basales y los cambios en las moléculas que participan en la proliferación hepática asociados a la edad después de un daño sub-agudo, debido a que se sabe que los animales viejos presentan una reducción en la capacidad regenerativa y proliferativa después de una hepatectomía parcial (Timcheko et al, 1998), pero no se sabe cuál es la razón de que disminuya la capacidad proliferativa en organismos viejos, por lo que muy importante conocer algunas de las moléculas relacionadas con la proliferación de los hepatocitos.

La proliferación hepática involucra varias vías de señalización como la vía HGF/c-Met, que es una de las primeras vías que se activan después de un daño hepático. Existen estudios en donde al inhibir a c-Met en el hígado, se encontró una disminución del 10-30% de la proliferación aunado a una inhibición completa de la mitosis después de 24 h de la hepatectomía parcial. Por lo que, se ha sugerido que c-Met es esencial para completar la regeneración hepática. La expresión génica analizada en microarreglos en las ratas en las que se inhibió a c-Met indicó que presentan una desregulación de muchos genes implicados en la detención del ciclo celular, incluyendo p21 y p53; así mismo, la expresión de ciclina E1 se encontraba suprimida y la expresión de ciclina B incrementada significativamente. En cuanto a TGF-beta II, la expresión de su receptor fue 27 veces mayor en las ratas control (Paranjpe et al, 2007). En otro estudio en el cual

se utilizaron ratones knock-out  $Met^{(fl/fl)}$ , y Alb-Cre  $(+/-)$  para determinar los efectos de la disfunción c-Met en los hepatocitos, se valoraron los genes involucrados en la regulación de la respuesta al estrés (MAFK, IKK $\beta$ , SOCS3) y la respuesta de crecimiento (c-Myc, c-Jun, c-Fos, DUSP1 y 6) y no se encontró ningún cambio. Sin embargo, los autores de ese trabajo reportan una inducción temprana de MAPK / ERK y STAT3; en este trabajo también se encontró una inhibición en la progresión de la fase G1/S, lo que correlacionó con la pobre y lenta recuperación del hígado después de la hepatectomía parcial. Es decir, la conclusión de este estudio fue que se estableció una nueva función, no-redundante de HGF/c-Met, en la señalización de la regulación de la fase G2 /M del programa de expresión génica a través de mantener una activación constante ERK1/2 para la de la regeneración del hígado (Factor et al, 2010)

Así mismo, se ha reportado que la pérdida de c-Met afecta la respuesta de adaptación del hígado a las lesiones. Los hepatocitos de los ratones que carecen del gen *c-met* son sensibles a la apoptosis inducida por Fas. Después de un reto con una dosis única necrogénica de CCl<sub>4</sub>, los ratones knock-out mostraron alteración en la recuperación de las lesiones centrolobulares y un déficit en la proliferación de los hepatocitos (Huh C et al, 2004). Puesto que c-Met está relacionado con la reparación del tejido, es que en este trabajo se decidió evaluar las diferencias que se presentan en los organismos en función de la edad y en respuesta al tóxico. En concordancia con lo mencionado anteriormente, nuestros resultados confirman que en respuesta al tóxico, se incrementa de manera significativa la activación de esta proteína. Esto se observó en los ratones jóvenes,

sin embargo, en el caso de los ratones viejos que recibieron el tratamiento con  $\text{CCl}_4$ , solo se observó una ligera respuesta ante el daño sub-agudo (un incremento de 0.65 veces) que no fue significativo. En cuanto a los resultados que se obtuvieron en los niveles basales, los organismos viejos no mostraron una diferencia con respecto al control joven.

Estos datos sugieren que los organismos jóvenes que recibieron el tratamiento con tetracloruro si responden al daño sub-agudo, por lo que la activación de esta proteína se ve incrementada, no así en los animales viejos; que aparentemente no logran responder activando de manera correcta a la proteína. Sin embargo, es importante mencionar que la proteína c-Met no solo se ve involucrada en procesos de proliferación, si no que también es una proteína involucrada en supervivencia, morfogénesis, motilidad, angiogénesis, dispersión, citoesqueleto (Ma et al, 2003), es decir, es una proteína que puede estar participando en cualquiera de estas funciones y no únicamente en la proliferación. Lo cual hace pensar que los hígados de los animales viejos pudieran tener una deficiencia en la respuesta inicial que induce diferentes mecanismos de salvaguarda y supervivencia.

Otra proteína que se estudió en este trabajo, por su importante participación en la vía de señalización relacionada con la proliferación es AKT.

La cinasa AKT no mostró una diferencia significativa en cuanto a su activación basal en los organismos de las diferentes edades, y tampoco se encontró una diferencia significativa como respuesta al tratamiento con  $\text{CCl}_4$  en ninguno de los grupos de ratones. Una posible explicación pudiera ser la que la respuesta de

fosforilación de AKT sea un evento que se lleva a cabo de manera temprana, y que a las 24 h (cuando se realizaron las mediciones) dicha activación ya hubiera terminado. Un dato que resultó interesante, fue que al analizar la expresión total de la proteína AKT después de 24 h de tratamiento, se observó que los animales jóvenes tratados mostraron un incremento del 1 vez con respecto al control como respuesta al daño sub-agudo. En el caso de los organismos viejos, se encontró que la expresión de los niveles basales de AKT era significativamente mayor (2.7 veces respecto al control) sin embargo, la expresión de AKT no se modificó en los ratones viejos después del tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Esto es muy interesante, debido a que la proteína AKT está involucrada en muchos procesos, al igual que la proteína c-Met, como metabolismo, ciclo celular, supervivencia, síntesis de proteínas, entre otras (Engelman et al, 2006), por lo que pudiera ser que los niveles totales de AKT se incrementaran para una respuesta mas eficiente. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis, a futura, habría que analizar su activación a tiempos más cortos.

Por otro lado, se sabe que AKT regula al factor de transcripción FOXO3 mediante su fosforilación (Salih y Brunet, 2008). Se ha reportado que los miembros de la familia FOXO pueden ser reguladores transcripcionales de la expresión de la proteína p27 (Collado et al, 2000). Otros autores como Ching Ju-Li y colaboradores (2010) demostraron que la vía de señalización AKT/FOXO3/p27 está involucrada en la disminución de la proliferación en osteoblastos humanos, y se ha observado que el aumento de la expresión de FOXO3 da lugar a una mayor supervivencia celular atenuado la apoptosis inducida por el factor inducible por

hipoxia 1- alfa (HIF-1 $\alpha$ ). La regulación de los factores FOXO puede ser dada por diversos estímulos como daño al DNA, disponibilidad de la glucosa, niveles de citocinas e hipoxia, esto se ha observado en diferentes tipos celulares y en diferentes contextos ambientales. Por lo que, aunque el factor de transcripción FOXO es muy complejo debido a su promiscuidad (Salih y Brunet, 2008), sería interesante ver su participación en estudios posteriores.

Entre las proteínas moduladoras del ciclo celular que son reguladas por FOXO, se encuentra p27 que es un inhibidor del ciclo celular (Boriello et al, 2007) y la ciclina D1, que es una proteína encargada de la progresión del ciclo (Collado et al, 2000, Maufo et al, 2004); de manera que para cumplir los objetivos planteados en este proyecto, resultó importante conocer los niveles basales de estas proteínas en los organismos viejos, así como determinar si existe un cambio en su expresión en respuesta ante un daño oxidante sub-agudo.

La proteína p27 pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de CDKs y tiene un efecto negativo en los complejos ciclina E/CDK2 y ciclina A/CDK2, además de que puede también inhibir a los complejos ciclina D/CDK2, ciclina D/CDK 4 y CiclinaD/CDk6 (Abukhdeir A y Park B, 2008). Es por ello que en este trabajo también se estudiaron los cambios en la expresión de esta proteína. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de 1.5 veces en la expresión de p27, con respecto al control en los animales jóvenes tratados con CCl<sub>4</sub>. Este dato fue contradictorio a lo que se esperaba, ya que el aumento de p27 inhibe el ciclo celular y no permite la proliferación, por lo que se hubiera esperado que después del tratamiento, se disminuyeran los niveles de p27 para permitir a las células

proliferar y regenerar el tejido. Una posible explicación para el aumento en p27, sería un intento de frenar el ciclo celular para reevaluar el daño recibido y decidir si es conveniente que continúe proliferando o se induzca una detención para tratar de reparar el daño. Ello como parte de un mecanismo de supervivencia que pudieran presentar las células expuestas a un agente dañino a niveles sub-agudos y que en algunas ocasiones conlleva a la célula a entrar en senescencia replicativa; el aumento en p27 en este tipo de respuestas ya ha sido reportado (Vairo et al., 2002).

Con respecto a los resultados obtenidos en los ratones viejos sin tratamiento, de manera muy interesante se observó que la expresión basal de p27 estaba incrementada 1.5 veces con respecto a los ratones jóvenes. Sin embargo, después del tratamiento con CCl<sub>4</sub> se incrementó aún más el contenido de p27 en los animales viejos (2.8 veces con respecto al control,  $p < 0.05$ ). Cabe mencionar que a diferencia de lo que se encontró en este trabajo, Kruczack-Hollis y colaboradores reportaron (2003) que en ratones viejos se presenta una reducción en los niveles de la proteína p27.

Un resultado muy interesante fue el incremento en los niveles basales de p27 en los organismos viejos sin tratamiento, que podría interpretarse como un aumento en el número de células que no proliferan y que incluso pudieran estar senescentes dentro del hígado. Por otro lado, el echo de haber encontrado un gran aumento de p27 no necesariamente indica esta proteína se encuentre de manera funcional, ya que se sabe que p27 tiene muchos sitios de fosforilación que pueden inactivarla. Se ha reportado que cuando se encuentra fosforilada en la Thr 157, permanece retenida en el citoplasma y es inactiva, además de que dicha

fosforilación facilita su degradación (Lu et al, 2008). Así mismo, puede fosforilarse en la Ser 10, en la Thr 74 y en la Thr 88 y ello disminuye la expresión en el núcleo y se acumula en el citoplasma en donde no es funcional, y estas fosforilaciones favorecen la fosforilación en la Thr 157 antes mencionada (Ahukhdeir y Park, 2008). Considerando lo anterior, otra especulación podría ser que el aumento en los niveles de p27 se relacionara con una nueva teoría, que sugiere que los organismos y células viejas acumulan proteínas no funcionales como una pérdida en su homeostasis proteica (proteostásis), pero de esto se hablará más adelante.

Otra proteína que se analizó fue la Ciclina D1, y los resultados no mostraron diferencia significativa en su expresión, en los ratones jóvenes después de tratamiento. La ciclina D1 es una proteína encargada de regular la actividad de las CDK 4 y 6 para llevar a cabo la transición del ciclo celular de la fase G1 a la fase S, por lo que se esperaba que después de un insulto oxidante, las células de los animales jóvenes incrementaran su expresión para así iniciar la señalización de proliferación celular.

Aunque este dato es sorprendente y no concuerda con lo esperado, es importante mencionar que en los otros casos del resto de las proteínas estudiadas, siempre se encontró un aumento en su expresión en los animales jóvenes después del tratamiento con CCl<sub>4</sub>. Ello sugiere que, si bien el reto oxidante es sub-agudo, los animales jóvenes si fueron capaces de censarlo y generar una respuesta celular. Esta respuesta no siempre fue clara o exactamente como se esperaba (como en el caso de p27), pero si se generó una respuesta al tratamiento. Es por eso precisamente que el no haber encontrado cambios en una proteína tan importante

para la regulación del ciclo, como es la ciclina D1 causa extrañeza. Sin embargo, profundizando en la función de esta ciclina, se sabe que su actividad en la célula es transitoria (Fu, 2004), y de ahí su nombre de ciclina, puesto que su expresión es cíclica y al acabar su función debe degradarse: De manera que una posibilidad es que a las 24 horas después del tratamiento no se encontró aumento en la ciclina D1, debido a que después de cumplir su función ya hubiera sido degradada y no se encontrara presente en la célula.

En cuanto a los niveles basales en la expresión de la ciclina D1 en los organismos viejos, es claro que los presentan un ligero incremento de 0.8 veces con respecto al control, y en los ratones viejos tratados con CCl<sub>4</sub> el incremento es estadísticamente significativo ya que es de 4 veces en comparación a los ratones jóvenes. Como se mencionó antes, la ciclina es una proteína encargada de la progresión del ciclo celular y se esperaba que los organismos viejos tuvieran disminuida su expresión, además, en condiciones normales (no cancerosas) esta proteína debe degradarse al terminar su función, por lo que el hecho de que se encuentre presente podría sugerir que en los animales viejos existe una alteración en cuanto a la degradación de proteínas, lo cual es un evento que ya se ha reportado ampliamente (Dasuri et al., 2009; Rajawat et al., 2009) . Es importante recordar que así como la proteína p27 se encuentra aumentada en animales viejos, otras proteínas también se encontraron de manera aumentada en este grupo de animales, por lo que este se discutirá de manera conjunta más adelante.

Finalmente, la última proteína analizada fue otra proteína inhibidora del ciclo, la proteína p16 que regula la progresión del ciclo celular por la inhibición directa de las cinasas dependientes de ciclinas durante la fase G1 del ciclo celular (CDK4 y

CDK6). En este caso se encontró una disminución después del tratamiento en los animales jóvenes, lo cual era esperado ya que después de un insulto que daña las células, se inician señales de proliferación. Sin, embargo, en el caso de los resultados obtenidos en los ratones viejos sin tratamiento, de nuevo se encontró un incremento significativo de 2.8 y no se observó diferencia alguna en los animales viejos tratados, con respecto al control, pero si con respecto a los niveles basales en la expresión de los ratones viejos no tratados. Estos datos son muy interesantes ya que como puede observarse, la proteína p16 presenta una disminución en la expresión después del tratamiento con tetracloruro y este comportamiento se presenta tanto en organismos jóvenes como viejos. Esta pudiera explicarse como una respuesta que permitiría que las células no encontraran obstáculos como los inhibidores del ciclo celular y pudieran continuar con su proliferación.

Con respecto a los niveles basales en los organismos viejos sin tratamiento puede apreciarse que la expresión de p16 es estadísticamente diferente con respecto a los jóvenes control. Estos datos corroboran lo que ya se sabe que los niveles de expresión de la proteína p16 incrementan con la edad (Kim et al, 2006) Además que los niveles elevados de p16 también inducen la senescencia celular y envejecimiento en células progenitoras, en células pre-malignas (Collado et al, 2007).

En general, retomando los resultados, es posible decir que aunque el tratamiento con CCl<sub>4</sub>, fue muy poco severo, los animales jóvenes si fueron capaces de censarlo e inducir una respuesta que posiblemente se relaciones con supervivencia y proliferación (figura 13). Este no fue el caso en los animales

viejos, en los cuales encontramos resultados inesperados y sorprendentes. Por un lado no se encontró una respuesta consistente frente al estímulo tóxico, lo cual nos permite suponer que tanto las vías de señalización como los diferentes mecanismos de respuesta y transducción de señales se encuentran alterados en estos animales. Sin embargo, como la hipótesis establecida en este proyecto proponía que los organismos viejos tuvieran una mayor susceptibilidad al daño y una menor capacidad proliferativa después del mismo, hubiéramos esperado encontrar una disminución en los niveles basales de las moléculas que participan en la proliferación celular, en el hígado de los ratones viejos. Sin embargo los resultados no dejan de ser interesantes, ya que este modelo nos ofrece una visión experimental diferente del mismo fenómeno.

Por ello fue interesante realizar un análisis con respecto a la activación y expresión de las proteínas agrupadas según la edad de los animales, como se muestra en la figura 13. En los ratones jóvenes con tratamiento con  $\text{CCl}_4$ , se aprecia una respuesta ante el daño en todas las proteínas, a pesar de que no todas fueron significativas. En la figura es posible apreciar una tendencia a responder después del daño producido. Por otro lado, en la figura 15 se muestra que los organismos viejos con tratamiento no presentan un cambio en la activación de pc-Met, pAKT, con respecto al control, además se observa que la expresión de las proteínas ciclina D1 y p27 son diferentes estadísticamente con respecto a los ratones jóvenes sin tratamiento (Geng et al, 2001).

En cuanto a los resultados obtenidos en los organismos viejos sin tratamiento (figura 14), se presenta un incremento en la expresión de las proteínas AKT, p27,

ciclina D1, p16 y esto posiblemente pueda ser explicado proponiendo, como se mencionó antes, que el balance proteostático en los organismos viejos se encuentra comprometido en este modelo (Squier 2001, Kikis et al, 2010).

La proteostásis u homeostasis proteica en eucariontes, es un concepto reciente que se refiere al control de la concentración proteica dentro de las células, al buen plegamiento o estructura tridimensional y a las correctas interacciones entre las proteínas que componen el proteoma (Balch et al, 2008). Se ha propuesto que la proteostásis permite un desarrollo celular exitoso y protege a los organismos de las enfermedades, y el carecer de estos sistemas se ha relacionado con enfermedades lisosomales o enfermedades conformacionales, así como con el establecimiento del envejecimiento (Powers et al, 2009). Recientemente se ha encontrado una acumulación de proteínas oxidadas o dañadas durante el envejecimiento, así como en varias enfermedades neurodegenerativas asociadas a la vejez. Estos depósitos de componentes alterados causan un deterioro en las células y disminuyen su funcionalidad, por lo que se ha empezado a estudiar el papel que juega la acumulación de proteínas durante el envejecimiento (Reshma y Kelvin, 2002; Gidalevitz et al, 2010; Douglas y Dillin, 2010).

De modo que estas ideas nos permiten cuestionarnos a cerca de la capacidad de degradar proteínas en los organismos viejos, sobre la funcionalidad que puedan tener las proteínas que se encontraron aumentadas etc. Por lo que para entender lo que está sucediendo es necesario realizar más experimentos, que nos permitan comprender el fenómeno de envejecimiento.

#### 14.- COMENTARIOS GENERALES

Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, los seres vivos, entre ellos los humanos, estamos expuestos a una gran cantidad de tóxicos que nos provocan una agresión en el hígado y que dependiendo de la naturaleza del estímulo (sub-agudo, agudo o crónico), será la magnitud de la respuesta o del daño. En la primera parte de este trabajo se estudió la fibrosis, como una alternativa para intentar controlar este problema hepático. Por lo que una aproximación que parecía lógica, fue la de sobreexpresar a la proteína Bcl-2, ya que en reportes bibliográficos y en experiencias previas en el laboratorio se demostró que lograba inducir senescencia celular replicativa; por lo que se esperaba que las células estelares activadas en el hígado dejaran de proliferar y como consecuencia se evitara el exceso descontrolado de la producción de matriz extracelular y de fibrosis en el hígado. No obstante, la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en las células estelares, no indujo la senescencia celular replicativa y por lo tanto tampoco se disminuyó la proliferación celular, esto quiere decir que no se hubiera logrado disminuir la fibrosis hepática. Sin embargo, al causar un daño oxidante a las células que sobreexpresan a la proteína Bcl-2 se encontró una protección de 35 % y un fenotipo pro-inflamatorio (datos de la Dra. E. Hernández), de manera que no fue un resultado alentador que pudiera trasladarse a nivel clínico, ya que las células en lugar de detener su proliferación se hacían más resistentes.

En la segunda parte del trabajo se abordó otro problema que se presenta en los organismos viejos, la disminución de la capacidad regenerativa del hígado. Se

esperaba encontrar que los niveles de las proteínas relacionadas con la respuesta de proliferación se encontraran disminuidos y que no hubiera una respuesta después de un estímulo oxidante en los hígados de animales viejos. Sin embargo, los resultados fueron algo diferentes de lo esperado ya que algunas de las proteínas si mostraron una tendencia a aumentar después del tratamiento, mientras que otras no lo hacían sugiriendo que el tratamiento en estos organismos provoca una respuesta incoherente e inconsistente, lo que sugiere que posiblemente la señalización se encuentre alterada. Así mismo, se obtuvieron resultados interesantes en los animales viejos control que muestran un aumento en varias proteínas, llevándonos a pensar en un desequilibrio proteostático en estos animales. La acumulación de proteínas y la incongruencia en la respuesta nos lleva a pensar que el problema en la pérdida en la capacidad regenerativa del hígado de los animales viejos ni es la falta de proteínas relacionadas al ciclo celular, sino una acumulación de las mismas que induce una falla generalizada en la respuesta.

Este trabajo tiene un alto valor para la investigación científica en cuanto a que aprendimos que en la ciencia es importante estar abierto ya que no siempre es posible predecir u obtener los resultados que se espera encontrar. Hay veces que se tienen que romper algunos paradigmas o tratar de analizar las cosas desde otro punto de vista que no es el que se esperaba. En particular en el campo de estudio del envejecimiento, no está nada dicho y lo que si queda claro que este es un fenómeno que aún es difícil de entender. Los resultados de este proyecto han sido muy importantes ya que nos dan aportaciones que nos permiten cuestionarnos

aun más acerca de los fenómenos que ocurren en el cuerpo, en los tejidos y en las células.

## 15.- CONCLUSIONES

En este trabajo se sobreexpresó la proteína Bcl-2 en la línea de células estelares hepáticas CFSC-2G, y se demostró que Bcl-2 si protege contra el estrés oxidante, pero no fue capaz de modular el ciclo celular. Por lo que la sobreexpresión de Bcl-2 no es una alternativa viable para evitar la fibrosis en pacientes con un daño en hepático.

Por otro lado en este trabajo se obtuvieron datos muy interesantes con respecto a las moléculas que participan en la proliferación hepática. Se observó un incremento en la activación de la proteína pc-MET como respuesta al daño oxidante pero también con respecto a la edad, mientras que la proteína pAKT no sufrió ningún cambio significativo en los organismos viejos. Se encontró un incremento en la expresión basal de las proteínas AKT, p27, Ciclina D1 y p16 en los ratones viejos.

En resumen, se puede concluir que los organismos viejos presentan una mayor expresión de moléculas relacionadas con la proliferación hepática; tanto progresión como inhibición del ciclo celular, y solo se puede especular que esta sea la razón por la cual los organismos viejos tienden a disminuir la capacidad regenerativa, sin embargo los datos no son concluyentes para aseverar que esa sea la razón, por lo que es necesario llevar a cabo más experimentos para incrementar los conocimientos del fenómeno de envejecimiento.

## 16.-PERSPECTIVAS

Debido a que la segunda parte de este proyecto abrió muchas más interrogantes de las que se tenían al principio acerca de la regeneración y el envejecimiento celular, sería muy interesante realizar lo siguiente:

Evaluar los niveles de agregación y plegamiento en las proteínas de manera basal y como respuesta ante un daño agudo con  $\text{CCl}_4$  en ratones de diferentes edades.

Conocer el estado general de las proteínas (proteoma) en ratones de diferentes edades, mediante electroforesis 2D.

Realizar un análisis detallado de los genes que se relacionan con la regeneración y proliferación hepática en ratones de diferentes edades, mediante microarreglos.

Analizar los procesos de degradación de proteínas (proteosoma y autofagia) en ratones de diferentes edades.

Analizar la actividad de los inhibidores del ciclo celular en ratones de diferentes edades, de manera basal y como respuesta ante un daño agudo con  $\text{CCl}_4$  a tiempos más cortos.

## 17.-REFERENCIAS

- Abergel A, Sapin V, Chassard C, Darcha C, Marcand-Sauvant J, Gaillard-Martinie B, Rock E, Dechelotte P, Sauvant P. 2006. *Dig. Dis. Sci.* 51, 986-995.
- Abukhdeir A, Park BH. 2008. p21 and p27 : roles in carcinogenesis and drug resistance. *exp. Reviews in Mol. Med.* 10, e19, 1-16.
- Adams JM, Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Aikata H, Takaisshi H, Kawakami Y, Takahashi S Kitamoto M, Nakanishi T. 2000. Telomere reduction in human liver tissues with age and chonic inflammation. *Exp.Cell. Res.*256, 578-582.
- Arriazu E, Pérez de Obanos MP, López-Zabalza MJ, Herraiz MT, Iraburu MJ. 2010. Amino acid deprivation decreases intracellular levels of reactive oxygen species in hepatic stellate cells. *Cell Physiol Biochem.* 26, 281-290.
- Arteel G. 2003. Oxidants and Antioxidants in Alcohol-Induced Liver Disease. *Gastroenterology.* 124, 778-790.
- Bakhshi A, Jensen J, Goldman P, Wright J, McBride O, Epstein A, Korsmeyer S. 1985. Cloning the chromosomal breakpoint of t (14:18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* 41, 899-906.
- Bennett R, Kharbanda KK, Tuma D. 2003. Inhibition of markers of hepatic stellate cell activation by the hormone relaxin. *J.Biochim. Phal.* 66, 867-874.
- Borkham-Kamphorst E, Van Roeyen CR, Ostendorf T. 2007. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J. Hepatol.* 46, 1064-1074.
- Bladier C, Wolvetang EL, Hutchinson P, Haan LB, Kola I. 1997. Response of a primary human fibroblast cell line to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: senescence-Like growth arrest or apoptosis?. *Cell Gowth Differ.* 8, 589-598.
- Blom W, Fawcett DW. 1975.Liver and gall blandeder. In A textbook of histology. W Bloom and D W Fawcett, eds. pp 688-718. Saunders, Philadelphia.
- Bonneyfoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marcais A, Marvel J. 2004. Control of proliferation by Bcl-2 family members. *Biochim. Biophys. Acta.*1644, 159-168.
- Bradford M.1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.

- Bree RT, Stenson-Cox C, Grealy M, Byrnes L, Gorman AM, Samali A. 2002. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence. *Biogerontol.* 3, 195-206.
- Brown KE, Mathahs MM, Broadhurst KA, Coleman CM, Ridnour LA, Schmidt W N, Spitz DR. 2007. Increased hepatic telomerase activity in a rat model of iron overload: A role for altered thiol redox state?. *Free Radical Biology y Med* 42,228-235.
- Brow M D and Sacks D B.2008. Compartmentalised MAPK Pathways. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 186, 205-235.
- Burt AD, Day CP. 2002. Pathophysiology of the liver. In *Pathology of the liver.* R N M MacSeew, A D Burt, B C Portmann K G Ishak, P J Sheuuer and P P Anthony, eds. pp 67-105. Churchill Livingstone, New York.
- Calado RT, Young NS. 2009. Telomere diseases. *N Engl J Med.* Dec 361, 2353-2365.
- Campisi J. 2001. Cellular senescence as a tumor- suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*11, 27-31.
- Campisi J.2000. Cancer, ageing and cellular senescence. *In vivo.*14, 183-188.
- Cárdenas-Aguayo MC, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L. 2003. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl-2 in cells derived from neural precursor cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 12, 735-748.
- Cheluvappa R, Hilmer S N, Kwun S Y, Cogger V C, Le Counter. 2007.A Effects of old age on hepatocyte oxygenation. *Acad. Sci.* 1114, 88-92.
- Ching-Ju Li, Je-Ken Chang, Chia-Hsuan Chou, Gwo-Jaw Wang, Mei-Ling Ho. 2010. The PI3K/Akt/FOXO3a/p27Kip1 signaling contributes to anti-inflammatory drug-suppressed proliferation of human osteoblasts. *Biochemical Pharmacology.*79, 926–937
- Cheluvappa R, Hilmer SN, Kwun SY, Jamieson HA, O'Reilly JN, Muller M, Cogger VC, Le Counter DG. 2007. The effects of old age on liver oxygenation and yhe hepatic expression of VEGF and VEGFR2. *Exp. Gerontol.* 42, 1012-1019.
- Chen QM, Liu J, Merrett JB.2000 .Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell cycle position, p53, p21 and bax in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of normal human fibroblasts. *Biochem. J.*347, 543-551.
- Choi J-H, Kim D-H, Yun N, Choi J-S, Islam N, Kim Y-S Lee S-M. 2011. Protective Effects of Hyperoside against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Mice. *J. Nat. Prod.* 74, 1055-1060.

- Crescenzi E, Palumbo G, Brandy HJ. 2003. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem. J.* 375, 263-274.
- Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, Dubuisson ML, Barradas M, Glassford J. 2000. Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. *J. Biol. Chem.* 275, 21960–21968.
- Collado M, Blasco MA, Serrano. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* 130, 223-233.
- Dasuri K, Zhang L, Ebenezer P, Liu Y, Fernandez-Kim SO, Keller JN. 2009. Aging and dietary restriction alter proteasome biogenesis and composition in the brain and liver. *Mech. Ageing Dev.* 130, 777-783.
- Diao Y, Zhao X-F, Lin J-S, Wang Q-Z, Rui-An Xu. 2011. Protection of the liver against CCl<sub>4</sub>-induced injury by intramuscular electrotransfer of a kallistatin-encoding plasmid. *World J. Gastroenterol.* 17, 111–117.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 92, 9363-9367.
- Dimri GP, Testori A, Acosta M, Campisi J. 1996. Replicative senescence, ageing and growth-regulatory transcription factors. *Biol. Signals.* 5, 154-162.
- Dimri GP, Hara E, Campisi J. 1994. Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 16180-16186.
- Dooley S, Streckert M, Delvoux B, Gressner AM. 2001. Expression of Smads during in vitro transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 283, 554-562.
- Dulic V, Beney GE, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH. 2000. Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 20, 6741-6754.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. 2006. Liver regeneration. *Hepatology.* 43, 2 S45-S53.
- Finlay LA, Michels AJ, Butler JA, Smith EJ, Monette JS, Moreau RF, Shay KP, Frei B, Hagen TM. 2011. R- $\alpha$ -lipoic acid does not reverse hepatic inflammation of aging, but lowers lipid anabolism while accentuating circadian rhythm transcript profiles. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* [Epub ahead of print]
- Friedman SL. 1996. Hepatic stellate cells. *Progress Liver Dis.* 14, 101-130.
- Friedman SL. 2004. Stellate cells: A moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology.* 40, 1041-1043.

- Friedman SL. 2008. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 143, 6, 1655-1669.
- Fridman A, Tainsky M. 2008. Review. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* 27, 46, 5975-5987.
- Fujiyoshi M. Osaki M. 2011. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases. *J Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 18, 13-22.
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Bronson RT, Sicinski P. 2001. Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 98, 194-199.
- Gidalevitz T, Kikis EA, Morimoto RI. 2010. A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 20, 23-32.
- Gonzlaez-Chamarro A, Loinnaz SC, Moreno GE, Jimenez RC, Gonzalez-Pinto A, Gonzalez SR. 1998. Graft mass and volumen calculation in living related donors for liver transplantation. *Hepato-Gastroenerol* .45, 510-513.
- Gressner AM. 1995. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J. Hepatol.* 22, 228-236.
- Gressner AM. 1996. Transdiferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblast: A key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney International*. 49, 39-45.
- Halliwell B. Gutteridge M. 1994. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14.
- Harman D. 1998. Aging: Phenomena and theories. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854, 1-7.
- Hasler J. Estabrook R. Murray M. Pikuleva I. Waterman N. Capdevila J. Holla V. Helvig C. Falck R. Farrell G. Kaminsky L. Spivac S. Boitier E. Beaune P. 1999. Human cytochromes P450. *Mol. Aspects, Med.* 20, 1-137.
- Hayflick L, Morread PS. 1961. The serial cultivation of human diluid stains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- Haynes R O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 326, 1216-1219.
- Hansberg W. 2008. El dioxígeno y sus especies reactivas. En radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones Médicas*. Ed. M. Konigsberg. *El Manual Moderno*. 24-43.

- Hernández E. 2004. Activación de las células estelares y su importancia en la fibrosis hepática. *Rev. Ciencias Clínicas*. 5, 39-47.
- Hernandez-Gea V, Friedman SL. 2011 Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mench. Dis*. 6,425-456.
- Hockenbery DM, Oltavi Z, Yin X, Milliman C, Korsmeyer S. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 75, 241-251.
- Ho KK, Mytt SS, Lam EF. 2008. Many forks in the path: cycling with FOXO. *Oncogene*. 27, 2300-2311.
- Huang D, O'Reilly L, Strasser A, Cory S. 1997. The antiapoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. *EMBO J*. 16, 4628-4638.
- Huh C, Factor V, Sánchez A, Uchida K, Conner E. 2004. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *PNAS*. 101, 13, 4477- 4482.
- Ito Y, Sorensen KK, Bethea NW, Svistounov D, McCuskey MK, Smedsrod BH, McCuskey RS. 2007. Age-related changes in the hepatic microcirculation in mice. *Exp. Gerontol*. 42, 789-797.
- Jiang B, Liang P, Deng G, Tu Z, Liu M, Xiao X. 2011. Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Stress Chaperones*. 16, 143-152.
- Kikis EA, Gidalevitz T, Morimoto RI. 2010. Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Adv. Exp. Med Biol*. 694, 138-159.
- Kim WY, Sharpless NE. 2006. The regulation of INK/ARF in cancer and aging. *Cell*. 127, 265-275.
- Kmiec Z. 2001. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*. 161, III-XIII, 1-115.
- Kowaltowski AJ, Fiskum G. 2005. Redox mechanisms of cytoprotection by Bcl-2. *Antioxid. Redox Signal*. 7, 508-514.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med*. 47, 333-343.
- Krasilnicov MA. 2000. Phosphatidylinositol-3 Kinase Dependent Pathways: the Role in Control of Cell Growth, Survival, and Malignant. *Biochemistry (Moscow)*. 65, 59-67.

- Krishnan V, Liu B, Zhou Z. 2011. Relax and Repair' to restrain aging. *Aging (Albany NY)* 3, 943- 954.
- Kruczack-Hollis, Wang X, Dennwitz MB, Costa RH, 2003. Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through fork head box m1b. *Hepatology*.38, 1552-1562
- LaBrecque D.1994. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am. J. Gastroenterol.* 89, S86-S96.
- Lamberth JL. 2004. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Inmunology*.4, 181-189.
- Lee M, Yu S, Park JS. 2000. Characterization of a nuclear factor that binds to AP1-like element in the rat p53 promoter during liver regeneration. *J. Cell Biochem.* 80, 124-132.
- LeCounter DG, Cogger VC, Maekus A M. 2001 .Pseudocapillarization and associated energy limitation in the aged rat liver. *Hepatology.* 33, 537-543.
- López-Diazguerrero NE, Luna López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Konigsberg M. 2005. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in Young and aging mice. *Life Sciences.* 77, 2840-2854.
- López-Diazguerrero NE, Martínez Garduño CM, Konigsberg M. 2005. La Senescencia Replicativa como una respuesta Celular al Estrés. *Revista de Educación Bioquímica.* 24, 47-53.
- López-Diazguerrero NE, López-Araiza H, Conde-Pérezprina JC, Busio L, Cárdenas-Aguayo MC, Ventura JL, Covarrubias L, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Konigsberg M. 2006. Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Rad. Biol. Med.* 40, 1161-1169.
- Lu M, Fei M, Cheng C, Wang Y, He S, Zhao Y, Gao S Ke O, Li P, Cui X, Shen A. 2008. Mutant p27 (Kip) and its potential effects as hepatocellular gene therapy. *Arch. Med. Res.* 39, 8573-8581.
- Luna-López A, Triana-Martínez F, López-Diazguerrero NE, Ventura-Gallegos JL, Gutiérrez-Ruiz MC, Damián-Matsumura P, Zentella A, Gómez-Quiroz LE, Königsberg M. 2010. Bcl-2 sustains oxidative conditioning hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1192-1204.
- McLean AJ, LeCounter DG. 2004. Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 56, 163–184.
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot R. 2005. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathology* 33, 27-34.

- Ma P, Maulik G, Chistensen J, Salgia R. 2003. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metast. Rev.* 22, 309-325.
- Maofu F, Chenguang W, Zhiping L, Toshiyuki S, Pestell R. 2003. Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology.* 145, 12, 5439–5447.
- Mathon NF, Lloyd AC. 2001. Cell senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 1, 203-213.
- McDonnell T, Deane N, Platt F, Nunez G., Jeager U, McKearn J, Korsmeyer S. 1989. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell.* 57, 79-88.
- Muller M. 2009. Cellular Senescence: Molecular Mechanisms, In Vivo, Significance, and Redox Considerations. *Antiox Redox Signaling.* 11, 60-83.
- Nakajima T, Nakashima T, Yamaoka J, Shibuya A, Konishi E, Okada Y, Jo M, Nishikawa T, Itoh Y, Yoshikawa T. 2011. Greater age and hepatocellular aging are independent risk factors for hepatocellular carcinoma arising from non-B non-C non-alcoholic chronic liver disease. *Pathol. Int.* 61, 572-576.
- Orellana BM, Guajardo TV. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Rev. Med. Chile.* 132, 85-94.
- Paranjpe S, Bowen W, Bell AW, Bowen KN, Luo J, Michalopoulos GH. 2007. Cell cycle effects resulting from inhibition of hepatocyte growth factor and its receptor c-Met in regenerating rat livers by RNA interference. *Hepatology.* 45, 1471-1477.
- Partida BV. 2006. Proyecciones de la población en México 2005-2050. *CONAPO.* 1-29.
- Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cione M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, Pelicci PG. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenes. *Rev. Nature.* 406, 207-210.
- Pendyala S, Natarajan V. 2010. Redox regulation of Nox proteins. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174, 265-271.
- Pérez-Campo R, López-Torres M, Cadenas S, Rojas C, Barja G. 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B.* 168, 149-158.
- Rajawat YS, Hilioti Z, Bossis I. 2009. Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Age Res. Rev.* 8, 199–213.
- Reshma S, Kelvin JAD. 2002. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1084-1089.

- Rojkind M, Dominguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. 2002. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *CMLS, Cel. Mol. Life Sci.* 59, 1-20.
- Sasaki M, Ikekda H, Hironori H, Manabe T, Nakanuma Y. 2005. Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. *J. Pathol.* 205, 451-459.
- Salih D, Brunet A. 2008. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr. Opin. Cell Biology.* 20, 126-136.
- Schaefer B, Rivas-Estilla AM, Meraz-Cruz N, Reyes-Romero MA, Hernández-Nazara ZH, Domínguez-Rosales JA, Schuppan D, Greenwel P, Rojkind M. 2003. Reciprocal Modulation of Matrix Metalloproteinase-13 and Type I Collagen Genes in Rat Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol.* 162, 1771-1780.
- Schindler C, Plumleec C. 2008. Interferons pen the JAK–STAT pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 19, 311–318
- Schnabl B, Purbeck C, Hwang Choi Y, Hagedorn C, Brenner D. 2003. Replicative Senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology.* 37, 653-664.
- Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS Secretaria de Salud Publica. y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.
- Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. 2007. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transplantation.* 13, 382-390.
- Senoo H. 2004. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.* 37, 3-15.
- Serviddio G, Bellanti F, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E. 2010. Targeting mitochondria: a new promising approach for the treatment of liver diseases. *Curr. Med. Chem.* 17, 2325-2337.
- Squier TC. 2001. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Molecule Aging.* 36, 1539-1550.
- Sudo K, Yamada Y, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. 2005. Lack of tumor necrosis factor receptor type 1 inhibits liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Cytokine.* 29, 236-244.
- Sue YM, Chung CP, Lin H, Chou Y, Jen CY, Li HF. 2009. PPARdelta-mediated p21/p27 induction via increased CREB-binding protein nuclear

translocation in beraprost induced antiproliferation of murine aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* .297, 321–329.

- Tang XQ, Feng JQ, Chen J, Chen PX, Zhi JL, Cui Y, Guo RX, Yu HM. 2005. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PC12 cells: Mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res*. 1057, 57-64.
- Turnes JF, Alexandre A, Lehninger AL. 1995. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys*. 237, 408-414.
- Urtasun R, Conde de la Rosa L, Nieto N. 2008. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin. Liver Dis*. 12, 769-790.
- Vairo G, Soos TJ, Upton TM, Zalvide J, DeCaprio JA, Ewen ME, Koff A, Adams J M. 2002. Bcl-2 retards cell cycle entry through p27 (Kip1), pRB relative p130, and altered E2F regulation. *Mol, Cell Biol*. 20, 4745-4753.
- Von Zglinicki T. 2000. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann NY Acad, Sci, USA*. 908, 99-110.
- Wang H, Lafdil F, Wang L, Yin S, Feng D, Gao B. 2011. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice: involvement of hepatocyte STAT3 in TIMP-1 production. *Cell Biosci*. 4, 1, 1-14.
- Wei Q, Miskimins WK, Miskimins R. 2003. The Sp1 family of transcription factors is involved in p27 (Kip1)-mediated activation of myelin basic protein gene expression. *Mol Cell Biol*. 23, 4035–45.
- Winter JN, Andersen J, Reed JC, Krajewski S, Variakojis D, Bauer KD, Fisher RI, Gordon LI, Oken M, Jiang S, Jeffries D, Damer P. 1998. Bcl-2 expression correlates with lower proliferative activity in the intermede- and high-grade non-Hodgkin's lymphomas: an Eastern Cooperative Oncology Group and Southwest Oncology Group cooperative laboratory study. *Blood*. 91, 1391-1398.
- Youle RJ, Strasser A. 2008. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Rev*. 9, 47-59.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00031

Matrícula: 205182590

ESTUDIO DE LA RESPUESTA HEPÁTICA ANTE UN DABO CAUSADO POR ESTRÉS OXIDANTE EN CELULAS ESTELARES Y EN HIGADO DE RATONES DE DIFERENTES EDADES

En México, D.F., se presentaron a las 10:30 horas del día 14 del mes de diciembre del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES  
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ  
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ



*Viridiana*  
VIRIDIANA YAEMIN GONZALEZ PUERTOS

ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: VIRIDIANA YAEMIN GONZALEZ PUERTOS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobado*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

*Julio Cesar de Lana Isassi*  
LIC. JULIO CESAR DE LANA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

*Ruben Roman Ramos*  
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTA

*Maria Concepcion Gutierrez Ruiz*  
DRA. MARIA CONCEPCION GUTIERREZ RUIZ

VOCAL

*Jose Luis Gomez Olivares*  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

*Armando Luna Lopez*  
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

SECRETARIO

*Luis Enrique Gomez Quiroz*  
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada " ESTUDIO DE LA RESPUESTA HEPÁTICA ANTE UN DAÑO CAUSADO POR ESTRÉS OXIDANTE EN CÉLULAS ESTELARES Y EN HÍGADO DE RATONES DE DIFERENTES EDADES"



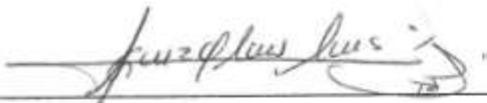
Dra. . María Concepción Gutiérrez-Ruiz

PRESIDENTE



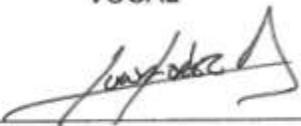
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

SECRETARIO



Dr. José Luis Gómez Olivares

VOCAL



Dr. Armando Luna López

VOCAL