

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“Efecto de los miRNAs 143-5p y 149-3p en la expresión del  
factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 en regeneración  
hepática murina”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

**NANCY VANESSA IGLESIAS VÁZQUEZ**

DIRECTORA

**DRA. ROSA MARTHA EUGENIA YOCUPICIO MONROY**

POSGRADO  
EN CIENCIAS  
GENÓMICAS

Ciudad de México, septiembre de 2019.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS ©

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

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

# **COMITÉ TUTORAL**

## **DIRECTORA DE TESIS**

Dra. Martha Yocupicio Monroy

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

## **LECTORES**

Dra. Lilia López Cánovas

Profesor Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas

Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Juan A. Suárez Cuenca

División de Investigación Biomédica

Centro Médico Nacional, 20 de noviembre ISSSTE

Dra. Sofía Lizeth Alcaráz Estrada

Jefa de División de Medicina Genómica

Centro Médico Nacional, 20 de noviembre ISSSTE

# AGRADECIMIENTOS

A través de estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas han colaborado en la elaboración de este trabajo de investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el compromiso adquirido en mi calidad de estudiante de esta casa de estudios y por el apoyo económico otorgado mediante la beca de impresión y empastado de tesis.

De manera especial a la Dra. Martha Yocupicio Monroy por aceptarme en su laboratorio para realizar esta tesis bajo su dirección. Le agradezco infinitamente su apoyo y confianza, no solo en el desarrollo de tesis, sino también de manera personal.

A la Dra. Sofía y la Dra. Lilia por tomarse el tiempo de leer la tesis.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Suárez por su apoyo e interés en este proyecto de investigación.

También quiero agradecer a su equipo de trabajo que siempre estuvieron atentos, gracias a Ariel, Adri, Gaby, y Alex.

A los Profesores del PCG por su apoyo y consejos a lo largo de mi estancia.

Gracias a mis amigos de generación Selene, Carlitos, Fany y Martitha  
De manera especial a Karina por brindarme su apoyo y amistad durante estos años.

A mis amigos de laboratorio Gabo , Dani, Hiráis, Sofia y Adrián, siempre sacando sonrisas, y haciendo más ameno el trabajo en el laboratorio.

# DEDICATORIA

## **A mis padres**

*Por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.*

*Gracias mamá por tu comprensión, amor y paciencia , por ayudarme a nunca rendirme y ser mejor persona. TE AMO INFINITAMENTE*

*Siempre motivándome a seguir adelante, gracias por tu amor incondicional, regaños, gracias por confiar en mí. TE AMO PAPÁ.*

*A mis hermanas Sherlyn y Samantha, gracias por soportar mi mal genio, y por ayudarme a levantarme cada vez que llegué a caer.*

*Tu ayuda ha sido fundamental, has estado conmigo en los momentos más complicados. Ambos sabemos que este proyecto no fue fácil , pero siempre estuviste motivándome y ayudándome. Te amo Alex y a nuestro pequeño bebé que esta por nacer.*

**¡GRACIAS FAMILIA!**

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN .....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 El hígado.....	12
1.1.2 Histología hepática.....	15
1.1.3 Anatomía celular del hígado.....	15
1.2 Enfermedades hepáticas .....	17
1.3 Regeneración hepática .....	19
1.4 Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1.....	22
1.5 Los microRNAs .....	24
1.5.1 Biogénesis de los miRNAs .....	25
II. ANTECEDENTES PARTICULARES .....	27
2.1 miRNAs en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas. ....	27
2.2 miRNAs en la regeneración hepática.....	28
2.3 Antecedentes del miR-143-5p.....	30
2.4 Antecedentes del miR-149-3p.....	33
III. JUSTIFICACIÓN .....	37
IV. HIPÓTESIS .....	38
V. OBJETIVOS .....	39
5.1 Objetivo general.....	39
5.2 Objetivos particulares.....	39
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
7.1 Animales .....	41
7.2 Pacientes .....	41
7.3 Ensayos de Inmunohistoquímica .....	42
7.4 Extracción de RNA total .....	43
7.4.1 Extracción de RNA a partir sueros de pacientes NAFLD.....	44
7.5 Aislamiento de hepatocitos de ratón .....	44
7.6 Transfección de mimetizadores e inhibidores del mmu-mir-149-3p para cultivo primario de hepatocitos.....	45

7.7 Cuantificación del miR-143-5p y miR149-3p por RT-PCR en tiempo real.....	45
7.8.1 RT- PCR en punto final (Cultivo primario de hepatocitos).....	46
7.8.2 Cuantificación de miR-149-3p por RT-PCR en tiempo real con iniciadores horquilla (Cultivo primario de hepatocitos y suero de pacientes con NAFLD).....	47
7.9 Análisis estadístico.....	48
VIII. RESULTADOS.....	49
8.1 Inhibición de miRNAs 143-5p y 149-3p en hígado de ratones sanos y ratones Hp. ....	52
8.2 Evaluación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp. ....	54
8.3 Evaluación de la expresión del marcador de progresión del ciclo celular, Ki 67, en hígado de ratones sanos y ratones Hp .....	57
8.4 Evaluación de la expresión del factor de crecimiento de hepatocitos en hígado de ratones sanos y ratones Hp. ....	60
8.5 Evaluación de la expresión de colágeno tipo 1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp .....	63
8.6 Evaluación de la expresión de GSK-3 $\alpha$ en hígado de ratones sanos y ratones Hp. ....	66
.....	68
8.7 Observación de estructuras propias de la regeneración hepática en ratones Hp	69
8.8 Análisis de la expresión de moléculas implicadas en la regeneración hepática en cultivos primarios de hepatocitos de ratón tratados con inhibidores y mimetizadores del miR-149-3p.....	70
8.9 Determinación del nivel de expresión del RNAm de $\text{tgf-}\beta$ 1, $\text{gsk-3}\alpha$ y $\text{col1a1}$ en cultivos primarios de hepatocitos de ratón tratados con mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p.....	72
8.10 Determinación del nivel de expresión del miR-149-3p en sueros de pacientes con hígado graso no alcohólico. ....	74
IX. DISCUSIÓN.....	76
X. CONCLUSIONES .....	81
XI. REFERENCIAS .....	82
XII. APÉNDICE .....	89
12.1 Preparación de soluciones .....	89
12.2 Datos de los pacientes con NAFLD. ....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del hígado.....	13
Figura 2. Anatomía segmentaria del hígado..	14
Figura 3. Representación Esquemática de la Triada Portal en el Hígado.....	15
Figura 4. Progresión en la enfermedad del hígado graso no alcohólico..	18
Figura 5. Cinética temporal de la tesis de síntesis de ADN en diferentes tipos de células hepáticas durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial en rata..	21
Figura 6. Vías de señalización de TGF- $\beta$ ..	23
Figura 7. Biogénesis y función de los miRNAs..	26
Figura 8. Expresión de miRNAs durante el ciclo celular de los hepatocitos.....	30
Figura 9. Reducción de la expresión de miR-143-5p en tejidos de GBC se correlaciona con un mal pronóstico.....	31
Figura 10. Representación de la vía canónica y no canónica de TGF- $\beta$ .....	32
Figura 11. Expresión relativa del miR-149-3p en células Huh-7 estimuladas con TGF- $\beta$ 1.....	33
Figura 12. Papel del miR-149-3p en proliferación y apoptosis.....	34
Figura 13. Tejido adiposo blanco subcutáneo vincula el balance de energía a través de la regulación de Prdm16 mediada por miR-149-3p.....	35
Figura 14. Imágenes del modelo murino con hepatectomía parcial.....	50
Figura 15. Esquema del tratamiento en el modelo murino.....	51
Figura 16. Inhibición del miR-143-5p en ratones sanos y en ratones Hp.....	52
Figura 17. Inhibición del miR-149-3p en ratones sanos y en ratones Hp.....	53

Figura 18. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.....	56
Figura 19. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de Ki 67 en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.....	59
Figura 20. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de HGF $\alpha$ en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.....	62
Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de COL1A1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.....	65
Figura 22. Análisis in inmunohistoquímico de la expresión de GSK-3 $\alpha$ en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.....	68
Figura 23. Análisis de la redistribución sinusoidal en hígado de ratones Hp tratados con inhibidores de miRNA.....	69
Figura 24. Cultivo primario de hepatocitos de ratón.....	70
Figura 25. Expresión relativa del miR-149-3p en cultivos primarios de hepatocitos de ratón transfectados con inhibidores e inhibidores del miRNA.....	71
Figura 26. Expresión de RNAm de tgf- $\beta$ 1, col1a1 y gsk-3 $\alpha$ en cultivos primarios de hepatocitos ratón transfectados con inhibidores y mimetizadores del miR-149-3p....	73
Figura 27. Expresión relativa del miR-149-3p en sueros de pacientes con diferentes grados de NALFD .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistema de puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre NAFDL .....	18
Tabla 2. Expresión de diferentes miRNAs implicados en la regeneración hepática en un modelo murino .....	28
Tabla 3. miR-149-3p y sus moléculas blanco en diversos tipos de cáncer. ....	33
Tabla 4. Iniciadores específicos para la amplificación de RNAm relacionados con regeneración hepática.....	47

## ABREVIATURAS

• BSA	albumina de suero bovina
• CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio
• cDNA	DNA complementario
• COL1A1	Colágeno tipo 1
• Ctrl	Control
• DAB	Diaminobencidina
• DNA	Ácido ribonucleico
• dNTPs	Nucleósido trifosfato
• EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
• Fw	Forward
• GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
• GSK-3 $\alpha$	Glucógeno sintasa quinasa alfa 3
• HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
• Hp	Hepatectomía parcial
• IHC	Inmunohistoquímica
• IL-6	Interlucina-6
• mg	microgramos
• miR	microRNA
• min	minutos
• mM	milimolar
• nM	nanomolar
• nt	nucleótidos

- pb pares de base
- PBS Buffer fosfato
- PCR Reacción en cadena de la polimerasa
- pH Iones de hidrogeno
- RNA Ácido ribonucleico

## RESUMEN

El hígado tiene la capacidad de regenerarse ante alguna lesión o daño sin embargo para realizar esta labor, requiere de la participación de moléculas de matriz extracelular, así como factores de crecimiento, y de otras moléculas que regulen dicho proceso como son los miRNAs.

Estudios realizados previamente en el laboratorio nos llevaron a postular al miR-143-5p y al miR-149-3p como mediadores de la actividad anti-proliferativa y pro-fibrótica de TGF- $\beta$ 1 en células hepáticas durante el proceso regenerativo in vivo.

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del miR-143-5p y el miR-149-3p en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en un modelo murino de regeneración hepática. Para cumplir los objetivos planteados se realizó la inhibición de dichos miRNAs in vivo y después se evaluó la expresión del TGF- $\beta$ 1 y moléculas involucradas en la regeneración hepática.

Los resultados obtenidos nos indican que la inhibición del miR-143-5p y del miR-149-3p tiene un efecto regulador de la regeneración hepática, especialmente este último, el cual produjo una fuerte modulación en los marcadores de regeneración y de fibrosis, así como en la propia expresión del TGF  $\beta$ 1.

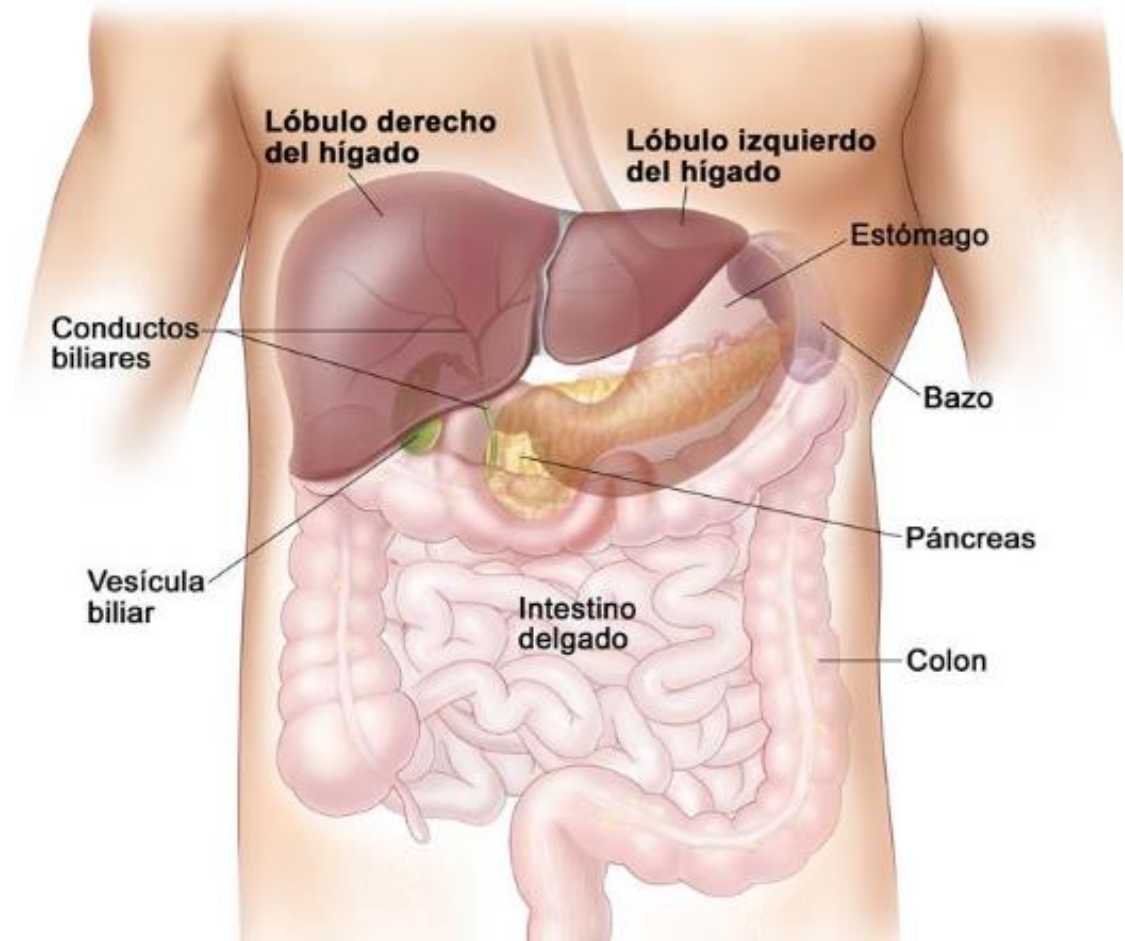
Por lo tanto, el miR-149-3p podría tener un importante papel en la regulación del proceso de regeneración en el hígado y probablemente en otros tejidos.

# I. INTRODUCCIÓN

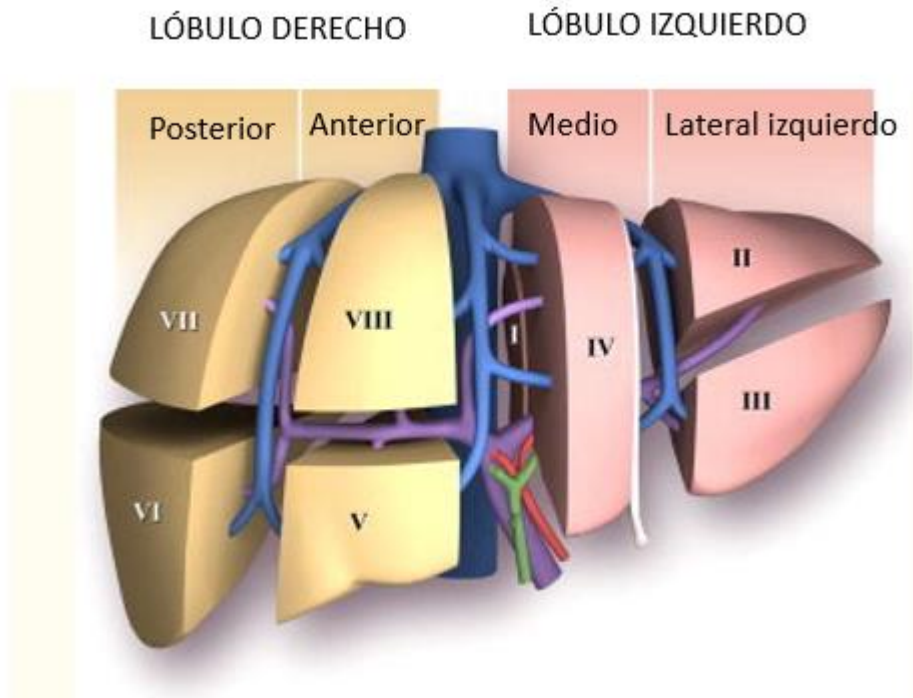
## 1.1 El hígado

El hígado representa a la glándula más grande de todo el organismo, se encuentra localizado en la porción intratorácica de la cavidad abdominal contactando con la concavidad del diafragma, la mayor parte está a la derecha del plano mediano (Figura 1). Es un órgano que aparece lobulado por la presencia de fisuras profundas y se mantiene en su sitio por la presión de los otros órganos y por diversos ligamentos que lo unen al diafragma y pared ventral del abdomen (Sibulesky, et al., 2013).

Externamente, el hígado está dividido por el ligamento falciforme en un lóbulo derecho más grande y un lóbulo izquierdo más pequeño y recibe suministro de sangre de dos fuentes: el 80% es administrado por la vena porta, que drena el bazo y los intestinos; el 20% restante, la sangre oxigenada que es administrada por la arteria hepática (Trefts, Gannon, & Wasserman, 2017). Este órgano se divide en ocho segmentos funcionales independientes, cada segmento tiene su propio pedículo portal que consiste en la rama arterial hepática, la rama portal y el conducto biliar con una rama venosa hepática separada que proporciona el flujo de salida. La salida del flujo es equilibrada por las tres venas hepáticas. La vena hepática derecha, esta divide en dos segmentos al lóbulo derecho formando en el lóbulo dos caras una anterior y posterior. La vena hepática media corre por el mismo plano que la vena cava inferior y la fosa vesicular, la vena hepática va a dividir al hígado en los lóbulos derecho e izquierdo. La vena hepática izquierda divide el hígado izquierdo en segmentos medial y lateral. La vena porta divide el hígado en los segmentos superior e inferior como se muestra en la Figura 2 (Sibulesky et al., 2013).



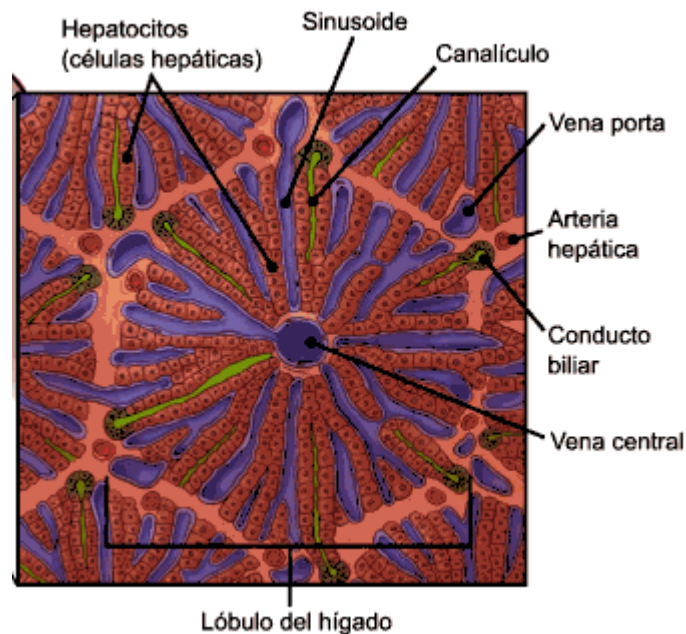
**Figura 1. Localización del hígado.** El hígado se localiza en la parte superior del abdomen, cerca del estómago, los intestinos, la vesícula biliar y el páncreas. (Tomado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/higado>)



**Figura 2. Anatomía segmentaria del hígado.** El segmento I, el lóbulo caudado, se localiza en la parte posterior. Los segmentos hepáticos II y III, se conocen como los segmentos anterior y posterior del lóbulo izquierdo. El segmento IV es el segmento medial del lóbulo izquierdo. Los segmentos II, III y IV conforman colectivamente el lóbulo funcional izquierdo del hígado. El lóbulo funcional derecho del hígado está formado por los segmentos V y VIII (segmentos anteriores), los segmentos VI y VII (segmentos posteriores) (Imagen modificada de Sibulesky et al., 2013).

### 1.1.2 Histología hepática

Desde el punto de vista histológico, la estructura básica del hígado son los lobulillos hepáticos que están separados entre sí por tejido conjuntivo. Estos lobulillos tienen forma de prisma poligonal y en corte transversal se observan estructuras hexagonales con una vena central. Como se observa en la Figura 3, entre los lobulillos se encuentra la denominada triada portal la cual está compuesta por vena porta, arteria hepática y conducto biliar (Robles et al., 2012).



**Figura 3. Representación esquemática de la triada portal en el hígado.** Estructuras que forman la unidad funcional del hígado conocida como lobulillo hepático (Robles et al., 2012).

### 1.1.3 Anatomía celular del hígado.

El hígado está compuesto de varios tipos de células de diferente origen embriológico, que incluyen a los hepatocitos, las células epiteliales biliares (colangiocitos), las células estelares, las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales del hígado. Los diferentes tipos de células que conforman al hígado tienen funciones únicas que

ayudan para que la función hepática sea regulada de manera exitosa (Trefts et al., 2017).

Los hepatocitos son la principal población de células epiteliales del hígado y constituyen la mayor parte del volumen del hígado, son células poliédricas grandes que miden entre 20 y 30  $\mu\text{m}$ . Estas células constituyen alrededor del 80% de la población celular del hígado con una vida media de alrededor de 5 meses, su núcleo es grande y esférico y ocupa el centro de la célula, la mayor parte de los hepatocitos son tetraploides es decir que contienen el doble de DNA normal. Además, tienen una capacidad de regeneración considerable luego de la pérdida de parénquima hepático por procesos tóxicos, enfermedades o cirugía (Pawlina et al., 2012).

La segunda población epitelial más abundante del hígado son los colangiocitos que tienen una función epitelial más tradicional, contribuyendo a la secreción de bilis (Loo et al., 2015).

Las células estelares se encuentran ubicadas en el espacio de Disse, el principal componente mesenquimatoso del hígado y representan una población celular dinámica que puede existir en un estado inactivo o activo; en el estado de reposo, las células estelares almacenan vitamina A en gotitas de lípidos; el daño al hígado conduce a la activación de las células estelares, su proliferación y la pérdida progresiva de las reservas de vitamina A (Puche et al., 2013). Las células estelares también contribuyen a la deposición y organización del colágeno en el hígado lesionado. Este proceso promueve la cicatrización del tejido, que puede progresar a fibrosis y como última consecuencia a cirrosis, una patología crítica que contribuye a la enfermedad hepática en etapa terminal (Gordillo et al., 2015).

Las células de Kupffer son la población de macrófagos residentes del hígado encargadas de formar las paredes de las sinusoides. Estas células reconocen los múltiples estímulos patógenos introducidos a través de la circulación portal y pueden lograr funciones pro o anti-inflamatorias en la cicatrización de heridas hepáticas, dependiendo de una serie de factores contribuyentes (Trefts et al., 2017).

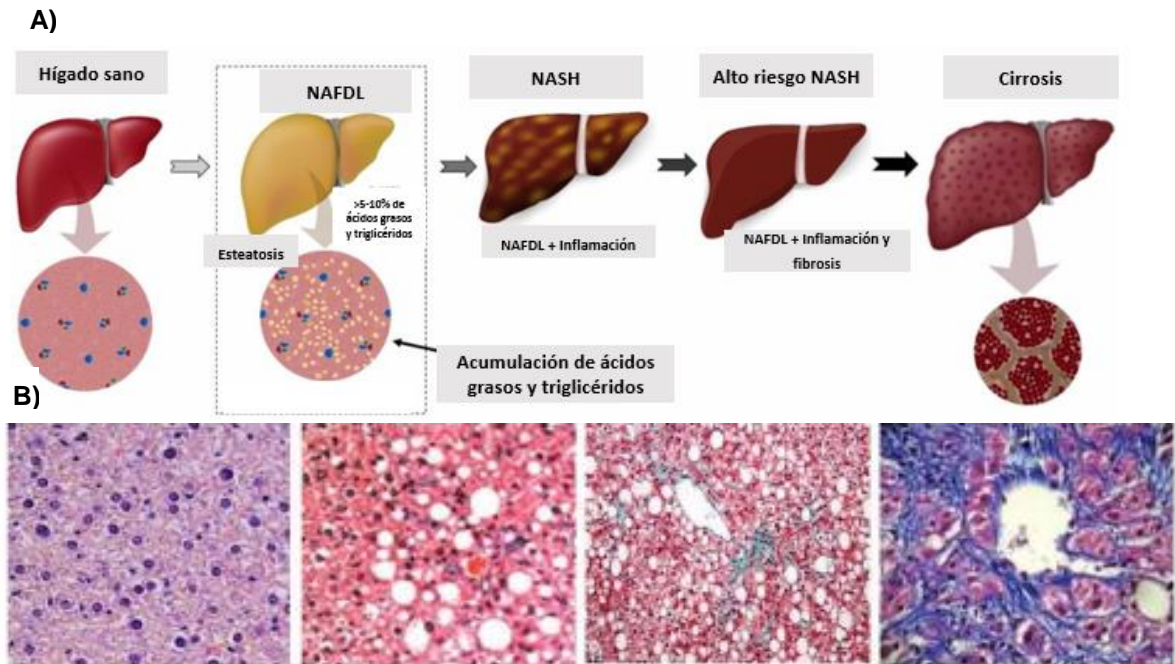
Las células endoteliales sinusoidales del hígado son una población endotelial con características únicas. Estas células forman placas de tamiz fenestradas en la luz

sinusoidal que crea poros que varían en tamaño desde 50 a 180 nm en humanos o de 50 a 280 nm en ratones y ratas. Esta organización es crítica para el intercambio de proteínas y partículas dentro de estos límites de tamaño entre el plasma y las diferentes células del hígado, mientras se mantienen ciertas funciones de barrera (Trefts et al., 2017).

## 1.2 Enfermedades hepáticas

Existen múltiples enfermedades que afectan al hígado, de entre las cuales destacan las enfermedades infecciosas ocasionadas por parásitos, bacterias y virus, las cuales están ligadas a la falla hepática aguda, como es el caso de la infección por el virus de la hepatitis C, asociada mayormente con una falla hepática aguda (He et al., 2015). Otro factor importante en las patologías hepáticas es el consumo de alcohol, la hepatopatía alcohólica es el resultado de eventos en cascada, que clínicamente conducen primero al hígado graso alcohólico, y luego, principalmente a través de la esteatohepatitis alcohólica, potencialmente a cirrosis y carcinoma hepatocelular. (Teschke, et al., 2018).

Sin embargo, muchas de las veces las enfermedades hepáticas son asociadas al hígado graso no alcohólico (NAFLD). La enfermedad de NAFLD es la causa más frecuente de las afecciones del hígado en el mundo occidental, la cual ha ido aumentando en paralelo a la pandemia de obesidad (Singh, et al., 2017). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de grasa ectópica en el hígado, la esteatosis, que no puede explicarse por el consumo de alcohol. Abarca desde la esteatosis simple hasta la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que puede tener diferentes grados de fibrosis y progresar a cirrosis hepática y enfermedad hepática en etapa terminal, con sus complicaciones asociadas, incluido el carcinoma hepatocelular (HCC) como se muestra en la Figura 4 (Machado et al., 2014).



**C) Hígado sano Esteatosis Fibrosis Cirrosis**

GRADO DE ACTIVIDAD DE NAFDL: Grado = puntuación total: S+L+B (Rango 0-8)					
Esteatosis	Puntuación S	Inflamación lobular	Puntuación L	Balonamiento Hepatocítico	Puntuación B
<5%	0	No hay	1	No hay	0
5-33%	1	< 2	2	Unas pocas células abalonadas	1
34-66%	2	2-4	3	Muchas células abalonadas	2
>66%	3	> 4			
Estadio de la fibrosis en NAFDL		Estadio			
No hay fibrosis		0			
Fibrosis leve, perisinusoidal zona 3		1a			
Fibrosis moderada, perisinusoidal zona 3		1b			
Solo fibrosis portal/periportal		1c			
Fibrosis perisinusoidal zona 3 y portal/periportal		2			
Fibrosis formando puentes		3			
Cirrosis		4			

**Figura 4. Progresión en la enfermedad del hígado graso no alcohólico.** Esquema que muestra la progresión del hígado graso no alcohólico (A), así como la micrografía que muestra la histopatología de los diferentes estadios dicha enfermedad (B) .(Imagen modificada de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/higado>).

**Tabla 1.** Sistema de puntuación histológica de la Red de Investigación Clínica sobre NAFDL (C) (Kleiner et al., 2005)

Se sabe que NAFLD se encuentra fuertemente relacionada con la obesidad, la resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) y el síndrome metabólico. La obesidad, particularmente la obesidad abdominal, es en gran medida predictiva de la esteatosis hepática y la progresión de la enfermedad. En pacientes con sobrepeso, la prevalencia de esteatosis es al menos dos veces más frecuente que en sujetos delgados, siendo directamente proporcional al aumento del índice de masa corporal; en la obesidad mórbida, casi todos los pacientes presentan esteatosis (Thuluvath, et al., 2003).

Como se mencionó anteriormente uno de los estados patológicos multifactoriales que afectan al hígado es la cirrosis hepática, en el cual la fibrosis es el precursor de esta condición. Se puede definir a la cirrosis, como el proceso en donde existe una degradación de las células parenquimales y necrosis de los hepatocitos además de la sustitución del parénquima hepático por tejidos fibróticos (acumulación de matriz extracelular, ECM), formación de nódulos regenerativos además de pérdida de la función hepática (Zhou et al., 2014).

Muchas moléculas están involucradas en las etapas iniciales de la progresión de la fibrosis, una de ellas es la citocina TGF- $\beta$ 1 (Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ 1) que presenta un incremento en su expresión en tejido fibrótico. Las células estelares hepáticas se activan cuando hay presencia de fibrosis, y se da la acumulación de colágeno tipo 1 y de la proteína  $\alpha$  SMA (Rao et al., 2017).

### 1.3 Regeneración hepática

La regeneración hepática es un fenómeno presente en todos los vertebrados, desde el pez cebra hasta el ser humano, en donde el hígado lleva a cabo procesos que promueven su capacidad regenerativa ante el daño hepático, con lo cual se intenta recuperar la arquitectura y función del órgano (Chauhan, et al., 2011). Este proceso es muy complejo que está estrictamente regulado y representa una de las formas más extraordinarias de respuesta ante el daño tisular, gracias a sus implicaciones terapéuticas por lo que ha sido motivo de interés en las últimas décadas.

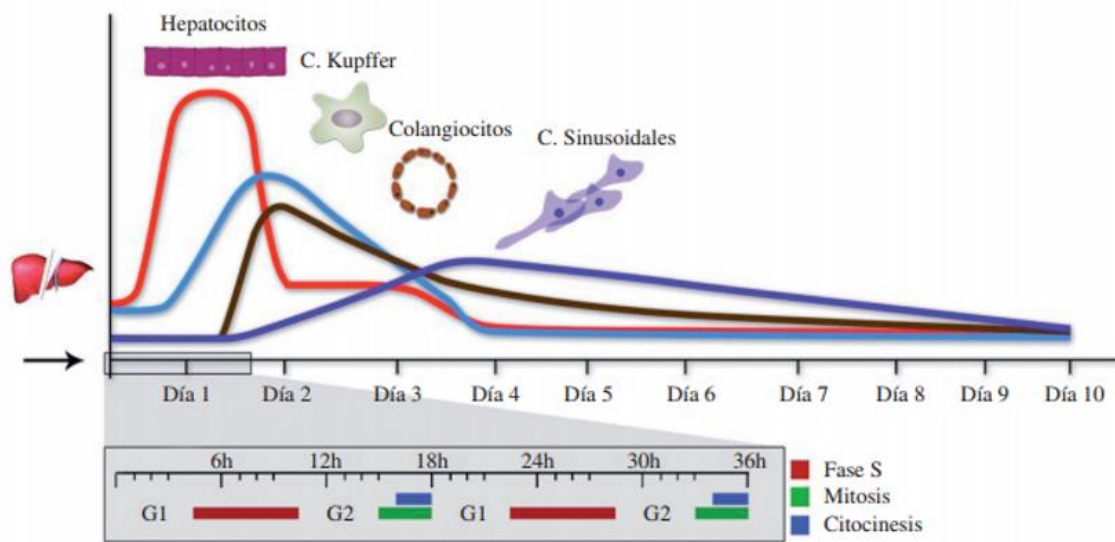
Cuando el hígado cursa con un proceso patológico, uno de los primeros eventos que ocurren en el órgano es la producción de moléculas proinflamatorias, así como de aquellas que se requieran para reparar la arquitectura y la función hepática (Liu, et al., 2016).

Uno de los eventos que se requieren para la restauración del tejido dañado es la secreción de moléculas de matriz extracelular, sin embargo, este proceso debe ser altamente regulado, y la progresión anómala de éste puede llevar a condiciones patológicas siendo la fibrosis es una consecuencia de éste. La fibrosis se define como un exceso en la expresión y deposición de moléculas de matriz extracelular, lo que puede conducir a una cirrosis y en algunas situaciones esto se puede acompañar de eventos proliferativos descontrolados de las células hepáticas que podrían causar cáncer ( He et al., 2015).

Cuando hay daño grave en el hígado y éste se encuentra estrictamente localizado se puede recurrir al procedimiento conocido como hepatectomía parcial, de manera que después de la cirugía se pueda inducir la regeneración del tejido hepático por medio de la proliferación y trans/diferenciación de las células maduras existentes, en donde los hepatocitos tienen un papel fundamental (Corpechot et al., 2011). En roedores esto puede llevar un periodo de días mientras que en el ser humano la recuperación total del órgano y su función se da en un período de 3 a 4 semanas. La proliferación de las células del hígado es un proceso cuidadosamente regulado por señales hormonales, que activan o desactivan genes, con la finalidad de mantener el balance entre el número de células y la cantidad de los componentes de la matriz extracelular en el que las propias células se sostienen ( Cienfuegos et al., 2014). Este proceso reproduce un modelo fisiológico de respuesta al daño y se divide en tres etapas: fase desencadenante, fase de proliferación y fase de terminación.

La iniciación y regulación del proceso de regeneración sobre la lesión hepática se desencadena por señales del ambiente hepático. Este proceso se ha relacionado con los mediadores de la respuesta biológica al daño tisular, por ejemplo: citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, factores de crecimiento HGF, EGF, VGF, y factores antiinflamatorios IL-10 y TGF- $\beta$  (Böhm et al., 2010).

En condiciones normales un hepatocito se encuentra en estado quiescente y para que se dé la progresión del ciclo celular se requiere, además de las señales de crecimiento ya mencionadas, estímulos que provoquen un cambio en el ciclo celular para pasar a la fase de síntesis del DNA (Figura 5). Así, después de una lesión hepática, se inicia el proceso de regeneración hepática y los hepatocitos entran en la fase G1. Siendo TNF- $\alpha$  e IL-6 moléculas importantes que contribuyen a la progresión (Michalopoulos, 2007).



**Figura 5. Cinética temporal de la tesis de síntesis de DNA en diferentes tipos de células hepáticas durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial en rata.** Los cuatro tipos principales de células hepáticas se someten a síntesis de DNA en diferentes momentos, la síntesis de ADN de hepatocitos alcanza su punto máximo a las 24 h, mientras que los otros tipos de células proliferan más tarde (A-Cienfuegos et al., 2014).

Después de la transición G0-G1, varias moléculas como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el TGF- $\beta$ 1 inician la transición G1 a S y la mayoría de los hepatocitos remanentes (95%) entran en la fase de crecimiento; dichos factores estimulan la replicación del DNA y la mitosis celular (Zheng et al., 2009).

En la fase terminal de la regeneración hepática, moléculas como el TGF- $\beta$ , específicamente la isoforma 1, aumentan su expresión y juegan un papel importante en la prevención de la regeneración excesiva (Caj et al., 2018). En el hígado de rata,

el pico de regeneración hepática se empieza a observar a las 24-36 h (fase S) después de la hepatectomía parcial (70%). El hígado recupera en gran medida un tamaño normal (93%) por hiperplasia de los lóbulos remanentes 7-10 días después de la hepatectomía, y su volumen original se puede observar a los 20 días de la hepatectomía (Michalopoulos, 2007).

TGF- $\beta$ 1 aparece en las células hepáticas no parenquimatosas y es un potente inhibidor de la síntesis de DNA en el hígado regenerante y en hepatocitos cultivados, lo que hace pensar que sea inhibidor paracrino que previene una proliferación celular descontrolada (Caja et al., 2018).

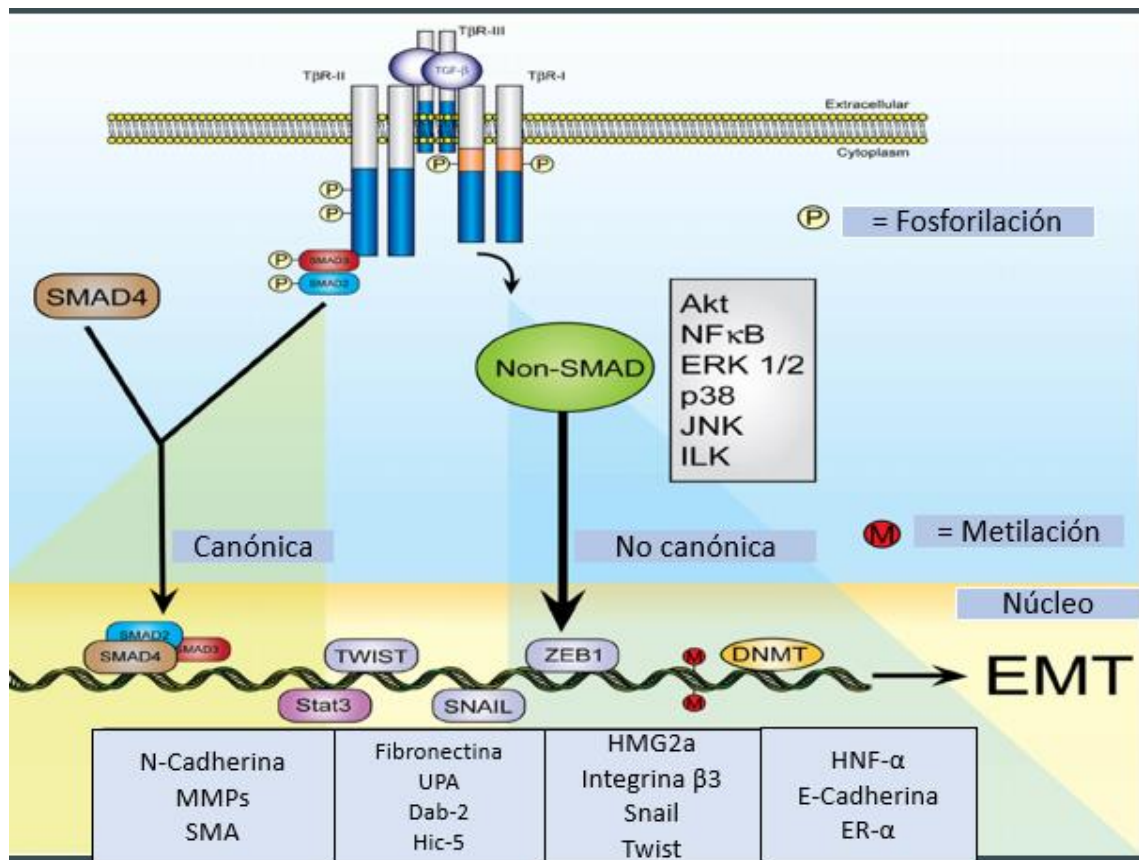
#### 1.4 Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1

TGF- $\beta$ 1 pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas, las cuales pueden ser homodiméricas o polipéptidos heterodiméricos cuya función está determinada por el tipo de célula, la condición en la que se encuentre y la presencia o ausencia de otras proteínas. Se sabe que esta citocina se encuentra involucrada en muchos procesos celulares, incluida la proliferación celular, la diferenciación, angiogénesis, migración, adhesión y apoptosis (Moses, et al., 2017).

Particularmente, TGF- $\beta$ 1 ha sido identificado en el proceso regenerativo del hígado como una molécula que regula negativamente dicho proceso conduciendo al hepatocito a la apoptosis además de ser la isoforma más abundante en el tejido y una de las principales moléculas que provocan fibrosis en el órgano (Caja et al., 2018).

TGF- $\beta$  es secretado en forma de complejo con la proteína latente (LAP) y la proteína latente de unión a TGF- $\beta$  (LTBP), la señalización se activa al unirse a su receptor correspondiente (Fabregat et al., 2016). La proteína precursora está conformada por aproximadamente 400 aminoácidos, y son los 112 residuos localizados en el extremo carboxilo terminal, los que constituyen la forma madura; los residuos restantes, localizados en la porción amino terminal, constituyen el llamado péptido asociado de latencia o simplemente LAP (Latency Associated Peptide) (Wang, et al. 2017).

TGF- $\beta$  se une a un complejo heterodimérico que conforma el receptor, que contiene subunidades de tipo serin-treonin cinasas. Los receptores más conocidos que participan en la respuesta a TGF- $\beta$  son los ALK (Activin Like receptor Kinase). La activación y fosforilación de ALK, enciende la respuesta de la ruta de señalización de las proteínas Smads (Dimitrova et al., 2017). Después de la activación de ALK, se fosforilan Smad 2 y 3, éstas a su vez activan Smad 4 mediante fosforilación y así se transportan al núcleo donde regulan la transcripción de diversos genes blancos como se muestra en la Figura 6 (Nunes, et al., 1997).



**Figura 6. Vías de señalización de TGF- $\beta$ .** TGF- $\beta$  es una citocina que regula diversos procesos celulares y su acción biológica se lleva a cabo a través de la unión a sus receptores de tipo I y tipo II que tienen actividad de serina/treonina quinasa en sus dominios citoplasmáticos. El TGF- $\beta$  activa a las proteínas SMADS (vía canónica), sin embargo, tiene la capacidad de activar otras vías (vías no canónicas), incluyendo la vía de la familia de las MAPK (Imagen modificada de [https://www.researchgate.net/figure/Canonical-and-non-canonical-TGF-b-pathways-In-the-canonical-pathway-the-three-TGF-b\\_fig1\\_259606359](https://www.researchgate.net/figure/Canonical-and-non-canonical-TGF-b-pathways-In-the-canonical-pathway-the-three-TGF-b_fig1_259606359)).

Como parte de la ruta de señalización, la proteína Smad 7 regula negativamente la respuesta por TGF- $\beta$  (Annes et al., 2003). Se postula que este efecto se lleva a cabo, cuando Smad 7 compite por el sitio de unión y activación del receptor ALK, sin embargo, también se ha propuesto que Smad7 promueve la ubiquitinización de ALK para ser degradado vía proteosoma (Hata, et al., 2016).

Algunos de los genes que son transcritos por la vía de TGF- $\beta$ 1 y que están implicados en el proceso de regeneración en el hígado, son moléculas de la matriz extracelular como fibronectina, colágenas, y lamininas (Conn, et al., 2017).

Además de TGF- $\beta$ 1 como una molécula reguladora negativa del proceso proliferativo del hepatocito y por consiguiente de la regeneración del órgano, existen otras moléculas dentro del ambiente celular que han sido identificadas como reguladoras postranscripcionales de diversos procesos biológicos en el tejido hepático y que participan en la regeneración hepática, uno de dichos tipos de moléculas son los miRNAs.

## 1.5 Los microRNAs

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes con la propiedad de regular genes a diversos niveles, fueron descritos por primera vez al estudiar la sincronización del desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Lee, et al., 1993). Los miRNAs son moléculas de 20-30 nts sintetizados a partir de transcritos precursores tipo tallo-burbuja de mayor longitud y sus efectos se observan como inhibición o silenciamiento de la expresión génica mediante la unión a secuencias complementarias generalmente en la región 3'UTR (región no traducida) de RNAs mensajeros blanco (Schueller et al., 2018).

Los miRNAs let-4 y let-7 fueron los primeros miRNAs descritos y ejercen su función al reprimir traduccionalmente genes de la fase larvaria para favorecer el progreso de la etapa adulta (Reinhart et al., 2000).

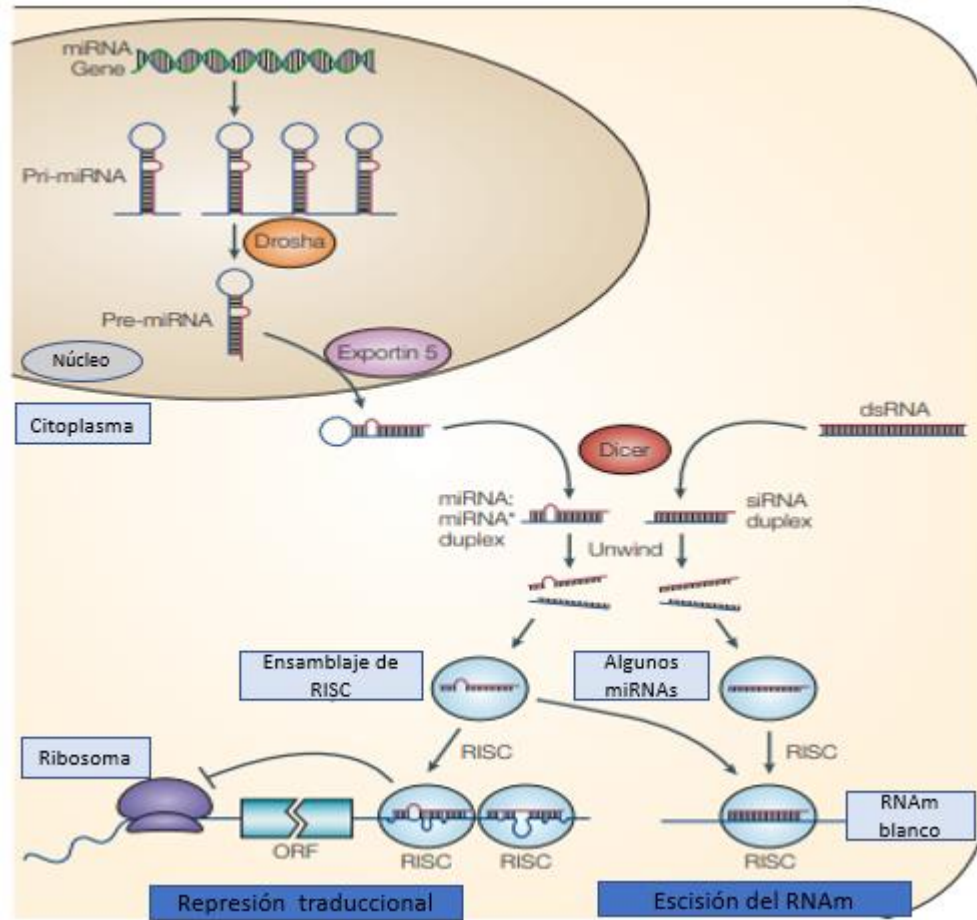
El mecanismo regulatorio fue reportado como una interacción entre miRNAs y elementos de reconocimiento a miRNAs (MREs) en las 3'UTR de ciertos RNAs mensajeros (mRNAs).

El interés por los miRNAs aumentó al observarse que este tipo de regulación se llevaba a cabo también en otros organismos como insectos, plantas y mamíferos. En 2001, cientos de estos RNAs fueron denominados por primera vez miRNAs y en la actualidad se estima que los miRNAs representan más del 3% de los genes humanos y controlan la expresión de otros miles de genes (Ha et al., 2014)

### 1.5.1 Biogénesis de los miRNAs

La mayor parte de los miRNAs se encuentran codificados en regiones intergénicas o de intrones y se transcriben principalmente por la RNA polimerasa II y en algunos casos por la RNA Polimerasa III, molécula encargada de sintetizar en el núcleo un RNA primario (pri-miRNA) que pasa por procesos de maduración, los pri-miRNAs son aproximadamente de 500–3000 nucleótidos y se procesan dentro del núcleo mediante el llamado “complejo microprocesador” que está compuesto por una por una RNAasa III DROSHA y su cofactor DGCR8 para convertirlo en un precursor o pre-miRNA, de aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el cual es reconocido por la exportina 5 saliendo del núcleo al citoplasma celular (Ha, et al., 2014).

El segundo evento de maduración de la molécula es mediado por el complejo de proteínas DICER y TRBP que cortan al pre-miRNA dejando una sola de las cadenas. Después de la selección de la cadena guía, la proteína Argonauta, que es parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), se recluta y se dirige al miRNA a su sitio blanco y se une por complementariedad parcial a la región no traducida (UTR) del RNA mensajero (principalmente a la 3' UTR) y de esta forma puede verse inhibida su expresión o proceder a la posterior degradación del RNAm (Figura 7) (Ha et al., 2014).



**Figura 7. Biogénesis y función de los miRNAs.** Esquema general de la biogénesis de los miRNAs en donde se esquematiza el procesamiento del transcrito primario del RNA y los procesos de maduración de la molécula larga en núcleo hasta su maduración final en el citoplasma para llevar a cabo su función que es regular de manera postranscripcional la expresión genética de los RNA mensajeros (Imagen modificada de He et al., 2004).

## II. ANTECEDENTES PARTICULARES

### 2.1 miRNAs en la fisiopatología de las enfermedades hepáticas.

En los últimos años se demostró que los miRNAs desempeñan un papel clave en la regulación de la inflamación, carcinogénesis, muerte celular entre muchos otros procesos. Además, se ha propuesto a los miRNAs séricos como biomarcadores en el contexto de diferentes enfermedades (Roy et al., 2016).

En el contexto de patologías del hígado, se han sugerido a varios miRNAs como biomarcadores basados en suero para la lesión hepática aguda. En este escenario, se demostró que el miR-122, un miRNA que se expresa abundantemente en el hígado, forma parte de los 7 miRNAs que muestra una mayor precisión y sensibilidad como biomarcador en la lesión hepática inducida por paracetamol que la medición del aspartato transaminasa/alanina transaminasa (AST/ALT) (Xiaoyu, et al., 2015). En otro estudio, la inhibición a corto plazo del miR-122 dio como resultado un aumento de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, activación de AMPK y reducción de la esteatosis hepática en un modelo de obesidad de ratones con una dieta rica en grasas, lo anterior podría traer como resultado en una mejora de NAFLD (Krützfeldt et al., 2005). Controversialmente, en un estudio con ratones *knock-out* del miR-122 alimentados con una dieta normal se observaron efectos perjudiciales a largo plazo cuando se compararon con los controles, siendo uno de los principales efectos la esteatosis con progresión a carcinoma hepatocelular. Además del miR-122, se han sugerido otros miRNAs, incluyendo miR-29a/b/c, miR-15a, miR-130a, miR-146a, miR-192 y miR-194 como marcadores basados en suero para la lesión hepática aguda (Howell, et al., 2018).

Se ha visto que los niveles del miR-192-5p se encuentran elevados en diversas enfermedades hepáticas, así como en pacientes con cáncer, donde los niveles séricos elevados se asocian con metástasis tumorales y escasa supervivencia (Silakit et al., 2014). Asimismo, se ha identificado que la sobre expresión del miR-21 se encuentra involucrado en el proceso fibrótico en el hígado, el cual podría inducir los niveles de expresión de TGF- $\beta$  activando de las células estelares hepáticas (Luo et al., 2017).

El miR-214-5p está identificado como un potencial inhibidor de la fibrosis por la inhibición del miRNA, la cual aumenta la expresión de genes de colágeno específicamente COL4A1, COL1A1 y la viabilidad celular en células osteoblásticas.

## 2.2 miRNAs en la regeneración hepática.

Actualmente, se han identificado diversos miRNAs que se modulan durante el proceso regenerativo del hígado y que podrían estar participando en el control de la proliferación de hepatocitos durante la regeneración hepática.

En estudios previos, se han analizado los perfiles de miRNA en hígados en un modelo murino en donde se realizó hepatectomía parcial (50%) y aunque la mayoría de los miRNAs disminuyeron en el proceso de regeneración hepática hubo otros que aumentaron el primer día y luego disminuyeron en los siguientes dos días durante el proceso regenerativo (Tabla 1) (Chen et al., 2011).

**Tabla 2. Expresión de diferentes miRNAs implicados en la regeneración hepática en un modelo murino** (Xiaoyu et al., 2015). La dirección de las flechas indica si el miRNA se está regulando positiva o negativamente.

miRNAs implicados en el proceso de regeneración hepática en un modelo	Variación en la fase de inicio y proliferación	Variación en la fase de terminación	Genes blancos
miR-16	↓	↓	-
miR-22	↓	↓	-
miR-23	↓	↓	-
miR-23b	↓	↓	<b>Smad3</b>
miR-24	↓	↓	-
miR26a	↓	↓	<b>CCND2, CCNE2</b>
miR-29	↓	↓	-
miR-30	↓	↓	-
MiR-31	↓	↓	-
mirR33	↓	↓	<b>CDK6, CCND1</b>
miR-122a	↓	↓	-

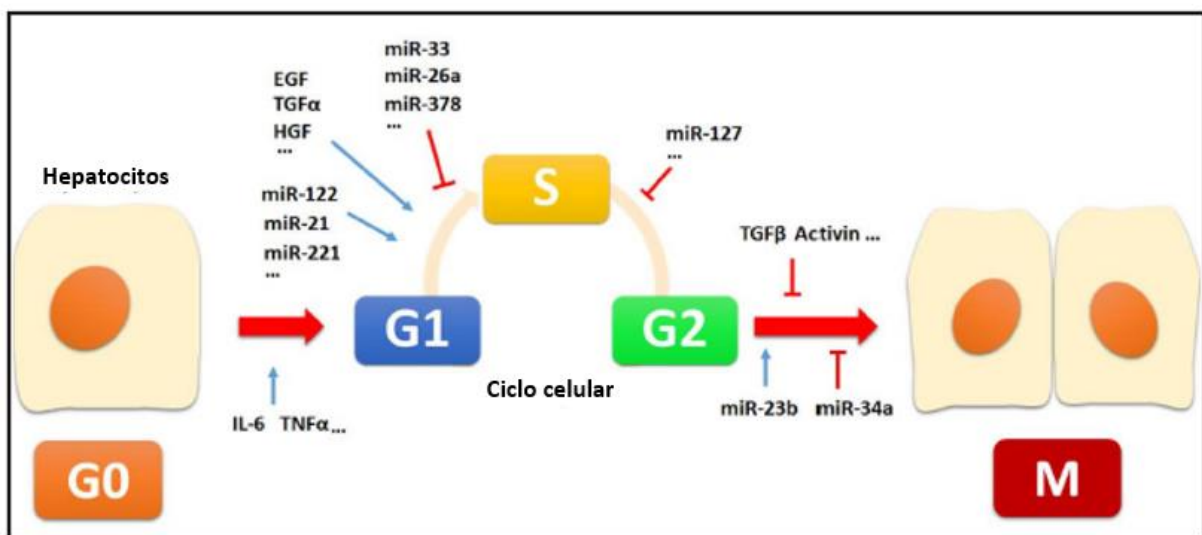
miR-126	↓	↓	-
miR127	↓	↓	<b>Bc16, Setd8</b>
miR-145	↓	↓	-
miR-150	↓	↓	<b>VEGF-A</b>
miR-378	↓	↓	<b>Odc1</b>
miR-26b	↑	↓	-
miR-192	↑	↓	-
miR-194	↑	↓	-
miR-34a	↑	↑	<b>INHBB, Met</b>
miR122	↑	-	<b>HO-1</b>
miR-203	↑	-	<b>SOCS3</b>
mir-221	↑	-	<b>Arnt</b>

Diversos reportes han demostrado el importante papel de los miRNAs en el ciclo celular de los hepatocitos durante la regeneración hepática; por ejemplo, en un estudio usando un modelo murino, se realizó la inactivación del gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge (DGCR8) lo cual dio lugar a una deficiencia del miR-21 y/o un retraso en la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S, demostrando el papel del miRNA en el control del crecimiento y proliferación celular. La expresión de este miRNA se analizó en ratones de tipo silvestre durante la etapa temprana de la regeneración hepática, después de haber realizado hepatectomía parcial demostrando que hay una fuerte inducción de miR-21 a las 18 h después de la hepatectomía parcial sugiriendo que el aumento en la expresión podría participar en la progresión del ciclo celular (Song et al., 2010)

Por otro lado, se ha comprobado que el RNAm correspondiente al gen 2 de translocación de células B (Btg2), es un blanco directo del miR-21 (Leone et al., 2013) Btg2 que es un factor de anti-proliferación que podría suprimir la activación de FoxM1, una proteína esencial para la síntesis del ADN en hepatocitos. Por lo tanto, la

proliferación de hepatocitos podría acelerarse a través del efecto inhibitorio de miR-21 sobre Btg2 (Song et al., 2010).

En otro estudio realizado por Yuan y cols, se demostró que el miR-23b se redujo, se ha demostrado que el miR-23b tiene la capacidad de disminuir la expresión de Smad3 120 h después de la hepatectomía parcial. Adicionalmente se demostró que el miR-23b influye positivamente en la activación de la vía TGF- $\beta$ 1/SMAD3 que a su vez esta citocina disminuye la expresión del miR-23b a nivel transcripcional. (Yuan et al., 2011).



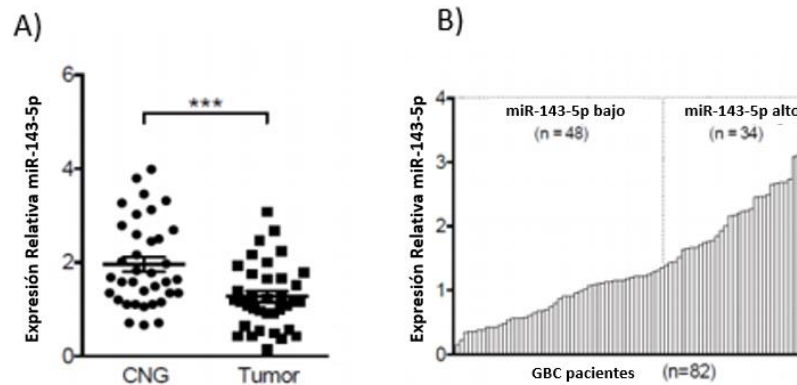
**Figura 8. Expresión de miRNAs durante el ciclo celular de los hepatocitos.** Los miRNAs participan en el proceso de regeneración hepática conduciendo en la fase inicial a la proliferación de los hepatocitos y en la fase final la cual lleva a la inhibición de los eventos de multiplicación celular (Imagen modificada de Chen et al., 2011).

### 2.3 Antecedentes del miR-143-5p

La modulación de los miRNAs en el proceso de regeneración hepática ha resultado de un gran interés para nuestro equipo de trabajo, y en específico, la regulación que ejerce el TGF- $\beta$ 1 como uno de los principales orquestadores de dicho proceso. Cabe mencionar que no se ha encontrado en la literatura ningún antecedente que haya estudiado el papel del miR-143-5p en la regeneración hepática.

Los antecedentes de la posible relación entre el miR-143-5p derivan de un estudio en nuestro laboratorio en donde se llevó a cabo una secuenciación masiva de extracto de RNA de células Huh-7 tratadas y no tratadas con TGF- $\beta$ 1 y se observó que el miR-143-5p se encuentra aumentado en aproximadamente 5 veces con respecto al control no tratado. Por lo tanto, se planteó el estudio del miR-143-5p como mediador de la actividad de TGF- $\beta$ 1.

El miR-143-5p, fue previamente identificado como un supresor de tumor, se encuentra en el cromosoma 5q32, y se ha visto que se encuentra implicado en varios tipos de cánceres, incluyendo pulmón, riñón, hígado, esófago, gástrico y de mama. (Chivukula et al., 2014). En un estudio reciente, se demostró que la sobreexpresión de miR-143-5p puede inhibir la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de vesícula biliar (GBC) *in vitro* e *in vivo* (Figura 9). De manera contraria se ha demostrado el miR-143-5p puede actuar como un supresor de tumor al inhibir el comportamiento agresivo de GBC mediante la vía HIF-1 $\alpha$  y EMT ( He et al., 2017).



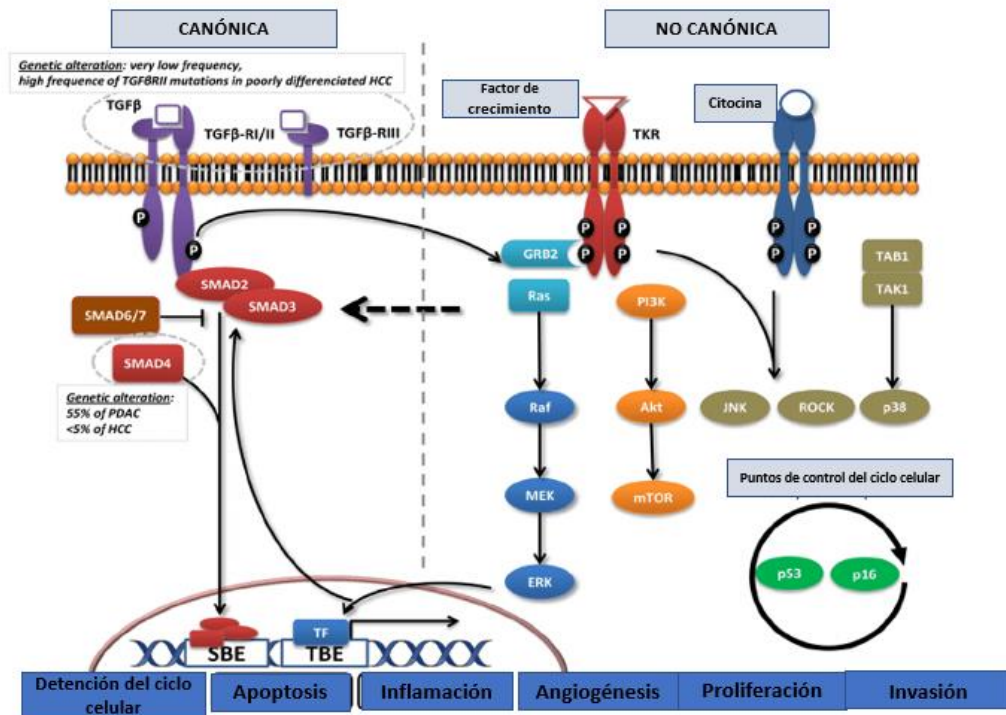
**Figura 9. Reducción de la expresión de miR-143-5p en tejidos de GBC se correlaciona con un mal pronóstico.** Expresión reducida de miR-143-5p en tejidos de GBC pareados con la correspondiente vesícula biliar no cancerosa (GNC) (Imagen modificada de He et al., 2017).

En otro estudio se analizó la expresión de este miRNA en pacientes con hepatitis b relacionada con insuficiencia hepática aguda en crónica (HBV-ACLF). En este estudio se demostró que 6 miRNAs se encuentran sobre expresados en pacientes con HBV-ACLF, entre los cuales se encuentra el miR-143-5p, lo que significa que podría ser utilizado como un potencial biomarcador para el diagnóstico de HBV-ACLF (Ding et

al., 2015). En un estudio se demostró que el miR-143-5p podría regular la expresión TGF- $\beta$ 1 en los melanocitos, la sobre expresión del miR-143-5p promueve la inhibición de la proteína TAK1, implicada en la vía no canónica de TGF- $\beta$ 1 como se muestra en la Figura 10 (Ji et al., 2018 )

El aumento en la expresión del miR-143-5p, llevó a un aumento de la migración y proliferación de melanocitos, lo que da soporte a la hipótesis de que el miR-143-5p podría regular los procesos antes mencionados partiendo de la modulación directa de TAK1.

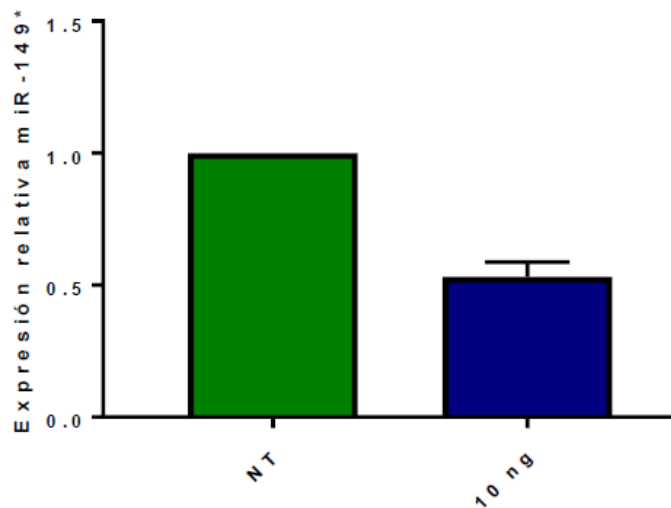
Por lo anterior, se postula que el miR-143-5p podría tener funciones importantes en la vía de TGF- $\beta$ 1, sin embargo, el papel de este miRNA en regeneración hepática no se ha estudiado hasta el momento, es por ello que resulta de gran interés para nuestro laboratorio determinar su función en este proceso.



**Figura 10. Representación de la vía canónica y no canónica de TGF- $\beta$ .** (Imagen modificada de (<https://www.researchgate.net/figure/Canonical-and-non-canonical-TGF-b-pathways-In-the-canonical-pathway-the-three-TGF-b>))

## 2.4 Antecedentes del miR-149-3p

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio usando células Huh-7 tratadas con TGF- $\beta$ 1 mostraron que uno de los miRNAs que reduce su expresión ante dicho estímulo es el miR-149-3p como se muestra en la Figura 11.



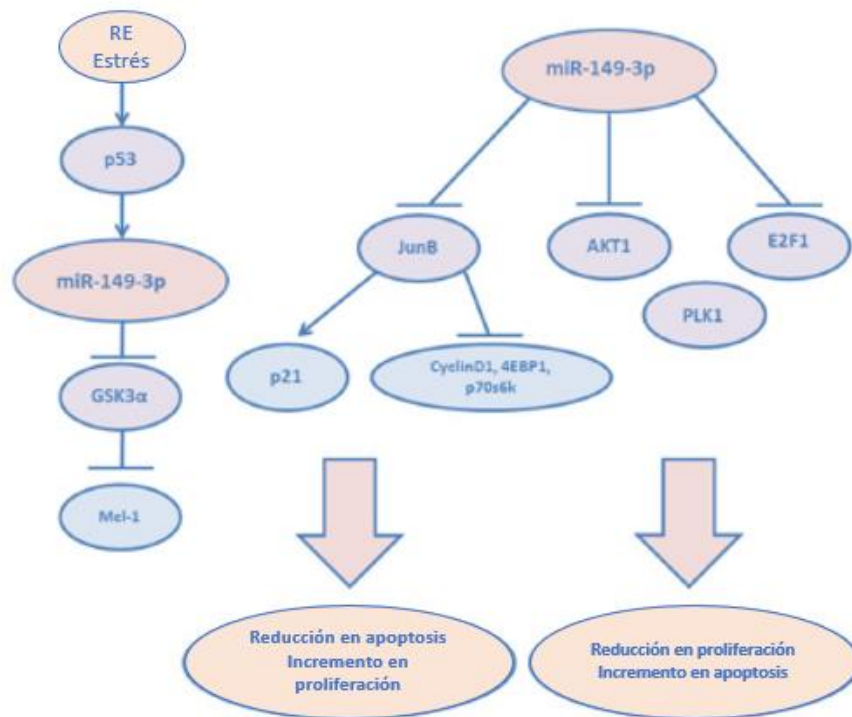
**Figura 11. Expresión relativa del miR-149-3p en células Huh-7 estimuladas con TGF- $\beta$ 1.** Las células Huh-7 fueron tratadas con TGF- $\beta$ 1 (10ng) o no tratadas (NT) y después de 24 h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar un cDNA para después utilizar una sonda TaqMan específica para el miR-149-3p y amplificarlo (Yocupicio-Monroy, M. et al, en preparación).

El miR-149-3p ha sido estudiado previamente por diversos autores y se ha descrito su función tanto como oncogén supresor de tumor, asimismo se ha descrito que se encuentra significativamente desregulado en varios cánceres como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3. miR-149-3p y sus moléculas blanco en diversos tipos de cáncer** (Tabla modificada de (Yunjie He et al., 2018).

Hsa-miR-149-3p	Cáncer	Gen blanco
<b>Alta expresión</b>	Melanoma	GSK3 $\alpha$
	Leucemia linfoblástica aguda de células T	Jun $\beta$
	Glioma	
	Hígado	
<b>Baja expresión</b>	Neuroblastoma	AKT1, E2F1
	Cáncer gástrico	Wnt-1
	Cáncer pancreático	AKT1

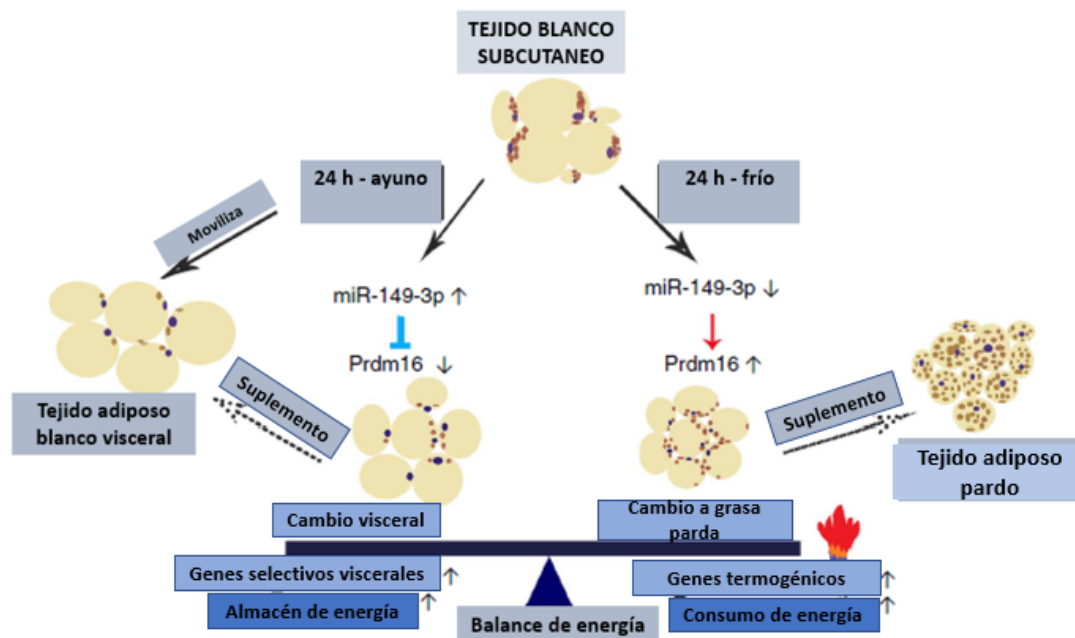
Fan y cols. en el 2015 demostraron que el miR-149-3p actúa como un regulador oncogénico que promueve la proliferación y reduce la apoptosis a través de la proteína JunB, lo cual produce la disminución de proteína p21, ciclina D1, 4EBP1, y p70s6k, los que contribuyen a la capacidad proliferativa de las células tal como se muestra en la Figura 12 (Fan et al., 2015).



**Figura 12. Papel del miR-149-3p en proliferación y apoptosis** ( He et al., 2018).

Por otro lado, se ha descrito que el miR-149-3p tiene la capacidad de regular la conversión de grasa parda a grasa blanca (viseralización) durante la exposición a temperaturas bajas (Ding et al., 2016). La grasa blanca es aquella que almacena exceso de energía en forma de triglicéridos y permanece en distintos depósitos intraabdominales (viscerales) y en la capa subcutánea, la acumulación de esta grasa se encuentra asociada con enfermedad cardiovascular (Seale et al., 2011). Por otra parte, la grasa parda o tejido adiposo marrón, oxida la energía química produciendo calor para así proteger contra la hipotermia y la obesidad (Pischon et al., 2008).

Se ha visto que durante la rápida "visceralización" es decir cuando la grasa blanca se va acumulando en depósitos intraabdominales se promueve el aumento en la expresión del miR-149-3p, la cual tiene como blanco al RNAm de la proteína PRDM16, una molécula co-reguladora clave e indispensable para el "pardeamiento" de la grasa blanca. Además, en preadipocitos cultivados, la sobreexpresión del miR-149-3p promueve un cambio de tipo visceral a subcutáneo (comparativamente benigno) durante la diferenciación celular (Ding et al., 2016).



**Figura 13. Tejido adiposo blanco subcutáneo vincula el balance de energía a través de la regulación de Prdm16 mediada por miR-149-3p.** Después de ayunar durante 24 h, el tejido adiposo blanco subcutáneo asume muchas de las características morfológicas y moleculares de la grasa visceral para conservar la energía a través de la supresión de PRDM16 mediada por miR-149-3p. En contraste, la exposición al frío durante 24 h disminuyó el miR-149-3p y condujo a un aumento de los niveles de proteína PRDM16 y la termogénesis adaptativa en el tejido adiposo blanco subcutáneo. (Imagen modificada de H. Ding et al., 2016).

Por otra parte, también se ha visto que el miR-149-3p tiene un impacto importante en las células cancerosas ya que se ha demostrado que la baja expresión en el miR-149-3p aumenta la sensibilidad de las células de melanoma a la apoptosis, las cuales tienen altos niveles de p53. Además de hay una relación de melanomas metastásicos con altos niveles del miR-149-3p que se asocian con una disminución de GSK-3 $\alpha$  y un aumento de Mcl-1 produciendo resistencia a la apoptosis (Jin et al., 2011).

En nuestro equipo de trabajo recientemente se caracterizó parcialmente el papel del miR-149-3p en una línea celular de hepatocitos humanos (Huh7), sin embargo, es de nuestro interés conocer el efecto de la modulación del miR-149-3p en el hígado “*in vivo*” en un modelo murino, así como en cultivos primarios de hepatocitos, lo cual nos acercará un poco más a los eventos que se llevan a cabo en la regeneración hepática.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas del hígado representan la cuarta causa de muerte en hombres y la séptima en mujeres de entre 20 y 60 años. Estos padecimientos tienen diversas causas, pero en los últimos años se ha registrado un aumento de los casos diagnosticados como hígado graso no alcohólico condicionado principalmente por malos hábitos alimentarios, vida sedentaria y estrés entre otros factores. En este tipo de padecimientos, los procesos de regeneración hepática son fundamentales para restaurar en lo posible las funciones del órgano, por lo cual el estudio de este proceso es de suma importancia en la búsqueda de estrategias adecuadas de tratamiento.

Así, es de gran importancia tener un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares que participan en la regeneración hepática teniendo como objetivo el diseño de una terapia que ayude a mejorar la condición de los pacientes. En este sentido, los miRNAs podrían ser muy útiles para el desarrollo de tratamientos en las enfermedades hepáticas debido a que la modulación de su expresión ha podido mejorar condiciones patológicas relacionadas con este órgano tanto *in vitro* como *in vivo*.

En nuestro estudio se tiene como objetivo el análisis de las funciones de dos miRNAs en la regeneración hepática, con lo cual se busca mejorar la comprensión de la regulación del proceso regenerativo a nivel postranscripcional "*in vivo*" y así dilucidar su futura aplicación como parte del tratamiento de los pacientes diagnosticados con patologías hepáticas.

## IV. HIPÓTESIS

Los miR-143-5p y miR-149-3p modulan la respuesta anti-proliferativa y pro-fibrótica de TGF- $\beta$ 1 durante la regeneración hepática en un modelo murino.

## V. OBJETIVOS

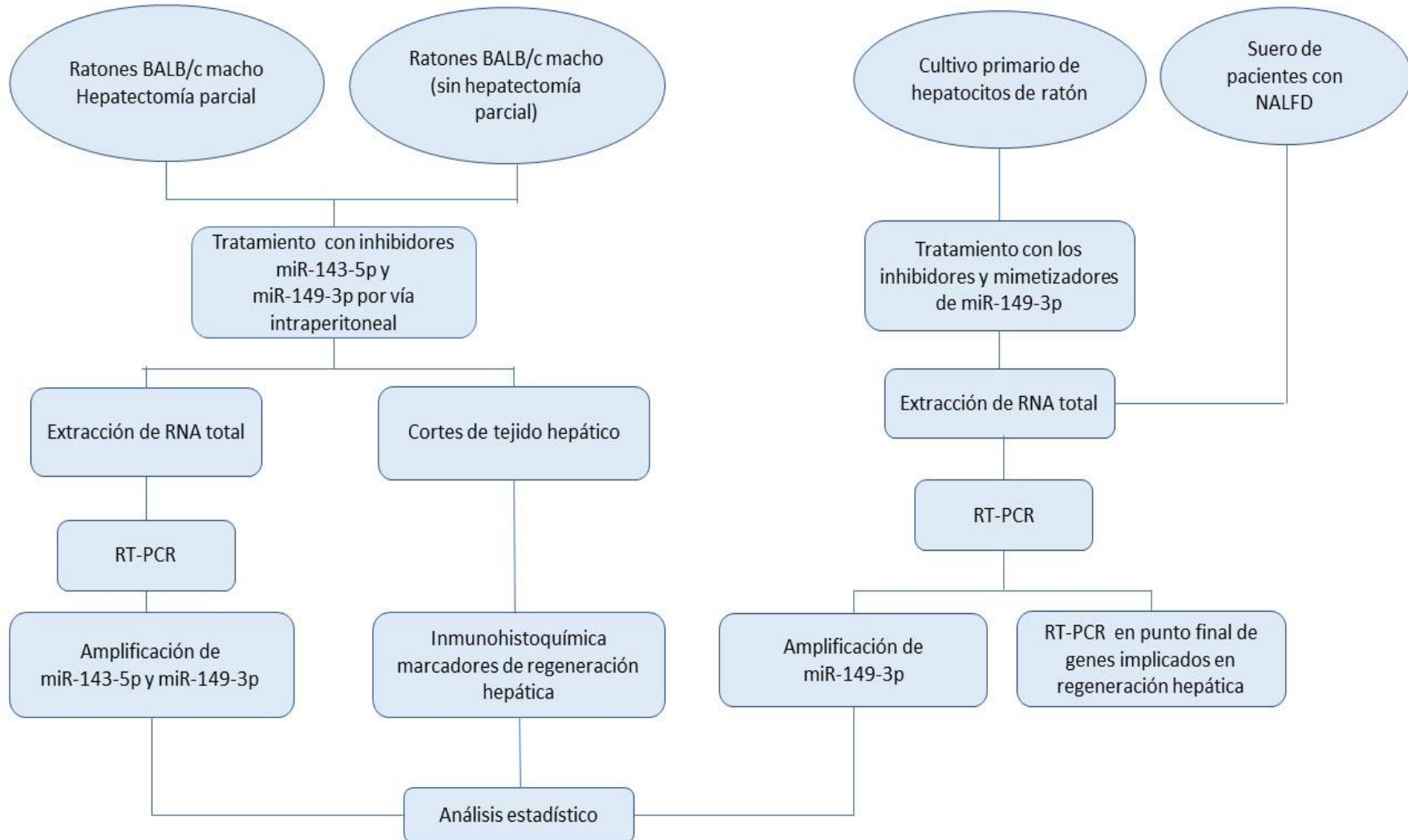
### 5.1 Objetivo general.

- Determinar el efecto de los miR-143-5p y miR-149-3p en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en un modelo murino de regeneración hepática.

### 5.2 Objetivos particulares.

- Evaluar los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1 a nivel RNA y proteína del modelo murino de regeneración hepática.
- Inhibir los miR-143-5p y miR-149-3p en el modelo murino de regeneración hepática y evaluar los niveles de expresión TGF- $\beta$ 1 y moléculas involucradas en la regeneración.

## VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Animales

Se utilizaron ratones BABL/c macho, con un peso inicial de 30 g (al menos 6 semanas de edad) los cuales tuvieron acceso libre a agua y comida en un ciclo de 12h de luz/oscuridad. Los animales fueron sometidos a cirugía para realizar hepatectomía parcial retirando aproximadamente el 70% del hígado para establecer el modelo de murino de regeneración hepática (ratones Hp) y como control, en otro grupo de ratones (sanos) se realizó un procedimiento similar, pero si retirar tejido hepático, esto es que recibieron cirugías falsas.

Los ratones sanos y Hp fueron divididos en grupos (5 ratones) y tratados de la siguiente manera con inhibidores de miRNA (miRCURY EXIQON) a una concentración de 10  $\mu$ M como se muestra en la Figura 15.

Después de cumplir el esquema de inoculación, los ratones se dejaron en ayuno y se sacrificaron con dosis letal de pentobarbital sódico siguiendo las regulaciones federales para el cuidado y experimentación animal (Ministerio de Agricultura, SAGARPA, México), los hígados fueron extirpados y una parte del tejido se trató con PFA al 4% para la fijación y luego se incluyeron en parafina para la obtención de cortes que se analizarán por inmunohistoquímica (IHC). Otra parte del tejido se usó para la extracción de RNA total, la cual fue tratada con TRizol (Invitrogen), y finalmente congelada a -80°C para su uso posterior.

### 7.2 Pacientes

Los pacientes con diagnóstico de NAFLD fueron incluidos como parte de un estudio clínico longitudinal que se desarrolla en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE, un hospital de referencia terciario en la Ciudad de México; siguiendo la referencia de las unidades de salud que atienden a la población general. Se incluyeron en el estudio a pacientes hombres y mujeres candidatos a la cirugía bariátrica mayores de 23 a 60 años con evidencia previa de hígado graso no alcohólico (NAFLD). Se excluyeron del estudio a los pacientes que tuvieran medicación con efecto potencial

en el hígado, infecciones graves en el último mes, con condiciones inestables clínicamente, aquellos pacientes que hubieran recibido cirugías que modifiquen la historia natural de NAFLD y aquellas que hicieron consumo de cualquier agente o condición hepatotóxica (alcohol, medicamentos, virus de hepatitis, colestasis). El estudio cumplió con las pautas éticas de la Declaración de Helsinki de 1964 y sus modificaciones posteriores, y fue aprobado por los Comités Institucionales de Investigación, Ética y Bioseguridad locales (Protocolo ID No. 403.2013). Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito.

Las variables demográficas y clínicas de cada paciente fueron registradas con lo cual se hizo un extracto que se incluye como Tabla en el Apéndice 12.2.

### 7.3 Ensayos de Inmunohistoquímica

La porción de cada hígado de los ratones que fueron embebidos en parafina se seccionaron en intervalos de 3  $\mu\text{m}$  y se desparafinaron a 60°C en la incubadora por 20 min hasta observar las gotas de parafina, posteriormente se incubaron por inmersión en xileno durante 5 min. Los cortes se trataron secuencialmente con 100, 96, 90, 80 y 70% de etanol durante 5 min. Posteriormente, las muestras se trataron en buffer de Tris/EDTA (0.1 /0.001M) pH 9.0 durante 45 min a 99°C para desenmascarar los antígenos, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Para la inactivación de la actividad de peroxidasa endógena, los portaobjetos con los cortes fueron sumergidos en 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 20 min, posteriormente se realizaron 3 lavados de 3 min con buffer PBS/TBS. Los cortes fueron tratados con albúmina de suero bovino al 10 % (BSA) durante 30 min para bloquear la unión no específica de anticuerpos. Enseguida, se incubaron con anticuerpo policlonal anti-TGF- $\beta$ 1 de conejo diluido 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-146), anti-Ki 67 monoclonal de ratón diluido 1:100 (Santa Cruz Biotechnology sc-23900), anti-COL1A1 monoclonal de ratón diluido 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, sc-213182), anti- GSK-3 $\alpha$  monoclonal de ratón diluido 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc 5264) y anti-HGF  $\alpha$  monoclonal de ratón diluido 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, sc-374422), todas las diluciones se hicieron en TBS/BSA 1% y los anticuerpos se incubaron durante 1h a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4°C. Después de 5 lavados con TBS

durante 3 min, los portaobjetos fueron tratados con los anticuerpos secundarios correspondientes a una dilución 1:100. Los anticuerpos secundarios fueron IgG de cabra anti-conejo o anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch). Después de 5 lavados de 3 min con TBS, los portaobjetos se incubaron en una solución de sustrato DAB-Peroxidasa (Roche Diagnostics), 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.01M PBS, pH 7.2 durante 5 min. Los núcleos fueron contra teñidos con la solución de hematoxilina de Mayer (Wako Pure Chemicals). Posteriormente, los tejidos se lavaron con agua bidestilada y se trataron con etanol al 70, 80, 90, 96 y 100% y finalmente, xileno al 100%. Los portaobjetos se sellaron con la resina Entellan New (Merck). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia, la expresión de cada anticuerpo fue cuantificada con el programa Image J analizando diez campos aleatorios en cada una de las áreas del tracto portal del hígado. Los resultados corresponden al número de células teñidas positivamente con respecto al número total de células considerando 3 experimentos independientes.

#### 7.4 Extracción de RNA total

Los hígados de ratón congelados en 300µl de reactivo TRIzol (Invitrogen) se lisaron en hielo con el disruptor de tejidos (QIAGEN) y posteriormente fueron centrifugados durante 5 min a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante, se les agregó 30 µl de aditivo homogenizador y se incubaron por 10 min en hielo. En el caso de los hepatocitos, estos se despegaron de la placa y se lavaron con PBS, luego se incubaron con Trizol (Invitrogen USA) por 5 min, se homogenizaron con la pipeta y se guardaron a -80°C durante 1 h. En ambos casos, se les adicionó 300 µl de fenol-cloroformo, mezclando con vortex y se centrifugó a 10,000 g por 15 min a TA, la fase acuosa se recuperó y se le adicionó 1/3 de vol. de etanol al 100%, se mezcló nuevamente en vortex. La mezcla anterior se pasó por las columnas de afinidad (Zymo-Spin) y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 min. Posteriormente se realizaron los lavados adicionando 700 µl de buffer de lavado (Tris 40 mM, EDTA 4mM, EtOH 75%) centrifugando a 8,000 rpm durante 1 min, este paso se repite 2 veces. Finalmente, el RNA se eluyó adicionando 30 µl del buffer AVE (H<sub>2</sub>O libre de nucleasas) este se calentó previamente a 60°C se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min. La cuantificación del

RNA contenido en los extractos se determinó por espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo scientific) y se guardó a -80°C hasta su uso.

#### 7.4.1 Extracción de RNA a partir sueros de pacientes NAFLD.

Para la extracción de RNA a partir de suero se siguió el protocolo recomendado por QIAGEN para el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit. A 140µl de suero se les adicionó 560 µl de buffer de lisis AVL a 5.6µl de carrier RNA-AVE previamente preparado, se homogenizó con vortex y se incubó a TA durante 10 min. Posteriormente se le adicionó 560 µl de etanol al 100%, se mezcló en vortex durante 15s, se transfirió a una columna de afinidad (QIAamp Mini) y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, después de pasar todo el volumen por la columna de afinidad se realizaron dos lavados agregando 500 µl de buffer AW1 y AW2 centrifugando a 8000 rpm durante 1 min.

La columna se centrifuga una tercera vez para desechar lo que haya quedado en ella a 12,000 rpm durante 1 min. Finalmente, el RNA se eluyó adicionando 30 µl del buffer AVE (H<sub>2</sub>O libre de nucleasas) previamente calentado a 60°C, se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 min. La cuantificación del RNA contenido en los extractos se determinó por espectrofotometría, utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo scientific) y se guardó a -80°C hasta su uso.

#### 7.5 Aislamiento de hepatocitos de ratón

Los hepatocitos primarios de ratón se aislaron mediante un protocolo modificado del previamente reportado por Maricela Aparicio-Vergara et al 2010.

Brevemente, los ratones BABL/c macho se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis dependiente del peso de cada ratón. Después de anestesiarnos, se les realizó una incisión a través de la piel en la línea media ventral y se identificó tanto la vena cava inferior como la vena porta hepática para comenzar la perfusión.

La perfusión se llevó cabo con HBSS-EGTA y Penicilina Estreptomina al 1% (25 ml) usando una bomba ajustada a una velocidad de 0.38 ml/ min, posteriormente, el hígado fue digerido con la solución de HBSS-colagenasa durante 5-10 min a una velocidad (1.7 ml/min). Después de completar el procedimiento de perfusión el hígado se transfirió a una placa de Petri y se disgregó el tejido usando una solución de HBSS-

CaCl<sub>2</sub> frío cortando suavemente en trozos el hígado, posteriormente se filtraron los hepatocitos a través de un filtro con un poro de 100 µm y se realizaron 3 lavados con HSBB-CaCl<sub>2</sub>, éstas se centrifugaron durante 3 min a una velocidad de 50 g a 4°C y la pastilla conteniendo los hepatocitos se lavó con medio M199. Posteriormente, las células se resuspendieron en 10 ml de medio M199 y se sembraron aproximadamente 1x10<sup>8</sup> células por pozo en una placa de 12 pozos con medio de adherencia durante 3-4 h. Después las 4 h se cambió el medio de adherencia por el medio de mantenimiento.

La placa de 12 pozos utilizada para cultivar los hepatocitos primarios fue tratada con gelatina al 0.2 % (Bio Rad), se incubó por 1 h a 37°C, se retiró el exceso de gelatina, y se incubó adicionalmente en la campana de flujo laminar durante 2 h en presencia de luz UV. La placa se guardó a 4°C para su uso ese mismo día.

## 7.6 Transfección de mimetizadores e inhibidores del mmu-mir-149-3p para cultivo primario de hepatocitos.

Los hepatocitos primarios de ratón se sembraron en placa de 12 pozos, la transfección se llevó a cabo con mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p a una concentración de 10 nM, se realizó por el método de lipotransfección y se utilizó una mezcla del reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La mezcla se incubó por 10 min a TA para permitir la formación de complejos de transfección. Durante el tiempo de incubación, los hepatocitos se lavaron con medio M199. Posteriormente se adicionaron los complejos de transfección correspondientes a cada pozo adicionando medio DEMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y glutamina (200mM), incubándose a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. A las 24 h post transfección se retiró el medio y se prosiguió a la extracción de RNA total.

## 7.7 Cuantificación del miR-143-5p y miR149-3p por RT-PCR en tiempo real.

Después de la extracción de los miRNAs en los tejidos de hígado, se llevó a cabo la cuantificación de los miRNAs de interés por RT-PCR en Tiempo Real, la cuantificación de los miRNAs se realizó con el kit Taq Man Advanced miRNA Assays, siguiendo las especificaciones del proveedor. El RNA se sometió a una reacción de adición de cola de Poly A usando 0.5 µl de buffer Poly A (10X) 0.5 µl de ATP, 0.3 µl de la enzima Poly

(A), 2  $\mu$ l de RNA y se completó un volumen de reacción de 5  $\mu$ l. La mezcla anterior fue incubada en el termociclador por 45 min a 37°C, 10 min a 65°C y a 4°C.

Posteriormente se realizó la reacción de ligadura del adaptador usando 3  $\mu$ l del buffer DNA ligasa (5X), 4.5  $\mu$ l de 50% PEG 8000, 0.6  $\mu$ l del adaptador de ligación (25X), 1.5  $\mu$ l de RNA ligasa y se completó un volumen de reacción de 15  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. La mezcla anterior fue incubada en el termociclador a 16°C durante 60 min y a 4°C.

Una vez hecha la reacción anterior se sometió a una reacción de transcripción reversa usando 6  $\mu$ l de buffer RT (5X), 1.2  $\mu$ l de dNTPs Mix (25mM), 1.5  $\mu$ l de RT primer Universal 20X, 3  $\mu$ l de la enzima RT mix y se completó un volumen de reacción de 30  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. La mezcla anterior fue incubada en el termociclador a 42°C durante 60 min, 85°C por 5 min y a 4°C.

La reacción anterior se sometió a una pre-PCR para amplificar los miRNAs de interés, de la siguiente manera 25  $\mu$ l de Master Mix 2x miR-Amp, 2.5  $\mu$ l del primer Mix 20X miR-Amp, 5  $\mu$ l de cDNA y se completó un volumen de 50  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. La mezcla anterior fue incubada en el termociclador a 95°C durante 5 min, 95°C por 3 min, 60°C por 30 s (14 ciclos) 99°C, 10 min y a 4°C.

Posteriormente se realizó una PCR en tiempo real para amplificar los miRNAs de interés con sondas TaqMan específicas utilizando 5  $\mu$ l de TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X, 0.5  $\mu$ l TaqMan Advanced miRNA Assay 20X, 4  $\mu$ l de la reacción pre-miR y 0.5 de agua libre de nucleasas. La reacción anterior se amplificó en el equipo de tiempo real Applied Biosystems 7300 Real Time PCR system con el siguiente ciclaje: 95°C durante 20 s, 95°C por 3 s y a 60°C durante 30s (60 ciclos). La cuantificación de expresión relativa del miRNA se determinó mediante el análisis de los resultados por el método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , utilizando el gen de GAPDH como gen constitutivo de referencia.

### 7.8.1 RT- PCR en punto final (Cultivo primario de hepatocitos)

Para la determinación de la abundancia de los diversos RNAm en los cultivos primarios de hepatocitos de ratón transfectados se llevó a cabo RT-PCR en punto final usando un total de 700 ng de los extractos de RNA total que sometieron a una reacción de retrotranscripción utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied

biosystems) adicionando al extracto 1 µl de buffer RT 10X, 0.4 µl dNTP Mix (100mM), 1 µl 10X hexámeros al azar, 0.5 µl de la enzima de RT (High Capacity) y agua libre de nucleasas para completar 10 µl. La reacción anterior fue incubada en el termociclador GeneAmp PCR System 7300 (Applied Biosystems) por 10 min a 25°C, luego 120 min a 37°C y 5 min a 85°C.

Una vez obtenido el cDNA, se utilizó 1 µl de este para preparar la reacción de PCR a la cual se le adicionaron 5 µl de PCR Master Mix (Roche Diagnostics), 0.5 µl del oligonucleótido sentido y antisentido (1µM), el volumen final de la reacción se llevó a 10 µl con agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 94°C por 3 min, 94°C por 3s, Tm de los oligonucleótidos (ver Tabla 4) por 30s, 72°C por 30s durante 40 ciclos y 72°C por 7 min.

Los RNAm que se amplificaron fueron *tgfb1*, *col1a1*, *gsk3α* y *gapdh* como control de carga, Tabla 4.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos específicos para la amplificación de RNAm relacionados con regeneración hepática.

Gen	Secuencia FW	Secuencia RV	Tm	Amplicón
<i>tgfb1</i>	CCTCATGGCCACCCCC CTG	TCAATGTACAGCTGCCGC ACAC	55°C	104pb
<i>Col1a1</i>	ACATGCCGCGACCTCA AGAT	ATGTCTAGTCCGAATTCCT G	55°C	601pb
<i>Gsk3α</i>	TTCAAC CATCTCTCAATG	TGGGTTGTAGGAAGTGGT G	54°C	90pb
<i>gapdh</i>	ACAGTCAGCCGCATCT TC	CCAATACGACCAAATCCG TTG	55°C	350pb

### 7.8.2 Cuantificación de miR-149-3p por RT-PCR en tiempo real con iniciadores horquilla (Cultivo primario de hepatocitos y suero de pacientes con NAFLD).

Para evaluar los niveles del miR-149-3p en el suero de pacientes con hígado graso no alcohólico, 298 ng de extracto de RNA total obtenidos de suero se utilizaron para la reacción de RT-horquilla; en el caso de la cuantificación de los niveles del miR-149-3p después de la transfección del cultivo primario de los hepatocitos de ratón, se usaron

300 ng del extracto de RNA total. El RNA se mezcló con 0.7  $\mu$ l del iniciador horquilla miR-149-3p (50  $\mu$ M) [5'TGC AAG CGA AAG GAA AGG'TGC AAG CGA AAG GAA AGG 3'] y se ajustó con agua libre de nucleasas con un volumen final de 7.5  $\mu$ l, la reacción se incubó en el termociclador GeneAmp PCR System 7300 (Applied Biosystems) a 72°C por 20 min, enseguida la reacción se puso en hielo para generar un choque térmico durante 5 min. A la reacción anterior se le adiciono 1 $\mu$ l de Buffer RT 10X, 1 $\mu$ l de dNTPs (10 mM), y 0.5  $\mu$ l de enzima de RT (High Capacity, Applied Biosystems) y se incubó en el termociclador a 25 °C durante 5 min, a 42 °C 90 min, 72°C durante 15 min y a 4°C.

Posteriormente se llevó a cabo la PCR en punto final utilizando 5 $\mu$ l de SYBR Maxima Green/ROX 2X (Thermo Fisher), 0.2  $\mu$ l del iniciador Universal Horquilla (10  $\mu$ M) [5'GTG CAG GGT CCG AGG T 3'], 0.2  $\mu$ l del iniciador Fw horquilla miR-149-3p (10 $\mu$ M) [5'TGC AAG CGA AAG GAA AGG 3'], 1.5  $\mu$ l de cDNA y se ajustó la reacción a 10  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. La reacción anterior se amplificó en el equipo de tiempo real Applied Biosystems 7300 Real Time PCR system con el siguiente ciclaje: 50 °C por 2 min, 95°C por 10 min, 95°C durante 15 s, 65°C por 30s y 72°C durante 30s por 50 ciclos.

La cuantificación de expresión relativa del miRNA se determinó mediante el análisis de los resultados por el método  $2(-\Delta\Delta Ct)$ , utilizando al RNA 18s como normalizador.

## 7.9 Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado usando el Software GraphPad Prism 8.0. Todos los datos se expresan como la desviación estándar media y se compararon mediante la prueba de ANOVA. Las diferencias se consideraron con un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

El hígado adulto tiene una capacidad extraordinaria para regenerarse después de una lesión a pesar de la acumulación de factores formadores de cicatrices que normalmente bloquean la proliferación y reducen la supervivencia de las células hepáticas residuales (Oh et al., 2018). La capacidad de los hepatocitos para entrar en el ciclo celular y regenerar el hígado después de la pérdida de tejido proporciona un modelo "*in vivo*" para estudiar la regulación de la proliferación y la regeneración de órganos, en este sentido, se ha visto que uno de los mecanismos que la célula usa para llevar a cabo la regulación de procesos como la progresión del ciclo celular involucra a los miRNAs, los cuales son muy importantes en la regulación de la expresión genética de un gran número de mRNAs celulares (Ha & Kim, 2014). En el caso de los hepatocitos, se ha demostrado que dichas moléculas podrían llevar a cabo funciones importantes en la regeneración hepática por la capacidad que poseen regular la expresión de los diferentes factores que intervienen en la sobrevivencia y proliferación celular, inflamación, expresión de factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular (Mezaki et al., 2012).

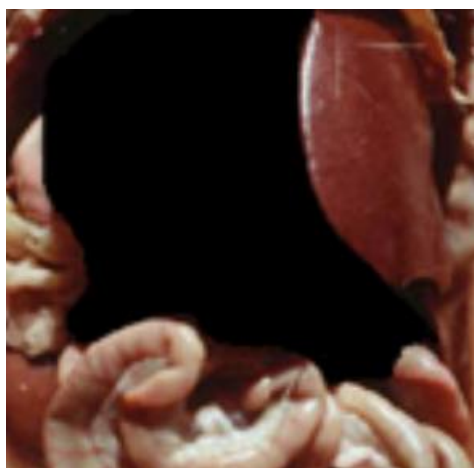
Como se expuso anteriormente, el propósito de este trabajo fue el análisis del efecto de dos miRNAs en la expresión de moléculas involucradas en la regeneración hepática, específicamente relacionadas con el TGF- $\beta$ 1.

Estudios previamente realizados en el laboratorio nos llevaron a postular al miR-143-5p y miR-149-3p como mediadores potenciales de la actividad de TGF- $\beta$ 1 en células hepáticas, ya que como se mencionó anteriormente, ambos miRNAs tienen como blancos putativos a diversas moléculas que participan en la vía del TGF- $\beta$ .

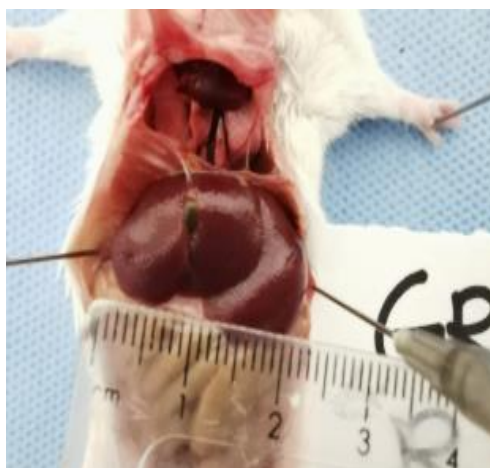
Por otra parte, una de las metas del presente proyecto consistió en investigar el posible papel de dichos miRNAs "*in vivo*" por lo que los experimentos se realizaron en modelos de ratón, con lo que también se excluye el efecto tumoral que tienen las líneas celulares de hepatoma normalmente usadas para estos estudios.

Con la finalidad de establecer el efecto de la modulación de los miRNAs en el hígado “*in vivo*”, primeramente se estableció un modelo de regeneración hepática en ratones, de esta manera se estandarizaron los procedimientos para contar con un modelo donde el TGF- $\beta$ 1 se encuentra altamente expresado y orquesta la modulación en la regeneración tisular (Mezaki et al., 2012). Así, se realizó hepatectomía parcial a un grupo 15 ratones BALB/c macho retirándoles el 70% del hígado, estos se denominarán en adelante ratones Hp. Así mismo, se trató a otro grupo de 15 ratones practicándoles una cirugía falsa, a los cuales se le denominó ratones sanos. A las 24 h post hepatectomía o cirugía falsa, se inició el tratamiento con la inoculación intraperitoneal de los inhibidores de los miRNAs 143-5p, 149-3p y el inhibidor control (secuencia nucleotídica sin RNAm blanco en el ratón) Figura 14.

A)

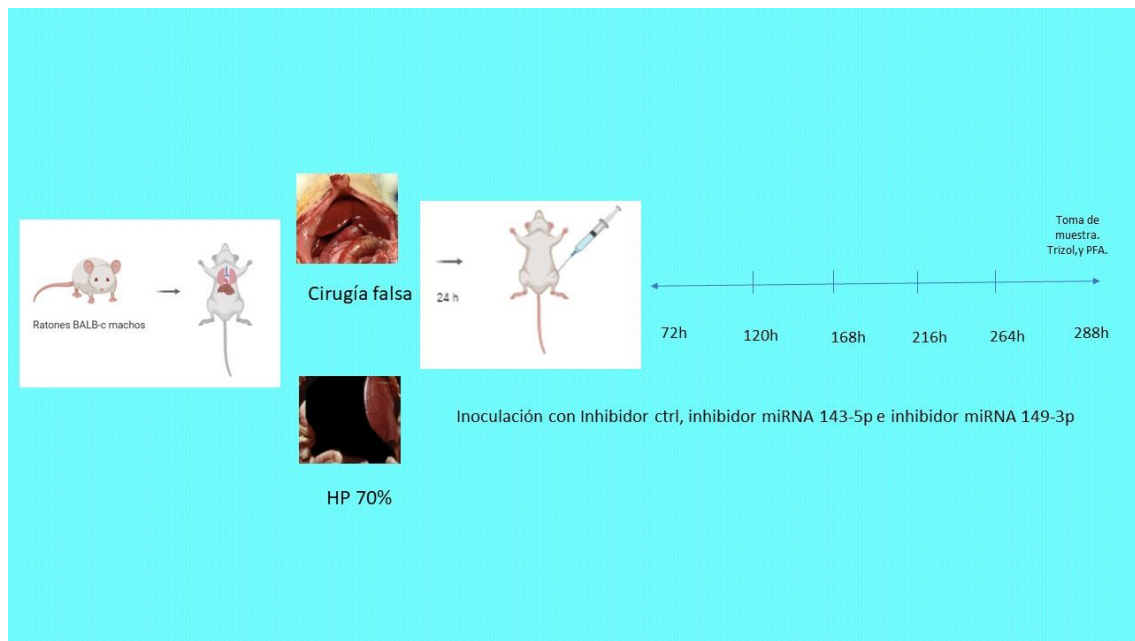


B)



**Figura 14. Imágenes del modelo murino con hepatectomía parcial.** Los ratones BALB/c machos se dividieron en dos grupos, ratones sanos con cirugía falsa y ratones con hepatectomía parcial, ambos grupos fueron tratados por vía intraperitoneal 24 h después de la cirugía usando 10 $\mu$ M de los inhibidores de miRNAs (miR-control, miR-143-5p y miR-149-3p). En la imagen se muestra el hígado que con hepatectomía parcial antes de la inoculación (A) y al final del tratamiento, en donde se aprecia que el hígado recuperó su tamaño (al menos el 90%) (B).

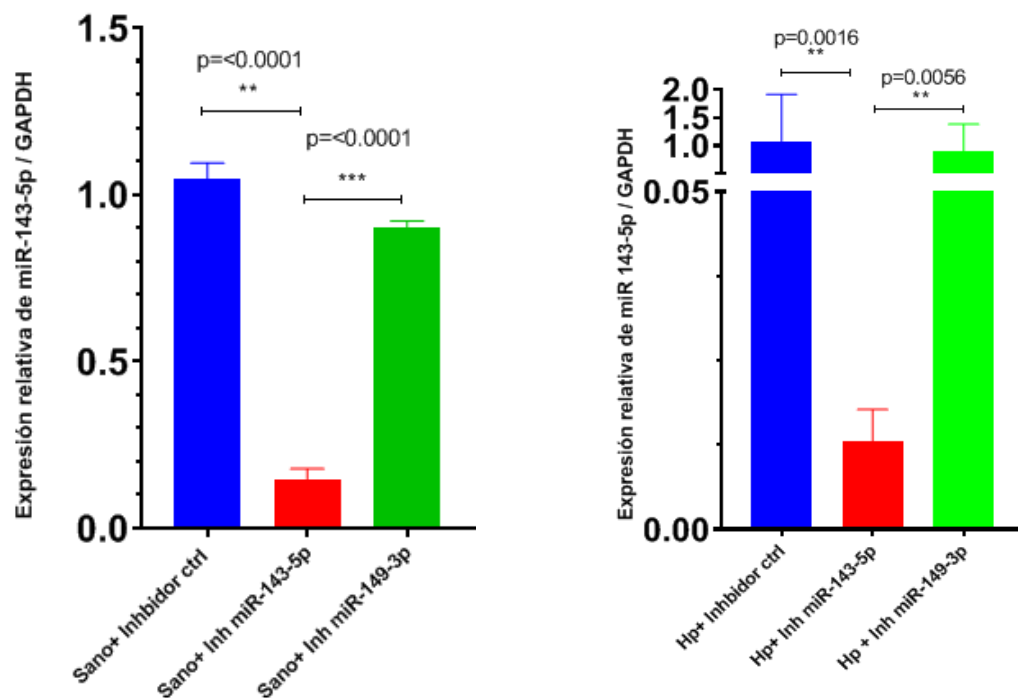
Los ratones se trataron con los inhibidores de miRNA empezando a las 24 h post cirugía y después cada 48 h hasta completar 288 h, cuando el hígado había recuperado su tamaño (al menos el 90%). En la Figura 15, se muestra el esquema del tratamiento que se aplicó en ambos grupos de ratones.



**Figura 15. Esquema del tratamiento en el modelo murino.** Los ratones BALB/c machos se dividieron en dos grupos. GRUPO A. Ratones sanos los cuales recibieron cirugía falsa y GRUPO B. Ratones con 70% de hepatectomía parcial. A las 24 h post hepatectomía o cirugía falsa, se inició con el tratamiento con la inoculación intraperitoneal de los inhibidores de los miRNAs 143-5p, 149-3p y el inhibidor control (secuencia nucleotídica sin blanco en el ratón)

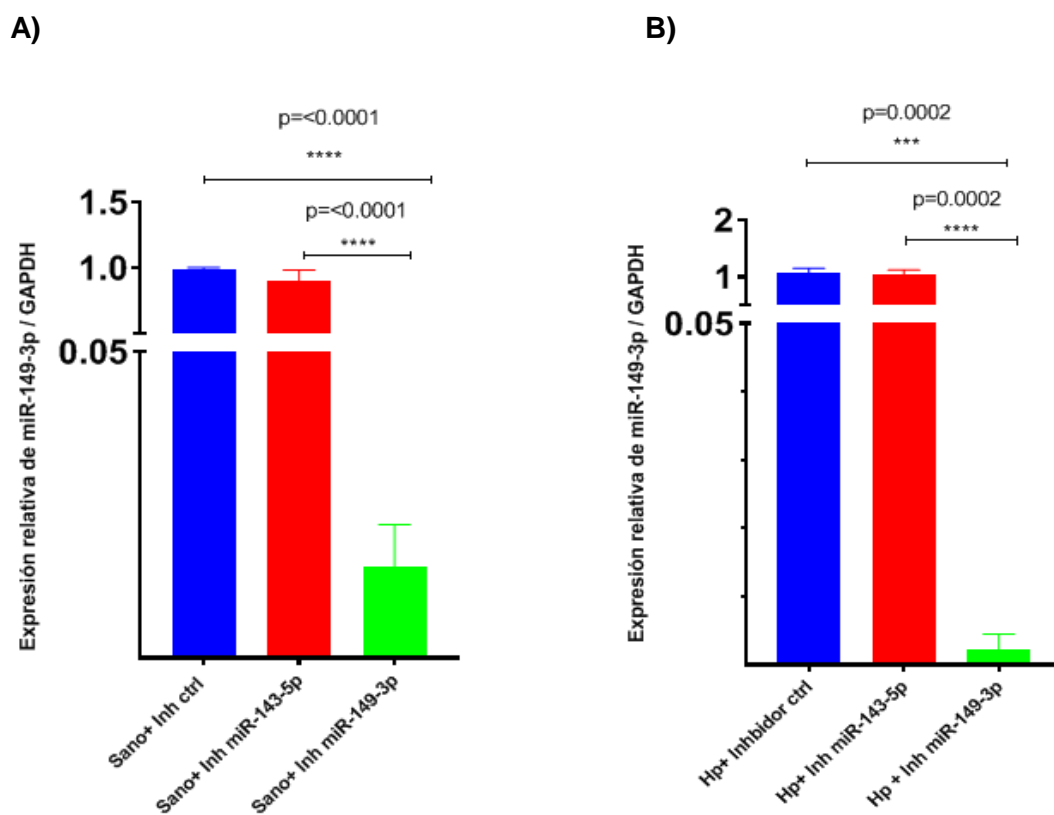
## 8.1 Inhibición de miRNAs 143-5p y 149-3p en hígado de ratones sanos y ratones Hp.

Para demostrar que el tratamiento de inhibición de los miRNAs había sido exitoso, se determinó el nivel de expresión de éstos RNAs en ratones sanos y Hp. El nivel de expresión de dichos miRNAs se determinó mediante RT-PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman. Los resultados muestran que el nivel de expresión del miR-143-5p en ratones sanos disminuyó un 85.84% y en el caso de los ratones Hp la disminución fue del 98.79%, siendo ambos estadísticamente significativos en comparación con los hígados que fueron inoculados con el inhibidor control o con el inhibidor de miR-149-3p, confirmando así que el tratamiento con los inhibidores del miR-143-5p disminuyó los niveles de éste (Figura 16 ).



**Figura 16. Inhibición del miR-143-5p en ratones sanos y en ratones Hp.** Los hígados de los ratones BALB/c sanos (A) y ratones Hp (B) tratados con inhibidores del miR- 143-5p, miR-149-3p o el inhibidor control fueron utilizados parcialmente para obtener extractos de RNA total y posteriormente realizar RT-PCR en tiempo real. El nivel de expresión relativa se calculó utilizando el método 2 (- $\Delta\Delta C_t$ ) usando a GAPDH como normalizador. Los resultados de al menos 3 experimentos independientes (hígado de 3 ratones de cada tratamiento) se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró  $p \leq 0.05$  para la significancia estadística (\*)

Asimismo, se determinó el nivel de expresión del miR-149-3p en ratones sanos y Hp donde los resultados muestran que el nivel de expresión del miR-149-3p en hígados sanos se inhibió un 98.58% y en el caso de los hígados de ratones Hp la disminución fue del 99.79 %, en ambos la diferencia resultó estadísticamente significativa (Figura 17). Cabe destacar que el miR-149-3p tiene una baja expresión en hígado y es probable que eso haya influido en el nivel de inhibición que fue casi del 100%.



**Figura 17. Inhibición del miR-149-3p en ratones sanos y en ratones Hp.** Los hígados de los ratones BALB/c sanos (A) y ratones Hp (B) tratados con inhibidores del miR-143-5p, miR-149-3p o el inhibidor control fueron utilizados parcialmente para obtener extractos de RNA total y posteriormente realizar RT-PCR en tiempo real. El nivel de expresión relativa se calculó utilizando el método 2 ( $-\Delta\Delta C_t$ ) usando el RNAm de GAPDH como normalizador. Los resultados de al menos 3 experimentos independientes (hígado de 3 ratones de cada tratamiento) se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró  $p \leq 0.05$  para la significancia estadística (\*).

## 8.2 Evaluación de la expresión de TGF- $\beta$ 1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp.

Después de haber establecido el modelo murino en el cual se inhibió exitosamente la expresión de los dos miRNAs de interés, la siguiente etapa consistió en determinar el nivel de expresión del TGF- $\beta$ 1, ya que como se ha expuesto anteriormente, ambos miRNAs modulan su expresión tras el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 y tienen blancos putativos en la vía de TGF- $\beta$ . Esta citocina lleva a cabo diferentes funciones en la célula como son: el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis, además de ser uno de los factores que se expresa fuertemente después de la hepatectomía parcial como un regulador negativo de la proliferación y positivo de la fibrosis (Caja et al., 2018). Por lo tanto, es importante determinar de qué manera la inhibición de los miR-143-5p y miR-149-3p podría modificar la expresión de TGF- $\beta$ 1 y probablemente el proceso de regeneración hepática.

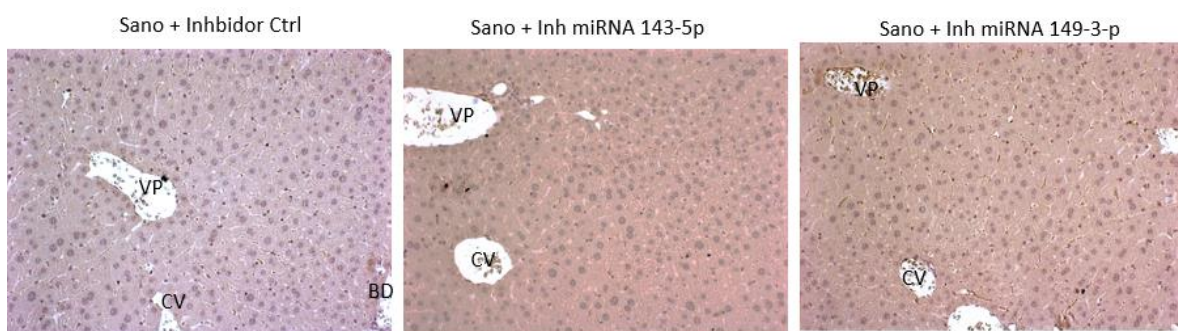
Así, al finalizar el tratamiento de los ratones con los inhibidores de los miRNAs, se sacrificaron los animales y los hígados fueron utilizados en parte para llevar a cabo ensayos inmunohistoquímicos con la finalidad de evaluar la localización y abundancia del TGF- $\beta$ 1.

Como se puede observar en la (Figura 18 A), los hígados provenientes de ratones sanos fueron negativos a la tinción cuando se usó el anticuerpo contra TGF- $\beta$ 1 en todos los casos. Este resultado es el esperado, debido a que en los hígados sanos no debe haber expresión de dicha molécula.

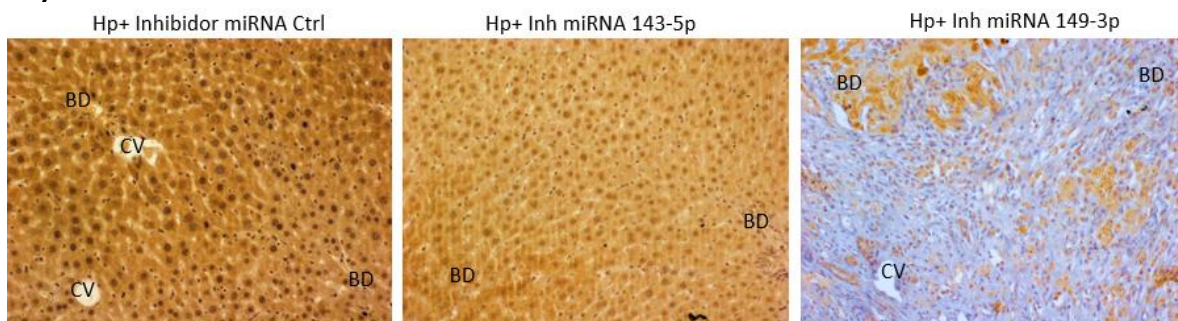
Por otro lado, en los hígados provenientes de ratones Hp inoculados con el inhibidor control, se puede observar un alto nivel de expresión del TGF- $\beta$ 1, especialmente en las áreas del hígado correspondientes a los cordones sinusoidales (Figura 18 B). En el tejido hepático de los ratones inoculados con el inhibidor del miR-143-5p y miR-149-3p se aprecia una reducción de la expresión de TGF- $\beta$ 1 siendo más pronunciada en los que fueron inoculados con el inhibidor de miR-149-3p (Figura 18 C).

Las imágenes obtenidas en las inmunohistoquímicas se sometieron a un análisis cuantitativo y los resultados de al menos 3 experimentos independientes se analizaron mediante la prueba de ANOVA para determinar si las diferencias en la expresión del TGF- $\beta$ 1 podrían considerarse estadísticamente significativas. Los resultados muestran que los hepatocitos positivos para TGF- $\beta$ 1 disminuyeron un 14% en el caso del tratamiento el miR-143-5p en comparación con el inhibidor control; en el caso de la inhibición del miR-149-3p los hepatocitos positivos para TGF- $\beta$ 1 disminuyeron un 69.01% en comparación con el tratamiento con el inhibidor control (Figura 18 C). Además, se determinó que también existe una diferencia estadísticamente significativa de 56.18% entre los hepatocitos positivos para TGF- $\beta$ 1 tratados con el inhibidor del miR-143-5p con respecto al miR-149-3p. En el grupo de los ratones sanos sin hepatectomía no se detectaron hepatocitos positivos para TGF- $\beta$ 1 en ninguno de los casos. Lo anterior sugiere que la vía de TGF- $\beta$ 1 se ve afectada cuando hay inhibición de ambos miRNAs, de tal manera que las moléculas blanco de los miRNAs que aumentan su expresión tras el tratamiento, contribuyen en conjunto a la inhibición en la expresión de este factor de crecimiento, lo cual podría influir en la regulación negativa que esta citocina ejerce en la proliferación de las células hepáticas y también en la capacidad pro-fibrótica de esta molécula.

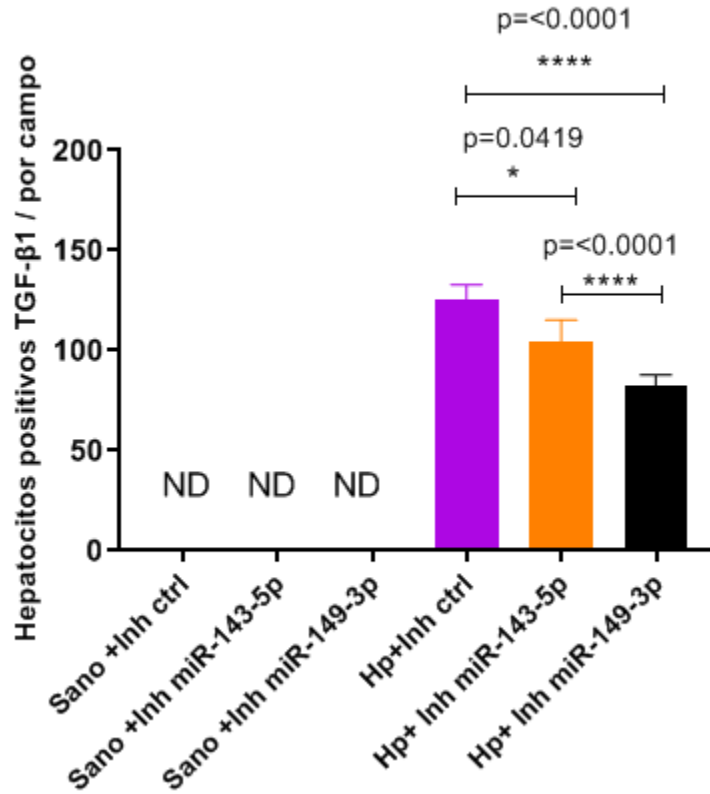
**A)**



**B)**



c)



**Figura 18. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de TGF- β1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.** Los hígados de ratones sanos (A) y de ratones Hp (B) fueron embebidos en parafina y tratados para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica usando un anticuerpo de conejo anti-TGF-β1 y posteriormente con un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano. Las muestras fueron reveladas con DAB y los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina de Mayer. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia. BD, conducto biliar; VP, vena porta; CV, vena central. La expresión de TGF-β1 fue cuantificada con el programa Image J, examinando 3 experimentos independientes y su posterior análisis con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ , ND, no determinado (C).

### 8.3 Evaluación de la expresión del marcador de progresión del ciclo celular, Ki 67, en hígado de ratones sanos y ratones Hp

El siguiente ensayo tiene como propósito la evaluación del nivel de expresión de un marcador de proliferación o de progresión del ciclo celular para determinar si la disminución en la expresión del TGF- $\beta$ 1 podría correlacionar con cambios en la proliferación celular en el modelo murino de regeneración hepática.

La proteína Ki 67 se expresa en el núcleo cuando las células se están dividiendo, ya que su función es facilitar la condensación de los cromosomas en la interfase del ciclo celular, por lo tanto, se utilizó como un marcador de la progresión del ciclo celular de tal manera que el aumento en su expresión podría indicar un mayor nivel de regeneración hepática. Por todo lo anterior, se utilizó un anticuerpo anti- Ki 67 para determinar mediante inmunohistoquímica el nivel de expresión de dicha molécula. En el caso de los hígados sanos no se detectó la expresión de Ki 67, probablemente, debido a que los hepatocitos se encuentran quiescentes es decir en la fase G0 del ciclo celular (Figura 19 A).

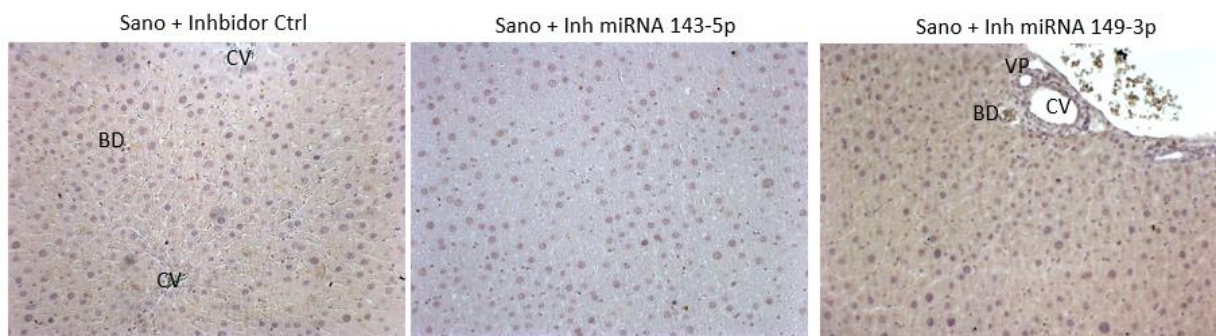
Sin embargo, en los hígados de los ratones Hp se logra apreciar la expresión de Ki 67, especialmente en los que fueron inoculados con el inhibidor control, lo cual era de esperarse debido a que después de la hepatectomía parcial, las células hepáticas se promueve la progresión del ciclo celular pasando de la fase G0 a G1 o S. Como se puede ver en la Figura 19 B, las células positivas se observan alrededor de la región central. En el tejido de hígado de los ratones inoculados con los inhibidores del miR-143-5p y del miR-149-3p se observó una reducción de la expresión de Ki 67, siendo más notoria en los que fueron inoculados con el inhibidor de miR-149-3p.

Lo anterior, sugiere que la inhibición de ambos miRNAs disminuya su nivel de proliferación y probablemente esto afecta el nivel de regeneración inducido por la hepatectomía parcial, lo cual se observa claramente cuando se compara la expresión de Ki 67 de los ratones tratados con el inhibidor control y los tratados con los inhibidores de los miRNAs de interés. Las imágenes obtenidas en los ensayos inmunohistoquímicos se sometieron a un análisis semi-cuantitativo usando el software Image J y el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA y los

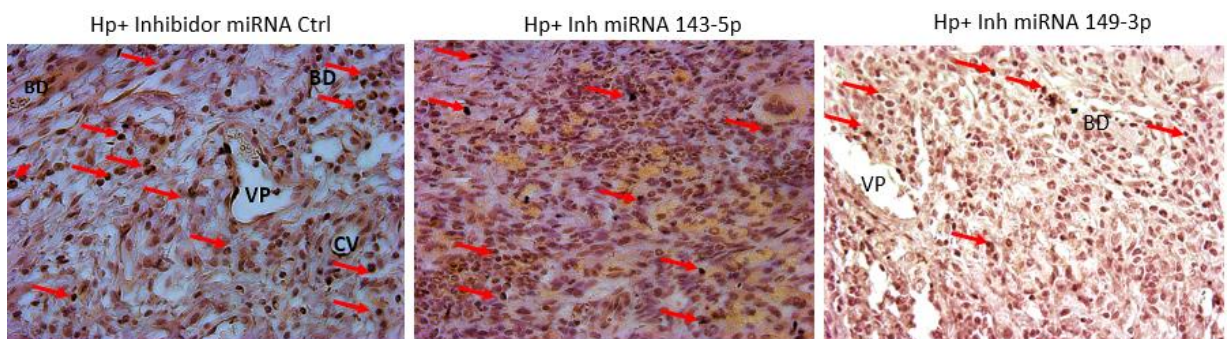
resultados muestran que los hepatocitos positivos para Ki 67 de los ratones Hp tratados con el inhibidor del miR-143-5p disminuyeron un 21.16 % en comparación con los tratados con el inhibidor; por otro lado, en el caso de la inhibición del miR-149-3p las células positivas para Ki 67 disminuyeron un 54.01% en comparación con las tratadas con el inhibidor control (Figura 19 C)

La diferencia entre las células positivas para Ki 67 entre el tratamiento con el inhibidor del miR-143-5p y el miR-149-3p es del 33.84 %, siendo aún menor en el último (Figura 19 C).

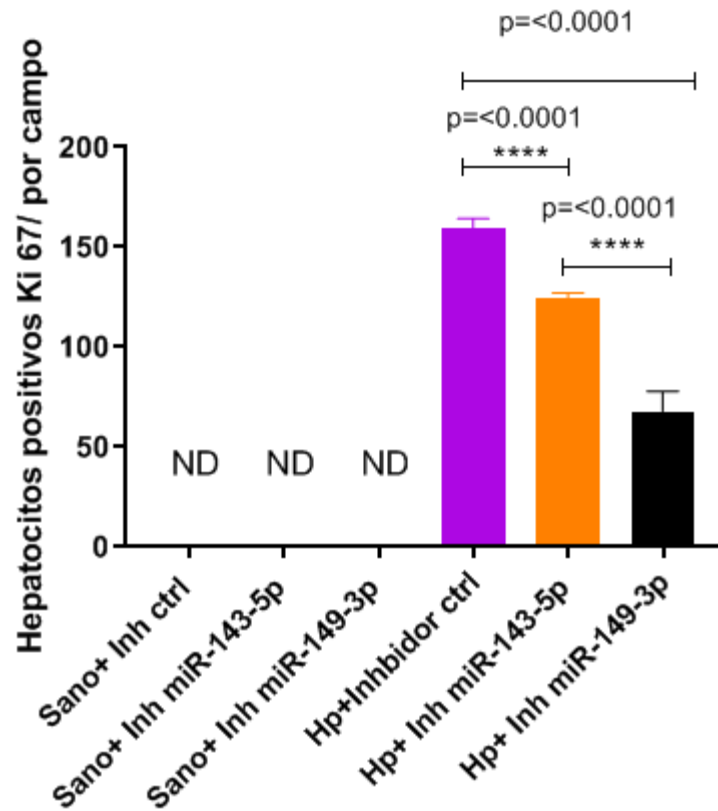
**A)**



**B)**



c)



**Figura 19. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de Ki 67 en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.** Los hígados de ratones sanos (A) y de ratones Hp (B) fueron embebidos en parafina y tratados para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica usando un anticuerpo de ratón anti-Ki 67 y posteriormente con un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Las muestras fueron reveladas con DAB y los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina de Mayer. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia. BD, conducto biliar; VP, vena porta; CV, vena central. La expresión de Ki 67 fue cuantificada con el programa Image J , examinando 3 experimentos independientes y su posterior análisis con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ ; ND, no determinado (C).

## 8.4 Evaluación de la expresión del factor de crecimiento de hepatocitos en hígado de ratones sanos y ratones Hp.

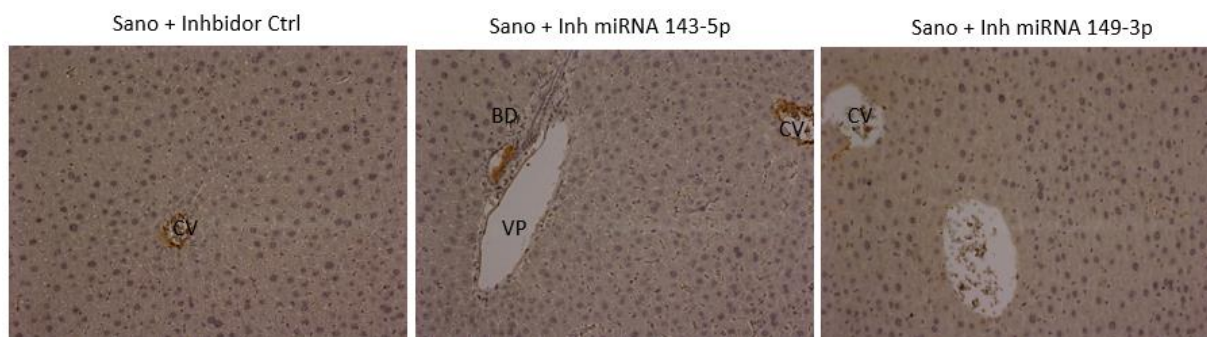
Una de las moléculas que se expresa fuertemente y lleva a cabo un papel muy importante en el proceso de regeneración hepática, es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el cual posee actividad mitogénica sobre las células hepáticas, además de mejorar la supervivencia celular ambas actividades indispensables en la regeneración tisular (Cienfuegos et al., 2014). Así, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para la detección de dicho factor usando un anticuerpo específico para una de las dos subunidades que los componen (HGF  $\alpha$ ). Como se puede observar en la Figura 20 A, en el caso de los hígados de ratones sanos tratados con cualquiera de los inhibidores de no se detectó al HGF  $\alpha$ , lo cual era esperado debido a que en dichos ratones (sanos) las células hepáticas debían encontrarse en estado quiescente.

Por otro lado, en los ratones Hp fue posible la detección de HGF  $\alpha$ , especialmente en los hígados de los ratones que fueron tratados con el inhibidor control, en los que células positivas se observan alrededor de la vena central. En el tejido de hígado de los ratones Hp tratados con el inhibidor de miR-143-5p y miR-149-3p se observó una reducción de la expresión de HGF  $\alpha$  cuando se compara con el nivel de expresión de esta proteína en hígado de los ratones Hp tratados con el inhibidor control, siendo aún pronunciada la disminución en los que fueron tratados con el inhibidor de miR-149-3p (Figura 20 B).

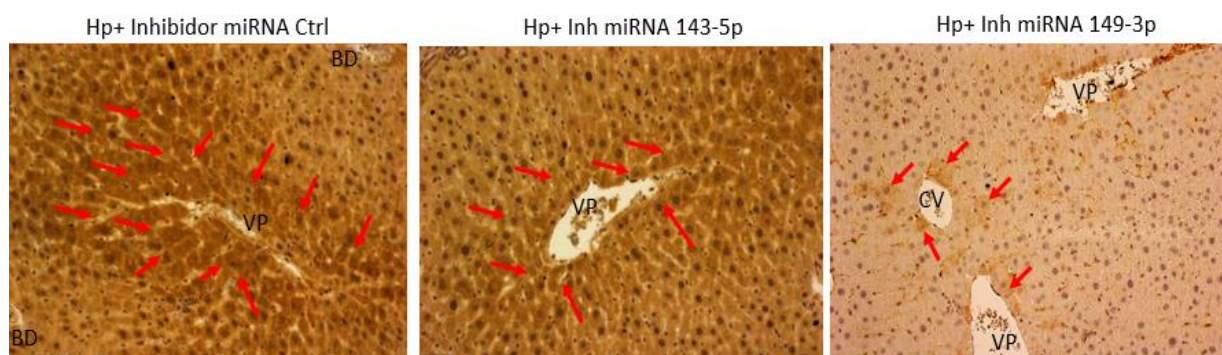
Las imágenes obtenidas en los ensayos de inmunohistoquímica se sometieron a un análisis semi-cuantitativo usando el software Image J y los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA (Figura 20 C). Los resultados muestran que los hepatocitos tratados con el inhibidor del miR-143-5p y positivos para HGF  $\alpha$  disminuyeron un 12.55 % en comparación con los tratados con el inhibidor control. En el caso de los ratones Hp tratados con el inhibidor del miR-149-3p, los hepatocitos positivos para HGF  $\alpha$  disminuyeron un 52.60 % en comparación con los tratados con inhibidor control. Además, la diferencia entre los hepatocitos positivos para HGF  $\alpha$  entre los ratones tratados con el inhibidor del miR-143-5p y el miR-149-3p es del 53.45%

La detección tanto de la molécula marcadora de progresión del ciclo celular como del factor de crecimiento hepático nos confirma el proceso de regeneración hepática en los ratones Hp, siendo los inhibidores de los miRNAs de interés potenciales moduladores negativos del proceso regenerativo, especialmente el inhibidor del miR-149-3p.

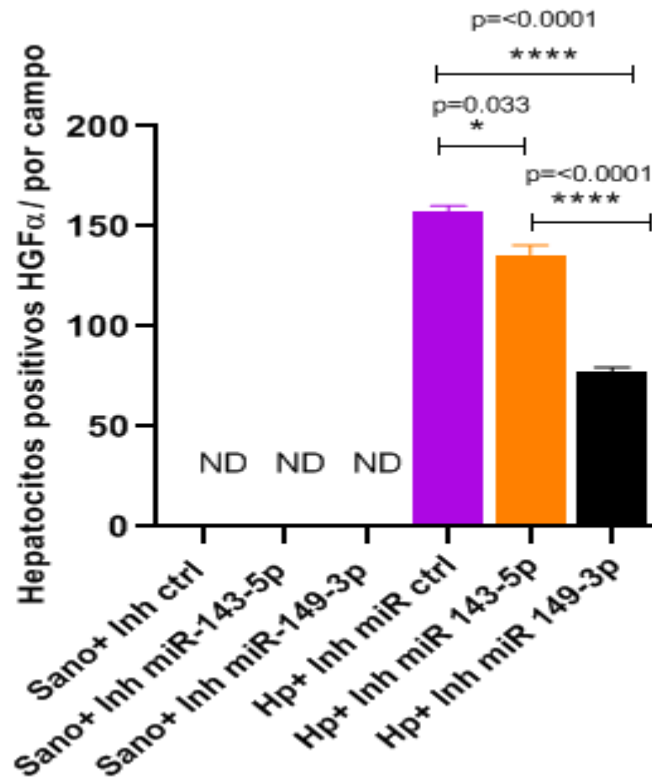
**A)**



**B)**



C)



**Figura 20. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de HGF  $\alpha$  en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.** Los hígados de ratones sanos (A) y de ratones Hp (B) fueron embebidos en parafina y tratados para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica usando un anticuerpo de ratón anti-HGF  $\alpha$  y posteriormente con un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Las muestras fueron reveladas con DAB y los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina de Mayer. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia. BD, conducto biliar; VP, vena porta; CV, vena central. La expresión de HGF $\alpha$  fue cuantificada con el programa Image J, examinado 3 experimentos independientes y su posterior análisis con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró un valor de significancia  $p \leq 0.05$ ; ND, no determinado (C).

## 8.5 Evaluación de la expresión de colágeno tipo 1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp

El colágeno no fibrilar es una de las principales moléculas que se deposita en la matriz extracelular, constituyendo un sostén para los hepatocitos, que contribuye en el mantenimiento de la arquitectura hepática, sin embargo, si la agresión se mantiene, se disminuye la capacidad de regeneración de los hepatocitos y este es sustituido por proteínas como COL1A1 y fibronectina que se depositan de forma desorganizada en la matriz extracelular dando como resultado el hígado fibrótico (Puche et al., 2013). La expresión de COL1A1 está regulada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, y el más potente estímulo para aumentar la producción de COL1A1 conocido es TGF- $\beta$ 1 (Senties et al., 2005).

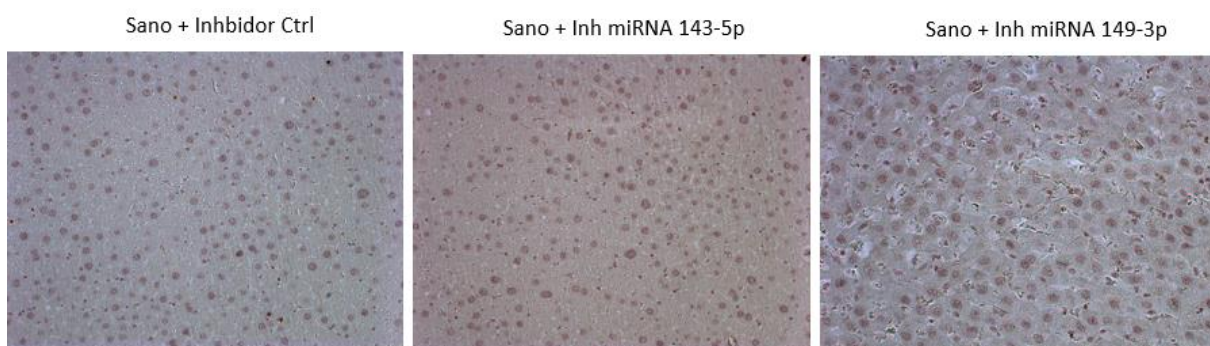
Por todo lo anterior, nos resultó interesante determinar la expresión de este tipo de colágeno en los ratones tratados con los inhibidores de miRNAs debido a los efectos que estas moléculas ejercieron en la expresión del TGF  $\beta$ 1 y que podrían estar afectando el nivel de fibrosis que se presenta en el hígado en esta condición. Para determinar el nivel de expresión de COL1A1 en los hígados de los ratones tratados con los inhibidores de miRNAs se procedió a realizar la localización inmunohistoquímica de esta proteína. En el caso de los hígados de ratones sanos no se detectó COL1A1 en ninguno de los casos (Figura 21 A)

En los hígados de ratones Hp tratados con el inhibidor de miRNA control y el miR-143-5p, el COL1A1 detectado se concentra alrededor de las venas centrales, se extiende a los lados de los hepatocitos siendo menos notoria en estos últimos (Figura 21 B). Por otro lado, en el caso de los ratones Hp tratados con el inhibidor del miR-149-3p la expresión de COL1A1 se encuentra drásticamente disminuida a comparación de lo observado con los tratamientos con el inhibidor control y el del miR-143-5p (Figura 21 B).

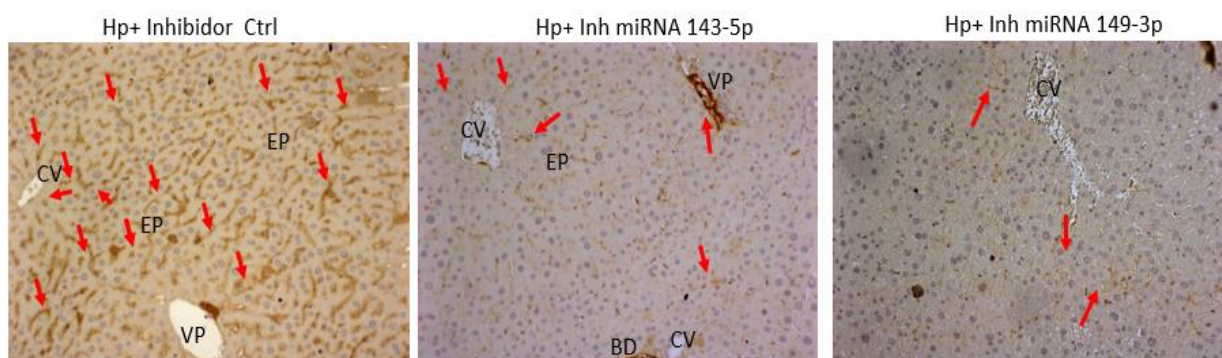
Así como en los casos anteriores, las imágenes obtenidas en los ensayos inmunohistoquímicos se sometieron a un análisis semi-cuantitativo usando el software Image J y se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA. Los resultados muestran que las células positivas para COL1A1

disminuyeron un 25.75 % en los ratones Hp tratados con el inhibidor del miR-143-5p en comparación con los tratados con el inhibidor control; en el caso de los ratones Hp tratados con el inhibidor del miR-149-3p las células positivas a COL1A1 disminuyeron su expresión un 70% en comparación con los ratones tratados con el inhibidor control. Asimismo, la diferencia entre las células positivas para COL1A1 entre los tratamientos con el inhibidor del miR-143-5p y del miR-149-3p fue de 49.25 % (Figura 21 C).

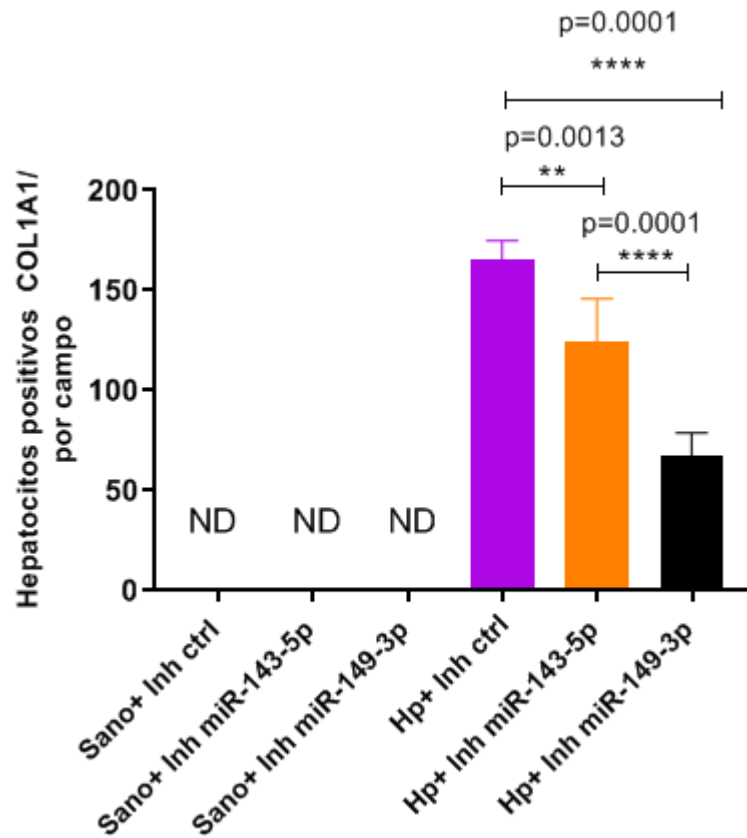
**A)**



**B)**



c)



**Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de COL1A1 en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.** Los hígados de ratones sanos (A) y de ratones Hp (B) fueron embebidos en parafina y tratados para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica usando un anticuerpo de ratón anti- COL1A1 y posteriormente con un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Las muestras fueron reveladas con DAB y los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina de Mayer. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia. BD, conducto biliar; VP, vena porta; CV, vena central. La expresión de COL1A1 fue cuantificada con el programa Image J, examinando 3 experimentos independientes y su posterior análisis con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ ; ND, no determinado (C).

## 8.6 Evaluación de la expresión de GSK-3 $\alpha$ en hígado de ratones sanos y ratones Hp.

Como se mencionó en el apartado de antecedentes, uno de los blancos probados del miR-149-3p en células de melanoma es la proteína GSK-3 $\alpha$ , en donde los mimetizadores de dicho miRNA promueven resistencia a la apoptosis. Por lo tanto, resultó interesante determinar el nivel de expresión de dicha proteína en los hígados de ratones tratados con el inhibidor del miR-149-3p, en donde se esperaba un aumento en la expresión de GSK-3 $\alpha$ . De la misma manera que para las otras moléculas, se llevó a cabo un ensayo de inmunohistoquímica para determinar la expresión de GSK-3 $\alpha$  como se puede observar en la Figura 22 A, en el caso de los ratones sanos podemos observar que se detectó dicha molécula, especialmente alrededor de la vena central, siendo en los hígados de los ratones que recibieron el tratamiento con el miR-149-3p, en donde la expresión de GSK-3 $\alpha$  fue mayor.

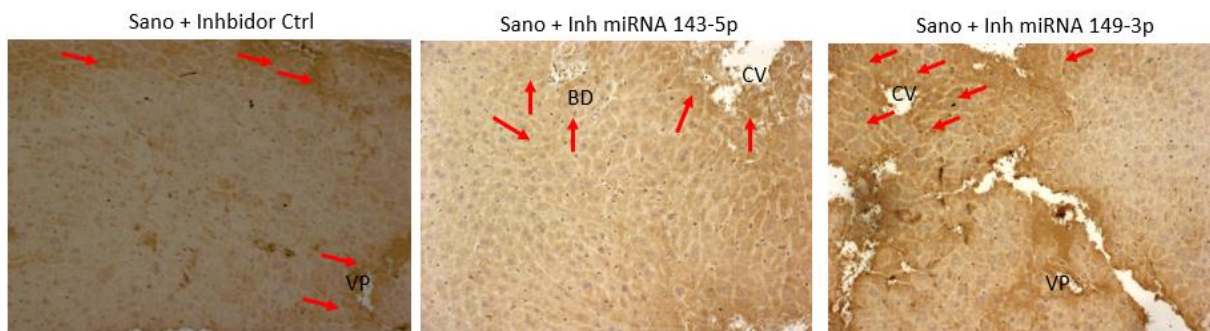
Por otro lado, en el hígado de los ratones Hp tratados con el inhibidor control y del miR-143-5p, la proteína GSK-3 $\alpha$  se concentra en los espacios porta y alrededor de las venas centrales y se extiende a los lados de los hepatocitos siendo menos notoria en los y al igual que en los ratones sanos, en el caso de los ratones Hp el tratamiento con el inhibidor del miR-149-3p, se puede observar una mayor cantidad de células positivas para la proteína GSK-3 $\alpha$  (Figura 22 B).

Las imágenes obtenidas en los ensayos inmunohistoquímicos se sometieron a un análisis semi-cuantitativo usando el software Image J y se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA. Los resultados muestran que las células positivas para GSK-3 $\alpha$  en el grupo de los ratones sanos aumentaron más de 3 veces en los que fueron tratados con el miR-143-5p y el miR-149-3p en comparación con el inhibidor control (Figura 22 C).

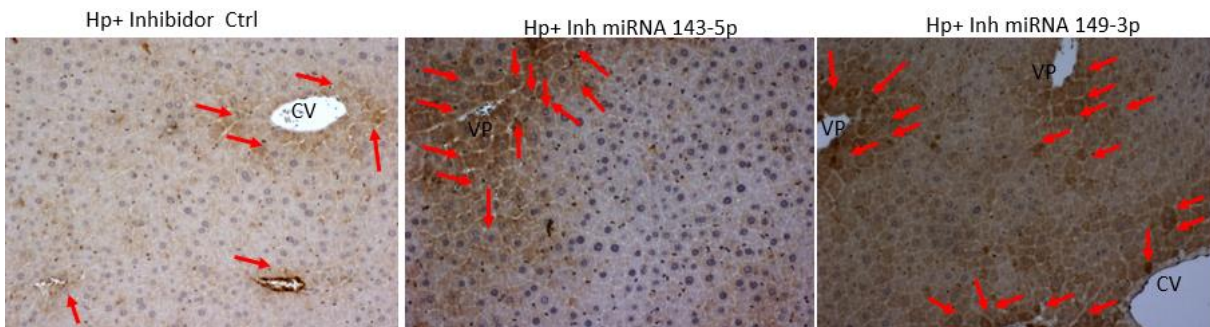
En el grupo de los ratones Hp, las células positivas para GSK-3 $\alpha$  se vieron aumentadas únicamente 48.51 % en los ratones que fueron tratados con el miR-143-5p con respecto a los tratados con el inhibidor control, sin ser estadísticamente significativo. Sin embargo, en el caso de las células positivas para GSK-3 $\alpha$  en los ratones tratados con el miR-149-3p con respecto al tratamiento con el inhibidor control fue un aumento

estadísticamente significativo de 86.46 %. La diferencia entre las células positivas para GSK-3 $\alpha$  entre los ratones Hp que fueron tratados con el inhibidor del miR-143-5p y del miR-149-3p fue del 42.68% (Figura 22 C)

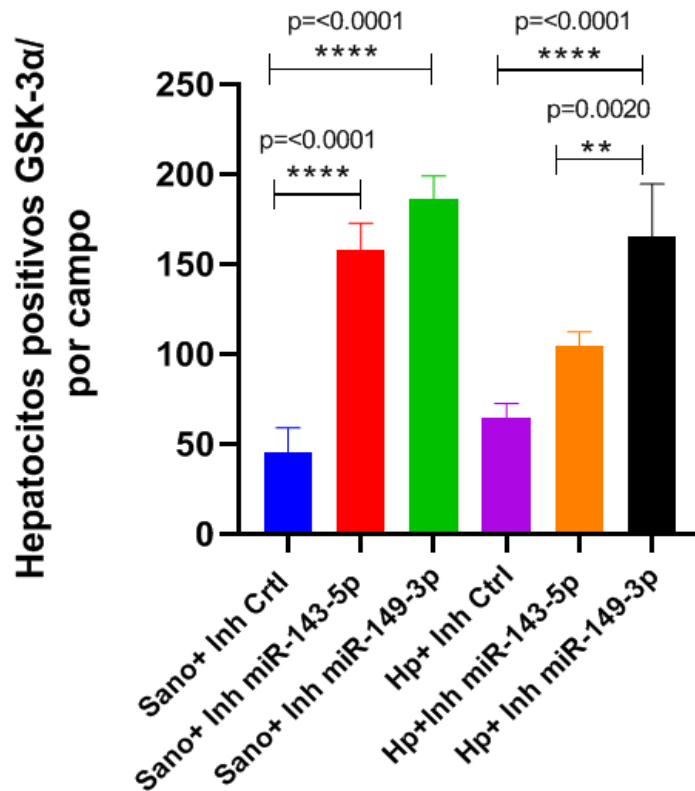
**A)**



**B)**



c)

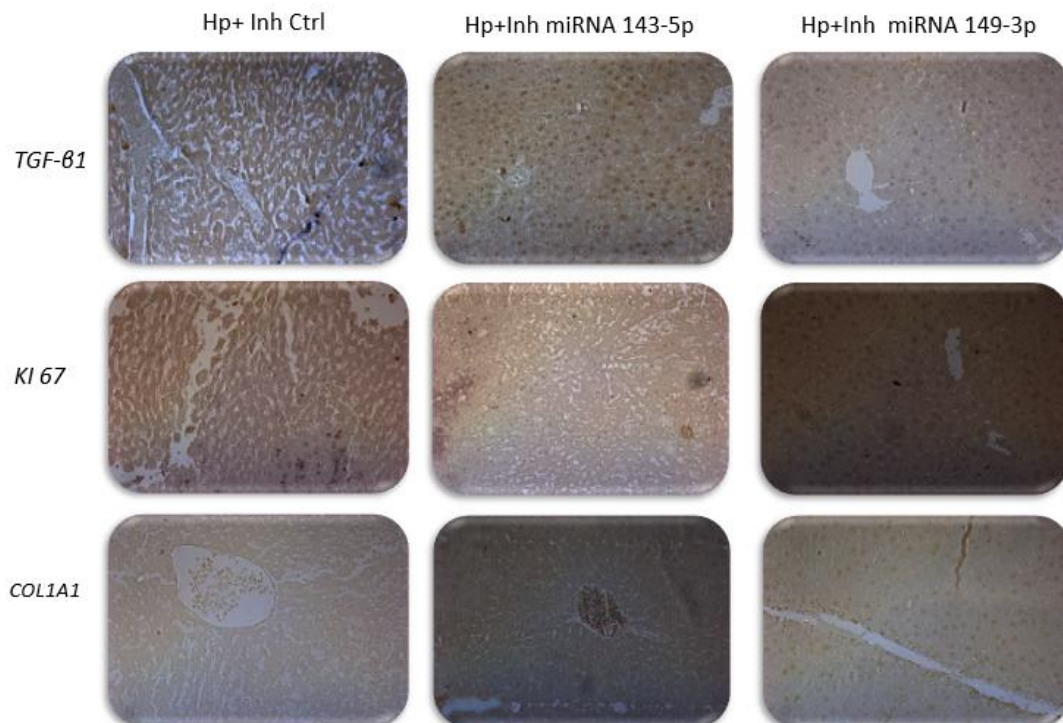


**Figura 22. Análisis in inmunohistoquímico de la expresión de GSK-3 $\alpha$  en hígado de ratones sanos y ratones Hp inoculados con los inhibidores de miRNAs.** Los hígados de ratones sanos (A) y de ratones Hp (B) fueron embebidos en parafina y tratados para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica usando un anticuerpo de ratón anti- GSK-3 $\alpha$  y posteriormente con un anticuerpo anti-raton acoplado a peroxidasa de rábano. Las muestras fueron reveladas con DAB y los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina de Mayer. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia. BD, conducto biliar; VP, vena porta; CV, vena central. La expresión de GSK-3 $\alpha$  fue cuantificada con el programa Image J, examinando 3 experimentos independientes y su posterior análisis con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ ; ND, no determinado (C).

## 8.7 Observación de estructuras propias de la regeneración hepática en ratones Hp

El proceso de regeneración hepática promueve la formación de estructuras como la redistribución de las sinusoides hepáticas, los cuales son capilares que se disponen entre las láminas de hepatocitos y confluyen desde los lobulillos, las ramas de la arteria hepática y de la vena porta. Como aporte adicional a los objetivos se buscó la formación de dichas estructuras propias de la regeneración hepática en los cortes de tejido de los ratones tratados.

Como se puede observar en los hígados de los ratones Hp tratados con el inhibidor control es muy clara la exacerbación de las estructuras sinusoidales, que se pueden observar como estrías en el tejido (Figura 23).



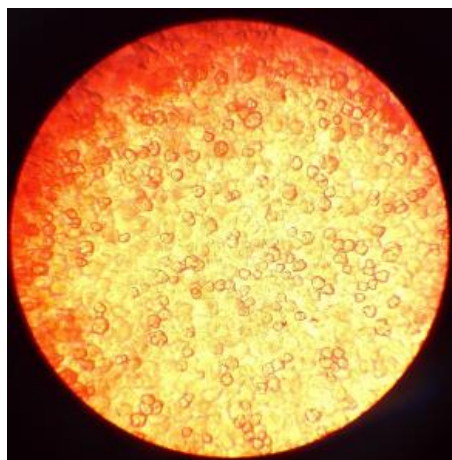
**Figura 23. Análisis de la redistribución sinusoidal en hígado de ratones Hp tratados con inhibidores de miRNA.** Los hígados de ratones Hp fueron embebidos en parafina y tratados para llevar a cabo ensayos de inmunohistoquímica para la detección de TGF-β1, Ki 67 COL1A1. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 20X en el microscopio de epifluorescencia. Las imágenes y los resultados son representativas de tres experimentos independientes.

Sin embargo, en el caso de los ratones Hp tratados con los inhibidores del miR-143-5p y del miR-149-3p, los cortes del tejido hepático observado mostraron una limitación importante de dichas estructuras, especialmente en las inoculadas con el inhibidor del miR-149-3p (Figura 23). Lo anterior corrobora lo observado a nivel molecular, haciendo patente la probable inhibición de la expresión de moléculas y estructuras características propias de la regeneración hepática, lo cual podría sugerir que los inhibidores de los miRNAs de interés tienen la capacidad de inhibir dicho proceso y de manera especial el inhibidor del miR-149-3p.

### 8.8 Análisis de la expresión de moléculas implicadas en la regeneración hepática en cultivos primarios de hepatocitos de ratón tratados con inhibidores y mimetizadores del miR-149-3p.

Los resultados obtenidos en el modelo murino sugerían que el miR-149-3p tiene un papel en la modulación del proceso de regeneración hepática, así, para corroborar los datos obtenidos se realizaron los experimentos de inhibición y mimetismo de dicho miRNA en cultivos primarios de hepatocitos de ratón. Los hígados de ratones BALB/c machos se usaron para obtener los hepatocitos, los cuales después de 24 h de incubación se adhirieron a la placa de cultivo formando la monocapa (Figura 24).

A)

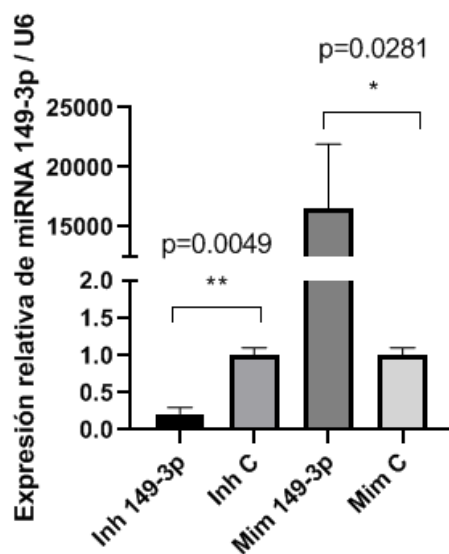


B)



**Figura 24. Cultivo primario de hepatocitos de ratón.** Los cultivos primarios de hepatocitos de ratón fueron obtenidos a partir del hígado de ratones BALB/c machos y  $1 \times 10^6$  células se sembraron en placas de 12 pozos en medio de mantenimiento M199 (A) y a las 24 h de incubación se observó la monocapa formada (B). Imágenes representativas de tres experimentos independientes en microscopio invertido en el objetivo 20X.

Después de haber establecido las condiciones de cultivo de los hepatocitos de ratón se procedió a realizar el tratamiento de dichas células con los inhibidores y mimetizadores del miR-149-3p. A las 24 h postransfección se determinó el nivel de expresión del miR-149-3p mediante RT-PCR en tiempo real usando extractos de RNA total y como se puede observar en la Figura 25, la transfección de los inhibidores del miR-149-3p disminuyó la expresión de dicha molécula en 78.54 % cuando se compara con el inhibidor control. Por el contrario, la sobre expresión del miRNA, en las células tratadas con el mimetizador de éste, aumenta en 83.43 % con respecto al tratamiento con el mimetizador control. El análisis de expresión del miRNA se llevó a cabo usando el método de  $2(-\Delta\Delta Ct)$  y la expresión del RNA de U6 como control de normalización. Así, los resultados nos indican que los experimentos de inhibición y mimetismo efectivamente disminuyen y aumentan el miR-149-3p respectivamente.



**Figura 25. Expresión relativa del miR-149-3p en cultivos primarios de hepatocitos de ratón transfectados con inhibidores e inhibidores del miRNA.** Los cultivos primarios de hepatocitos fueron transfectados con 10 nm de los inhibidores del miR-149-3p (Inh149-3p) y de los mimetizadores del miR-149-3p (Mim 149-3p) así como sus controles, inhibidor control (Inh C) y mimetizador control (Mim C); después de 24 h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar un cDNA para después utilizar una sonda TaqMan específica para la amplificación del miR 149-3p. El nivel de expresión relativa se calculó con el método  $2(-\Delta\Delta Ct)$  usando al RNA pequeño U6 como normalizador. Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de t en la que se consideró un valor de significancia de  $p \leq 0.05$ .

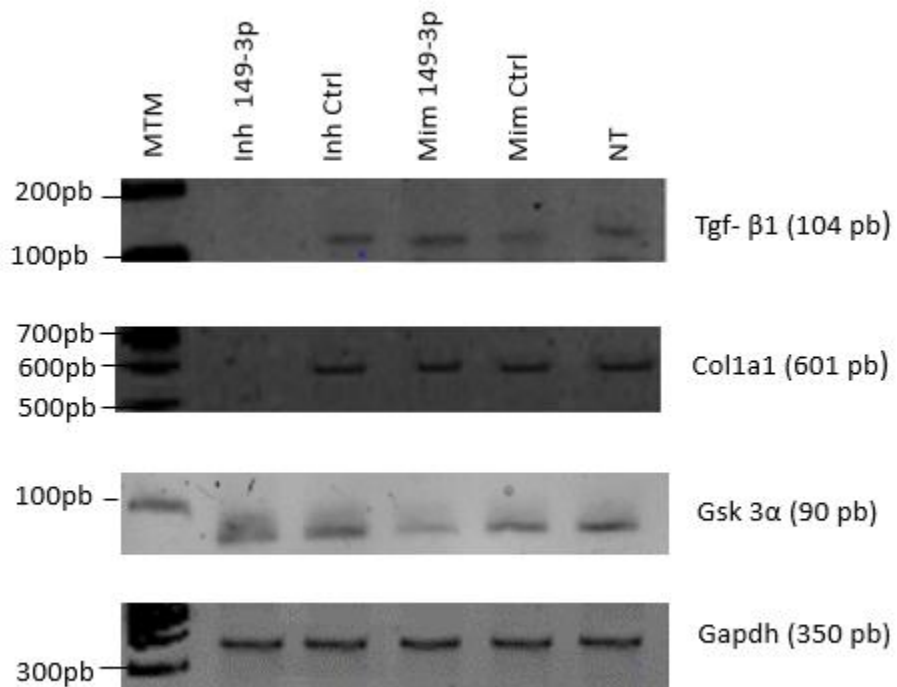
## 8.9 Determinación del nivel de expresión del RNAm de $\text{tgf-}\beta\text{1}$ , $\text{gsk-3}\alpha$ y $\text{col1a1}$ en cultivos primarios de hepatocitos de ratón tratados con mimetizadores e inhibidores del miR-149-3p.

Después de estandarizar las condiciones de aislamiento y cultivo de los hepatocitos de ratón, además de la inhibición y sobreexpresión del miR-149-3p, se procedió a determinar el nivel de expresión de los RNAm correspondientes a las moléculas detectadas mediante inmunohistoquímica. Así, después de 24 h de la transfección se obtuvieron los RNAs totales de las células tratadas con los inhibidores y mimetizadores del miRNA y se llevaron a cabo los ensayos de RT-PCR usando los iniciadores específicos para los RNAm de  $\text{tgf-}\beta\text{1}$ ,  $\text{gsk-3}\alpha$  y  $\text{col1a1}$  y GAPDH como control de expresión constitutiva.

Como se puede observar en la Figura 26, los niveles del RNAm de  $\text{tgf } \beta\text{1}$  disminuyeron en presencia del inhibidor del miRNA, cuando se compara con el tratamiento con el inhibidor control y, por el contrario, en presencia del mimetizador del miR-149-3p se observa un aumento en la expresión del RNAm de dicho factor de crecimiento con respecto al mimetizador control. En el caso del RNAm de  $\text{col1a1}$  se observó la misma tendencia en el caso del inhibidor del miRNA, sin embargo, en el caso del tratamiento con el mimetizador no se observó diferencia en expresión. Los resultados obtenidos con los inhibidores del miR-149-3p en hepatocitos primarios concuerdan con los niveles de expresión de las proteínas para las cuales codifican dichos mensajeros en los ensayos en el modelo de ratón Hp.

Por otro lado, la expresión del RNAm de  $\text{gsk-3}\alpha$  aumenta en presencia del inhibidor y disminuye en presencia del mimetizador del miR-149-3p con respecto a sus controles, lo cual se esperaba por tratarse de un blanco de dicho miRNA en células de melanoma.

Los resultados obtenidos nos sugieren que es posible observar la misma tendencia “*in vitro*” e “*in vivo*” con respecto a la expresión de las moléculas características de la regeneración hepática monitoreadas en este trabajo.



**Figura 26. Expresión de RNAm de  $\text{tgf-}\beta\text{1}$ ,  $\text{col1a1}$  y  $\text{gsk-3}\alpha$  en cultivos primarios de hepatocitos ratón transfectados con inhibidores y mimetizadores del miR-149-3p.** Los cultivos primarios de hepatocitos fueron transfectados con 10 nm de los inhibidores del miR- 149-3p (Inh 149-3p) y de los mimetizadores del miR-149-3p (Mim 149-3p) así como sus respectivos controles, inhibidor control (Inh C) y mimetizador control (Mim C); después de 24 h se extrajo el RNA total, el cual se utilizó para realizar un cDNA con hexámeros al azar para después utilizar los iniciadores específicos en la amplificación de los RNAm de  $\text{tgf-}\beta\text{1}$ ,  $\text{col1a1}$  y  $\text{gsk-3}\alpha$ . El nivel de expresión del RNAm de GAPDH se usó como gen de expresión constitutiva. A la derecha se señalan los marcadores de tamaño molecular (MTM) y a la izquierda entre paréntesis se indica el tamaño del amplicón.

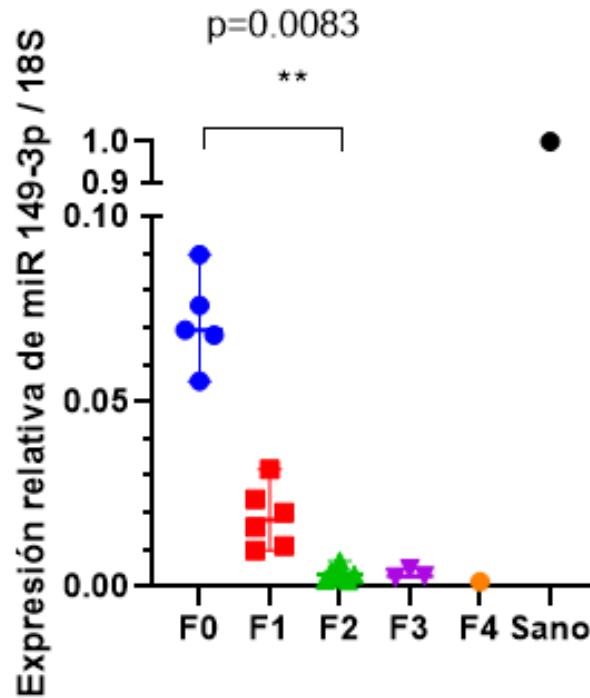
## 8.10 Determinación del nivel de expresión del miR-149-3p en sueros de pacientes con hígado graso no alcohólico.

La patología hepática conocida como hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una entidad clínica que comprende un amplio espectro de enfermedades hepáticas asociadas con diversos grados de fibrosis hepática. Como un aporte adicional a los objetivos planteados se llevó a cabo un ensayo piloto en el que se buscó determinar el nivel del miR-149-3p en el suero de pacientes con diversos grados de NAFLD que a su vez correlaciona con el nivel de fibrosis (Tabla 1). Como se observó en los resultados anteriores, la modulación del miR-149-3p trae consigo la modulación negativa de una COL1A1, que es una de las principales moléculas de matriz extracelular implicada en la fibrosis hepática.

Así, se obtuvo el RNA total de los sueros de pacientes con NAFLD y se cuantificó la expresión del miR-149-3p mediante una RT-PCR en tiempo real usando una sonda TaqMan específica para éste y como control de normalización se determinó la expresión del RNA 18s.

Como se puede observar en la Figura 27, la expresión de miR-149-3p disminuye drásticamente en los sueros de pacientes con NAFLD en general, con respecto al control sano. Además, también se observó que existen diferencias significativas cuando se comparan el nivel del miRNA entre los diferentes estadios de fibrosis, específicamente entre F0 y F2, en ésta última el nivel de expresión disminuye en 88.5% con respecto a F0. Sin embargo, es importante mencionar que se observó una disminución importante en la expresión del miRNA entre F0 y F1 y entre F0 y F4, aunque al hacer el análisis estadístico de la expresión no resultó estadísticamente significativo, probablemente a que el valor de N en dichos grupos de pacientes es muy pequeño.

Por lo tanto, se puede sugerir una relación inversa entre el grado de NAFLD y la disminución en la expresión del miR-149-3p, estímulo anti-fibrótico. Lo anterior podría tratarse de una respuesta del organismo para disminuir, mediante este mecanismo postraducciona, la expresión de moléculas de matriz extracelular evitando exacerbar el grado de fibrosis en el hígado y así empeorar la función hepática.



**Figura 27. Expresión relativa del miR-149-3p en sueros de pacientes con diferentes grados de NALFD.** Los sueros de pacientes con los 4 diferentes grados de NALFD fueron procesados para la extracción de RNA total, el cual se utilizó para sintetizar cDNA y después amplificar el miR-149-3p con una sonda TaqMan específica para éste. El nivel de expresión relativa se calculó con el  $2(-\Delta\Delta Ct)$  usando al RNA 18S como normalizador. Los resultados de dos experimentos independientes se analizaron con el programa GraphPad Prism 8 usando la prueba de ANOVA en la que se consideró un valor de significancia estadística de  $p \leq 0.05$ .

## IX. DISCUSIÓN

Las funciones de los miRNAs han sido estudiadas usando diferentes estrategias empleando principalmente metodologías que se desarrollan *in vitro* y en diversos casos se han podido además llevar a cabo estudios *in vivo* para corroborar las funciones y los efectos de la modulación de dichos RNAs pequeños en modelos animales.

El presente trabajo se centró en el análisis del efecto de la inhibición de dos miRNAs en la expresión de TGF- $\beta$  y regeneración del tejido hepático utilizando un modelo murino. Así, en nuestro grupo de trabajo se establecieron las condiciones para el desarrollo de un modelo de regeneración hepática mediante hepatectomía parcial. Este modelo se describió por primera vez por Higgins y Anderson hace más de 80 años y se trata de un procedimiento quirúrgico en el que se retiran dos tercios del hígado de roedores (Taub et al., 2004). Sin embargo, en la actualidad esta técnica se utiliza frecuentemente, ya que permite el análisis de las vías de señalización involucradas en la regeneración hepática y la hepatocarcinogénesis con la finalidad de restablecer la estructura y función de este órgano. Después del establecimiento de dicho modelo murino se llevaron a cabo los ensayos de inmunohistoquímica en los tejidos hepáticos provenientes de los ratones en los que se inhibió la expresión del miR-143-5p y el miR-149-3p (Figura 16 y 17).

Los resultados obtenidos en el modelo murino permitieron determinar que la inhibición de ambos miRNAs, especialmente en el caso del miR-149-3p, correlaciona con una disminución significativa de la expresión de TGF- $\beta$ 1, HGF  $\alpha$ , Ki 67, COL1A1 en los ratones Hp a diferencia de lo ocurrido en ratones sanos, en los que no se observó ningún cambio en la expresión de dichas moléculas (Figuras 18, 19, 20 y 21). Es importante recalcar que en el caso de la detección de la proteína GSK-3 $\alpha$ , (Figura 22) se encontró un aumento significativo en ambos grupos de ratones, sanos y Hp, lo cual se podría esperar debido a que ésta es una molécula blanco de la actividad moduladora de expresión genética de dicho miRNA probado previamente en células de melanoma (Jin et al., 2011).

Los resultados obtenidos con el inhibidor del miR-143-5p fueron de cierta manera inesperados puesto que en la línea celular de hepatoma humano, el tratamiento con

el TGF- $\beta$ 1 promueve un aumento significativo de este miRNA. (Yocupicio-Monroy, M en preparación)

Por lo anterior, lo que esperábamos obtener al inhibir el miR-143-5p era que se modularan negativamente los efectos descritos para el TGF- $\beta$ 1 en la regeneración hepática, pues lo considerábamos un modulador positivo o mediador de las actividades biológicas de esta citocina. Así, el efecto de la inhibición de dicho RNA pequeño debería haber aumentado los marcadores de proliferación el hígado de los ratones Hp, pero lo que sucedió fue un efecto anti-proliferativo, que se pudo apreciar por la disminución de las estructuras propias de la regeneración y de las moléculas HGF  $\alpha$  y Ki 67 (Figuras 19 y 20). Por otro lado, acorde con lo esperado, la inhibición de dicho miRNA correlaciona con la inhibición de la actividad pro-fibrótica (expresión de COL1A1) al igual que con la disminución en la expresión de la propia citocina de TGF- $\beta$ 1. Lo anterior sugiere que la disminución del miR-143-5p promueve la actividad anti-proliferativa y anti-fibrótica en el tejido hepático.

Existen diversos reportes en los que se ha visto que la modulación de la expresión de miRNAs inhiben la actividad proliferativa y la migración, un ejemplo de esto es el miR-21, en donde la baja expresión de este miRNA tiene función inhibidora de la proliferación, ya que después de una hepatectomía parcial hay una inducción de este miRNA ocurriendo la inhibición directa de Btg2, el cual es un inhibidor del ciclo celular, que impide la activación de FoxM1 (esencial para la síntesis de DNA en hepatocitos) (Song et al., 2011).

En líneas celulares de hepatocarcinoma, la modulación negativa del miR-199a suprime la proliferación tumoral, induciendo apoptosis y provocando la detención del ciclo celular mediante la regulación de la expresión de MMP-9, una metaloproteinasa de matriz conocida también como colágena tipo IV, FZD7 (receptor de tipo 7) y HIF1 (factor inducible por hipoxia) (Song et al., 2014).

Se ha visto también que el aumento del miR-122 inhibe la proliferación y migración promoviendo la muerte de hepatocitos en líneas celulares de hepatocarcinoma, así como en ratones (Nakao et al., 2014).

La inhibición del miR-214-5p aumenta la expresión de genes como son colágeno, específicamente COL4A1, COL1A1 y la viabilidad celular en las células osteoblásticas disminuye la apoptosis.

En otro estudio se ha demostrado que cuando el miR-29 se encuentra regulado positivamente puede reducir la fibrosis hepática en ratones inducida por tetracloruro de carbono (Roderburg et al., 2011).

Por otro lado, los antecedentes del presente trabajo nos indicaban que el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 en la línea celular Huh7 promovía una disminución significativa del miR-149-3p, por lo cual esperaríamos que la inhibición de este miRNA acentuara los efectos descritos para la citocina en el tejido hepático. Como se pudo observar en los resultados, la inhibición del miR-149-3p correlacionó con una fuerte disminución en los marcadores de proliferación por lo que se sugiere un marcado efecto anti-proliferativo ocasionado por la inhibición de este miRNA, lo cual era concordante con lo esperado. Sin embargo, dicho tratamiento, tuvo un efecto contrario al esperado con respecto a la fibrosis, ya que se presentó un dramático efecto anti-fibrótico (expresión de COL1A1). Así mismo, se esperaba un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1, como se observaría en un típico circuito de retroalimentación positiva, no obstante, sucedió lo contrario.

Lo anterior, nos indica que la inhibición del miR-149-3p, como un factor de respuesta a TGF- $\beta$ 1, podría estar actuando en un complejo mecanismo de modulación de la regeneración hepática que promueve un circuito de retroalimentación negativa con respecto a la expresión de TGF- $\beta$ 1 y la generación de fibrosis y una retroalimentación positiva para los efectos anti-proliferativos ocasionados por el TGF- $\beta$ 1.

Es importante mencionar que debe haber un control en la expresión del TGF- $\beta$ 1 en la regeneración hepática ya que si no es controlado se puede provocar la sobreexpresión de moléculas blanco como colágeno, TIMPs y PAI-1 contribuyendo de esta manera al establecimiento y avance de la fibrosis hepática (Senties-Gómez et al., 2005).

En este sentido se ha descrito que el miR-26a, promovido por el TGF- $\beta$ 1 u otro factor de crecimiento, puede participar regulando negativamente la vía desencadenada por éste. Así en varios estudios se ha demostrado que los miembros de la familia miR-26a podrían suprimir la tumorigénesis en las células de cáncer de hígado y las células de linfoma B, así mismo, se encontró que la expresión de miR-26a se encontraba disminuida significativamente después del 70% de hepatectomía parcial (Chen, et al., 2015).

En el presente trabajo también se pudo determinar que el miR-149-3p podría modular directamente la expresión de GSK-3 $\alpha$  en tejido hepático *in vivo*, lo cual ya había sido señalado para células de melanoma (Lei Jin et al., 2011). Se ha visto que GSK-3 $\alpha$  podría llevar a cabo funciones en la regulación de la transición epitelio-mesénquima reprimiéndola e inhibiendo los procesos proliferativos de las células epiteliales (Oh et al., 2018), lo cual tendría relevancia en la regeneración tisular o hepática al darse una inhibición natural del miR-149-3p por efecto del TGF- $\beta$ 1 expresado tras la hepatectomía. De esta manera los hepatocitos podrían regenerarse evitando el proceso de transición epitelio-mesénquima el cual se ha relacionado fuertemente con la resistencia a la apoptosis así como el aumento de componentes de la matriz extracelular después de una hepatectomía parcial (Oh et al., 2018).

Los ensayos realizados en cultivo primario de hepatocitos de ratón, además de corroborar algunos de los resultados obtenidos con el tratamiento de inhibición del miR-149-3p, nos permitieron determinar que el aumento en la expresión de dicho miRNA aumenta la expresión del RNAm del TGF- $\beta$ 1, y una disminución en el RNAm de GSK-3 $\alpha$  (Figura 26). Sin embargo, en el caso del RNAm de Cola1a1 no se observó una diferencia significativa en la expresión de este RNAm cuando se compara con la transfección del mimetizador control.

Los resultados obtenidos nos indican interesantemente que es posible que el mimetismo del miR-149-3p *in vivo* promueva un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1, lo cual podría traer consigo cambios importantes en el proceso de regeneración hepática como podría ser un aumento en los marcadores inflamatorios en el tejido y un fuerte efecto anti-proliferativo pero al parecer este comportamiento podría darse sin la exacerbación del efecto pro-fibrótico, lo cual sería muy deseable para evitar pérdida de la arquitectura y función del tejido hepático.

El aumento en la expresión del TGF- $\beta$ 1 se ha visto aumentado en el mimetismo de miR-223 durante la lesión hepática aguda en un modelo murino, la expresión elevada de este miRNA también se reflejó en niveles séricos durante la lesión hepática aguda sin embargo, no se observaron diferencias en la apoptosis de células hepáticas, siendo este un marcador prometedor para el diagnóstico de daño hepático en suero (Schueller et al., 2017).

Después de determinar que la modulación de la expresión del miR-149-3p puede estar involucrada en los procesos en los que el hígado requiere regenerarse, se consideró determinar si existían diferencias en la expresión del miR-149-3p en un grupo de pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), en la cual se ha determinado que existe un aumento en la expresión de genes relacionados con la reparación/regeneración hepática (COL1A2, COL3A1, COL4A1, LUM, FBN1, DKK3) (Wanna, et al., 2014).

La expresión del miR-149-3p se encontró disminuida en los sueros de pacientes que tienen la enfermedad en comparación con un control sano, y al parecer la disminución es más grande entre más severo es el grado de NAFLD (Figura 27). Por lo tanto, a menor expresión del miRNA en los sueros de pacientes con mayor grado de fibrosis o daño en el hígado lo cual es evidenciada por parámetros por la degeneración globular (ballooning) en el tejido hepático correspondiente.

En este contexto existen diversos miRNAs que han sido propuestos como marcadores de daño hepático y específicamente en NAFLD. En un estudio reciente se identificaron diversos miRNAs en muestras de hígado de pacientes con NAFLD que están aumentados como son el miR-31, miR-33a, miR-34a, miR-144, miR-146b, miR-150, miR-182, miR-183, miR-200a, miR-224 y miR-301a y los que se encontraron disminuidos son el miR-17, miR-122, miR-296, miR-373, miR-375 y miR-378c (Torres et al., 2018). Los cambios en el nivel del miR-149-3p en los pacientes con NAFLD son muy interesantes y abren una serie de interrogantes adicionales en el estudio del efecto y las funciones que podría desempeñar este miRNA en la regeneración del hígado, además de la posibilidad de utilizar dicho miRNA como un biomarcador para el diagnóstico y estratificación de la severidad de la NAFLD.

Por todo lo anteriormente expuesto, la modulación del miR-149-3p podría tener un papel importante en la regulación del proceso de regeneración en el hígado y probablemente en algunos otros tejidos. Así, nuestro grupo de trabajo considera de suma relevancia llevar a cabo los estudios de mimetismo del miRNA *in vivo* y determinar su efecto en la regeneración del hígado, además de estudiar a más profundidad las vías en las cuales incide dicha modulación.

## X. CONCLUSIONES

- La inhibición del miR-143-5p y el miR-149-3p tiene un efecto regulador de la regeneración hepática, especialmente este último, el cual produjo una fuerte modulación en los marcadores de regeneración y de fibrosis, así como en la propia expresión del TGF- $\beta$ 1.
- Lo anterior nos permite postular a este miRNA como un potencial modulador de los efectos del TGF- $\beta$  en el hígado tanto para su aplicación en regeneración como en cáncer, además de que podría ser usado como un biomarcador para patologías hepáticas como la NAFLD.

## XI. REFERENCIAS

1. A-Cienfuegos, J., Rotellar, F., Baixauli, J., Martínez Regueira, F., Pardo José Luis Hernández Lizoáin, F., & Regueira, M. F. (2014). Regeneración hepática; el secreto mejor guardado. Una forma de respuesta al daño tisular
2. Böhm, F., Köhler, U. A., Speicher, T., & Werner, S. (2010). Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Molecular Medicine*, *2*(8), 294–305. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000085>
3. Caja, L., Dituri, F., Mancarella, S., Caballero-Diaz, D., Moustakas, A., Giannelli, G., & Fabregat, I. (2018). TGF- $\beta$  and the tissue microenvironment: Relevance in fibrosis and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051294>
4. Chauhan, A., Lorenzen, S., Herzel, H., & Bernard, S. (2011). Regulation of mammalian cell cycle progression in the regenerating liver. *Journal of Theoretical Biology*, *283*(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.05.026>
5. Chen, X., Murad, M., Cui, Y. Y., Yao, L. J., Venugopal, S. K., Dawson, K., & Wu, J. (2011). MiRNA regulation of liver growth after 50% partial hepatectomy and small size grafts in rats. *Transplantation*, *91*(3), 293–299. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318204756c>
6. Chivukula, R. R., Shi, G., Acharya, A., Mills, E. W., Zeitels, L. R., Anandam, J. L., ... Mendell, J. T. (2014). An essential mesenchymal function for miR-143/145 in intestinal epithelial regeneration. *Cell*, *157*(5), 1104–1116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.055>
7. Corpechot, C., Barbu, V., Wendum, D., Chignard, N., Housset, C., Poupon, R., & Rosmorduc, O. (2011). Hepatocyte Growth Factor and c-Met Inhibition by Hepatic Cell Hypoxia. *The American Journal of Pathology*, *160*(2), 613–620. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64881-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64881-x)
8. Conn, J. R., Catchpoole, E. M., Runnegar, N., Mapp, S. J., & Markey, K. A. (2017). Low rates of antibiotic resistance and infectious mortality in a cohort of high-risk hematology patients: A single center, retrospective analysis of blood stream infection. *PLOS ONE*, *12*(5),

e0178059.doi:10.1371/journal.pone.0178059

9. Ding, H., Zheng, S., Garcia-ruiz, D., Hou, D., Wei, Z., Liao, Z., ... Jiang, X. (2016). Ding, H., Zheng, S., Garcia-Ruiz, D., Hou, D., Wei, Z., Liao, Z., ... Jiang, X. (2016). Fasting induces a subcutaneous-to-visceral fat switch mediated by microRNA-149-3p and suppression of PRDM16. *Nature Communications*, 7, 11533. doi:10.1038/ncomms11533
10. Ding, W., Xin, J., Jiang, L., Zhou, Q., Wu, T., Shi, D., ... Li, J. (2015). Characterisation of peripheral blood mononuclear cell microRNA in hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. *Scientific Reports*, 5(January). <https://doi.org/10.1038/srep13098>
11. Fabregat, I., Moreno-Càceres, J., Sánchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., & ten Dijke, P. (2016). TGF- $\beta$  signalling and liver disease. *FEBS Journal*, 2219–2232. <https://doi.org/10.1111/febs.13665>
12. Fan, S., Li, H., Cui, G., Kong, X., Sun, L., Zhao, Y., ... Zhou, J. (2015). Fan, S., Li, H., Cui, G., Kong, X., Sun, L., Zhao, Y., ... Zhou, J. (2016). miRNA-149\* promotes cell proliferation and suppresses apoptosis by mediating JunB in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*, 41, 62–70. doi:10.1016/j.leukres.2015.11.016 .
13. Gordillo, M., Evans, T., & Gouon-Evans, V. (2015). Orchestrating liver development. *Development*, 142(12), 2094–2108. <https://doi.org/10.1242/dev.114215>
14. Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
15. Hata, A., & Chen, Y. G. (2016). TGF- $\beta$  signaling from receptors to smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022061>
16. He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
17. He, M., Zhan, M., Chen, W., Xu, S., Long, M., Shen, H., ... Wang, J. (2017). MiR-143-5p Deficiency Triggers EMT and Metastasis by Targeting HIF-1 $\alpha$  in

- Gallbladder Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 42(5), 2078–2092. <https://doi.org/10.1159/000479903>
18. He, Yingli, Jin, L., Wang, J., Yan, Z., Chen, T., & Zhao, Y. (2015). *Mechanisms of fibrosis in acute liver failure*. (4), 1877–1885. <https://doi.org/10.1111/liv.12731>
  19. He, Yunjie, Yu, D., Zhu, L., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2018). miR-149 in human cancer: A systemic review. *Journal of Cancer*, 9(2), 375–388. <https://doi.org/10.7150/jca.21044>
  20. Howell, L. S., Ireland, L., Park, B. K., & Goldring, C. E. (2018). MiR-122 and other microRNAs as potential circulating biomarkers of drug-induced liver injury. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(1), 47–54. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1415145>
  21. Jin, L., Hu, W. L., Jiang, C. C., Wang, J. X., Han, C. C., Chu, P., ... Wu, M. (2011). MicroRNA-149\*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), 15840–15845. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019312108>
  22. Jin, L., Hu, W. L., Jiang, C. C., Wang, J. X., Han, C. C., Chu, P., ... Wu, M. (2011). *MicroRNA-149\*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38)
  23. Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Natta, M. Van, Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., ... Mccullough, A. J. (2005). *Design and Validation of a Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. 1313–1321. <https://doi.org/10.1002/hep.20701>
  24. Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature*, 438(7068), 685–689. <https://doi.org/10.1038/nature04303>
  25. Lee, R. C. (1993). *The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to & II-14 .pdf*. 75, 843–854.
  26. Liu, W. H., Ren, L. N., Wang, T., Navarro-Alvarez, N., & Tang, L. J. (2016). The involving roles of Intrahepatic and Extrahepatic Stem/Progenitor cells (SPCs) to liver regeneration. *International Journal of Biological Sciences*, 12(8), 954–963.

<https://doi.org/10.7150/ijbs.15715>

27. Loo, C. K. C., Pereira, T. N., Pozniak, K. N., Ramsing, M., Vogel, I., & Ramm, G. A. (2015). The development of hepatic stellate cells in normal and abnormal human fetuses – An immunohistochemical study. *Physiological Reports*, 3(8), 1–15. <https://doi.org/10.14814/phy2.12504>
28. Luo, X., & Wang, G. (2017). MicroRNA-21 Mediates Angiotensin II-Induced Liver Fibrosis by Activating NLRP3 Inflammasome/IL-1 $\beta$  Axis via Targeting Smad7 and Spry127(1), 1–20. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6669>
29. Machado, M. V., & Cortez-Pinto, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: What the clinician needs to know. *World Journal of Gastroenterology*, 20(36), 12956–12980. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12956>
30. Mezaki, Y., Morii, M., Yoshikawa, K., & Yamaguchi, N. (2012). Elevated expression of transforming growth factor  $\beta$  3 in carbon tetrachloride-treated rat liver and involvement of retinoid signaling. 18–24. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.809>
31. Michalopoulos, G. K. (2007). <Liver Regeneration Review.pdf>. (April). <https://doi.org/10.1002/jcp.21172>\r10.1002/JCP
32. Nakao, K., Miyaaki, H., & Ichikawa, T. (2014). Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 49(4), 589–593. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0932-4>
33. Nunes, I., Gleizes, P. E., Metz, C. N., & Rifkin, D. B. (1997). Latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Cell Biology*, 136(5), 1151–1163. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.1151>
34. Oh, S., Swiderska-syn, M., Jewell, M. L., Premont, R. T., Diehl, A. M., Diehl, A. M., ... Diehl, A. M. (2018). Liver regeneration requires Yap1-TGF  $\beta$  -dependent epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes epithelial-mesenchymal transition in hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 69(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.008>
35. Patt, C. H., Yoo, H. Y., Dibadj, K., Flynn, J., & Thuluvath, P. J. (2003). Prevalence of transaminase abnormalities in asymptomatic, healthy subjects

- participating in an Executive Health-Screening Program. *Digestive Diseases and Sciences*, 48(4), 797–801. <https://doi.org/10.1023/A:1022809430756>
36. Pickup, M. W., Owens, P., & Moses, H. L. (2017). *TGF- $\beta$ , Bone Morphogenetic Protein, and Activin Signaling and the Tumor Microenvironment*. 1–22.
37. Pischon, T., Boeing, H., Hoffmann, K., Bergmann, M., Schulze, M. B., Overvad, K., ... Riboli, E. (2008). *General and Abdominal Adiposity and Risk of Death in Europe*.
38. Puche, J. E., Saiman, Y., & Friedman, S. L. (2013). Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1473–1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>
39. Rao, S., Zaidi, S., Banerjee, J., Jogunoori, W., Sebastian, R., Mishra, B., ... Mishra, L. (2017). *Cancer Stem Cells and Regeneration*. 1(6), 477–493. <https://doi.org/10.1002/hep4.1062>
40. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquienelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>
41. Roderburg, C., Urban, G. W., Bettermann, K., Vucur, M., Zimmermann, H., Schmidt, S., ... Luedde, T. (2011). Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*, 53(1), 209–218. <https://doi.org/10.1002/hep.23922>
42. Roy, S., Benz, F., Alder, J., Bantel, H., Janssen, J., Vucur, M., ... Roderburg, C. (2016). *Down-regulation of miR-192-5p protects from oxidative stress-induced acute liver injury*. 1197–1207. <https://doi.org/10.1042/CS20160216>
43. Schueller, F., Roy, S., Loosen, S. H., Alder, J., Koppe, C., Schneider, A. T., ... Roderburg, C. (2017). miR-223 represents a biomarker in acute and chronic liver injury. *Clinical Science*, 131(15), 1971–1987. <https://doi.org/10.1042/CS20170218>
44. Schueller, F., Roy, S., Vucur, M., Trautwein, C., Luedde, T., & Roderburg, C. (2018). *The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity*. <https://doi.org/10.3390/ijms19010261>
45. Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., ...

- Spiegelman, B. M. (2011). *Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice*. 121(1), 53–56. <https://doi.org/10.1172/JCI44271.96>
46. Senties-Gómez, M. D., Gálvez-Gastélum, F. J., Meza-García, E., & Armendáriz-Borunda, J. (2005). Fibrosis hepática. El papel de las metaloproteinasas y de TGF- $\beta$ . *Gaceta Medica de Mexico*, 141(4), 315–322.
47. Sibulesky, L. (2013). Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*, 2(SUPPL. 1), 2012–2014. <https://doi.org/10.1002/cld.124>
48. Silakit, R., Loilome, W., Yongvanit, P., Chusorn, P., Techasen, A., Boonmars, T., ... Namwat, N. (2014). Circulating miR-192 in liver fluke-associated cholangiocarcinoma patients: A prospective prognostic indicator. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 21(12), 864–872. <https://doi.org/10.1002/jhbp.145>
49. Singh, S., Osna, N. A., & Kharbanda, K. K. (2017). Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World Journal of Gastroenterology*, 23(36), 6549–6570. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6549>
50. Song, J., Gao, L., Yang, G., Tang, S., Xie, H., Wang, Y., ... Fan, D. (2014). MiR-199a regulates cell proliferation and survival by targeting FZD7. *PLoS ONE*, 9(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110074>
51. Song, G., Sharma, A. D., Roll, G. R., Ng, R., Lee, A. Y., Billewicz, R. H., ... Willenbring, H. (2010). *MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration*. *Hepatology*, 51(5), 1735–1743. doi:10.1002/hep.23547
52. Taub, R. (2004). Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(10), 836–847. <https://doi.org/10.1038/nrm1489>
53. Teschke, R. (2018). *Alcoholic Liver Disease : Alcohol Metabolism , Cascade of Molecular Mechanisms , Cellular Targets , and Clinical Aspects*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6040106>
54. Torres, J. L., Novo-Veleiro, I., Manzanedo, L., Suárez, L. A., Macías, R., Laso, F. J., & Marcos, M. (2018). Role of microRNAs in alcohol-induced liver disorders and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 24(36), 4104–4118. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i36.4104>
55. Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*,

- 27(21), R1147–R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
56. Wang, C., Wang, G., Zhang, L., Pan, J., & Wei, Y. (2017). Latent Transforming Growth Factor  $\beta$  Binding Protein 2 (LTBP2) as a Novel Biomarker for the Diagnosis and Prognosis of Pancreatic Carcinoma. *Medical Science Monitor*, 23, 3232–3239. <https://doi.org/10.12659/msm.905284>
57. Wang, P., Li, Z.-W., Zhu, Z., Zhang, Z.-Y., & Liu, J. (2019). Inhibition of miR-214-5p attenuates inflammatory chemotaxis and nerve regeneration obstruction after spinal cord injury in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(6), 2332–2339. [https://doi.org/10.26355/eurev\\_201903\\_17376](https://doi.org/10.26355/eurev_201903_17376)
58. Yuan, B., Dong, R., Shi, D., Zhou, Y., Zhao, Y., Miao, M., & Jiao, B. (2011). Down-regulation of miR-23b may contribute to activation of the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signalling pathway during the termination stage of liver regeneration. *FEBS Letters*, 585(6), 927–934. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.031>
59. Zheng, Z. Y., Weng, S. Y., & Yu, Y. (2009). Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World Journal of Gastroenterology*, 15(46), 5776–5783. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.5776>
60. Zhou, W., Zhang, Q., & Qiao, L. (2014). *Pathogenesis of liver cirrhosis*. 20(23), 7312–7324. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7312>

## XII. APÉNDICE

### 12.1 Preparación de soluciones

- PBS (10X)

NaCl .....80g  
KCl.....2g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 14.4g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 2.4g  
H<sub>2</sub>O ..... 1L

- TBS (1X)

Tris-Cl ..... 6.05 g  
NaCl .....8.76 g  
H<sub>2</sub>O .....1L  
pH 7.5

- Buffer HBSS-EGTA (0.5 mM):

EGTA 0.5 M .....500 µL  
HBSS 1X .....500 mL  
pH 7.4

- Buffer HBSS-CaCl<sub>2</sub> (1 mM):

CaCl<sub>2</sub> 1M .....500 µL  
HBSS 1X .....500mL  
pH 7.4

- Medio de adherencia

Medio M199..... 475 mL  
Penicilina/Streptomina (1%)... 5mL  
BSA (10%) ..... 2mL

Suero fetal bovino ..... 10 mL  
Dexametasona (100nM final) ... 5 µL  
Insulina (100nM final) ..... 72.5 µL

- Medio de mantenimiento

Medio M199..... 475 mL  
Dexametasona (100nM final) ... 5 µL  
Penicilina/Streptomycin (1%) ... 5mL  
Insulina (100nM final) ..... 72.5 µL

- Colagenasa concentrada

Clostridium histolyticum ..... 1.6 g  
Buffer HBSS-CaCl<sub>2</sub>..... 50mL

- Solución de sustrato de DAB-peroxidasa

DAB 1% ..... 100 µL  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% ..... 100µL  
PBS 1X ..... 5mL  
pH 7.2

## 12.2 Datos de los pacientes con NAFDL.

Estadio de Fibrosis	EDAD	GENERO	Esteatosis (% rango)	Esteatosis (%)	Ballooning	Necro-inflamación
F0	49	M	0	0	nada	moderada
F0	49	F	menos de 5%	4	leve	leve
F0	47	M	0%	0	nada	leve
F0	29	F	>66%	70	leve	leve
F0	42	F	0	0	nada	leve
F1	53	F	33-66%	60	severo	severa
F1	31	F	menos de 33%	10	moderado	moderada
F1	32	F	menos de 33%	4	leve	moderada
F1	46	M	33-66%	40	moderado	moderada
F1	42	F	menos de 5%	4	leve	moderada
F1	41	M	0	0	leve focal	moderada
F2	54	F	33-66%	50	severo	severa
F2	43	M	33-66%	50	leve	leve
F2	56	M	menos de 33%	10	moderado	leve
F2	38	F	>66%	90%	moderado	moderada
F2	39	F	>66%	70	moderado	severa
F2	41	F	33-66%	40	leve	moderada
F2	53	F	33-66%	40	leve	moderada
F3	31	F	33-66%	40	severo	moderada
F3	45	F	33-66%	40	moderado	moderada
F3	42	F	menos de 33%	20	leve	moderada
F4	52	F	>66%	70	severo	severa