



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

Análisis de la participación de los mecanismos de regulación de la  
expresión génica por microARNs (miRs) en modelos de  
hepatotoxicidad experimental

Presentada por la Lic. María Noelia Lardizábal

Director: Dr. Luis María Veggi

Rosario – Argentina

**2013**

Análisis de la participación de los mecanismos de regulación de la  
expresión génica por microARNs (miRs) en modelos de  
hepatotoxicidad experimental

**María Noelia Lardizábal**

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Área de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 1 de septiembre de 2013, bajo la dirección del Dr. Luis María Veggi.

Director:

Dr. Luis María Veggi

Jurado de Tesis:

Dra. María Eugenia Mamprín

Dr. Pablo Hernán Strobl-Mazzulla

Dra. Stella Teresita Mahieu

Fecha de defensa: 18 de Diciembre de 2013

***A mi viejo...***



*Porque él me enseñó la importancia de los valores que más necesité para la realización de esta Tesis: el trabajo, la perseverancia, la responsabilidad y, por sobre todas las cosas, la honestidad.*

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis fueron publicados en revistas con referato como trabajos completos o en libros de resúmenes de reuniones científicas, según se detalla a continuación.

#### Trabajos completos:

- **Lardizábal, M. N.**, Nocito, A. L., Daniele, S. M., Ornella, L. A., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. (2012). Reference Genes for Real-Time PCR Quantification of MicroRNAs and Messenger RNAs in Rat Models of Hepatotoxicity. PloS one, 7(5), e36323.
- **Lardizábal, M. N.**, Rodríguez, R. E., Nocito, A. L., Daniele, S. M., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. (2013). Alteration of the microRNA-122 regulatory network in rat models of hepatotoxicity. Aceptado para su publicación en la revista Environmental Toxicology and Pharmacology.

#### Presentaciones a congresos:

- Perdomo, V. G., **Lardizábal, M. N.**, Nocito, A. L., Daniele, S. M., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. Efecto de la administración aguda de tetracloruro de carbono (TC) sobre la expresión de microARNs hepáticos en la rata. LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina, 2009. Medicina, v. 69 (I), p. 213.
- **Lardizábal, M. N.**, Nocito, A. L., Ornella, L. A., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. Selection of reference genes for quantitative Real Time PCR studies in rat models of hepatotoxicity. XLVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Madryn, Argentina, 2010. Biocell, v. 34, p.81.

- **Lardizábal, M. N.**, Lasave, L. C., Nocito, A. L., Daniele, S. M., Arce, R. D., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. Correlation between the blood release of miR-122 and transaminases in rat models of hepatotoxicity. XLVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Madryn, Argentina, 2010. Biocell, v. 34, p.82.
  
- **Lardizábal, M. N.**, Nocito, A. L., Daniele, S. M., Ornella, L. A., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. Selección de genes de referencia (GR) para la determinación de microARNs hepáticos por Real Time PCR Cuantitativa en modelos de hepatotoxicidad experimental en la rata. LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica - Reunión Sociedad Argentina de Fisiología 2011 - II Congreso Nacional AACYTAL - IV Reunión Científica Regional por el Bienestar del Animal del Laboratorio y el Progreso de la Ciencia. Mar del Plata, Argentina, 2011. Medicina, v. 71 (SuplIII): p. 160.
  
- **Lardizábal, M. N.**, Nocito, A. L., Daniele, S. M., Rodríguez, R. E., Palatnik, J. F. y Veggi, L. M. Alteración de la expresión del microARN (miR) 122 en un modelo de hepatotoxicidad aguda inducida por tetracloruro de carbono (TC) en ratas. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica – LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Argentina, 2012. Medicina, v. 72 (SuplIII): p.92.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Sin dudas, los últimos cinco años fueron los de mayor aprendizaje de mi vida. El pasar por un Doctorado te enseña mucho más que diversas técnicas complejas y metodologías de investigación. Particularmente, aprendí en detalle a hacer una buena Real Time, a armar y defender una presentación oral, a hacer análisis estadísticos, entre otras cosas. Pero fundamentalmente el Doctorado me enseñó, a fuerza de mucho trabajo y paciencia, a trabajar en equipo, a buscar soluciones cuando parece que ya no las hay, a “atar con alambres”, a tomar decisiones, a ser curiosa, a pedir ayuda, a dialogar y a ser perseverante ante los fracasos. Y si bien me queda mucho por aprender, creo que estas son las cosas más valiosas que me llevo de esta experiencia, porque me acompañarán en cualquier camino que decida tomar en el futuro.*

*Este aprendizaje se lo debo a mucha gente que “me empujó” en estos años. Y por eso me siento profunda e infinitamente agradecida, porque cada uno de ellos aportó a su manera a que hoy llegue al fin de esta etapa llevándome una mochila llena de valiosos cimientos.*

*Quiero expresar mi agradecimiento a mi director, Luiyi, no sólo por abrirme las puertas para integrarme a su grupo de trabajo, sino también por su calidez, optimismo y alegría cotidiana. Por presentarme nuevos desafíos, por enseñarme a no bajar nunca los brazos, a pelearla con todos los recursos que tenemos para defender nuestras convicciones.*

*A CONICET, por la confianza depositada en mí a través de las becas recibidas.*

*Al IFISE y a la Facultad de Ciencias Bioquímicas, por brindarme el espacio para la realización de mi Tesis.*

*Al Jurado de la Tesis: Dra. María Eugenia Mamprín, Dr. Pablo Hernán Strobl-Mazzulla y Dra. Stella Teresita Mahieu, por aceptar evaluar mi trabajo y dedicar gentilmente parte de su tiempo para hacerlo. Especialmente a la Dra. Mamprín, por haber seguido mi trabajo de Tesis desde el comienzo.*

*A Javier Palatnik, por iniciarnos a Luiyi y a mí en el fascinante mundo de los microARNs. Por los valiosísimos consejos y aportes, y por toda la ayuda brindada. A su excelente grupo de trabajo, tanto en lo humano como en lo profesional, por la alegría y el cariño con el que me recibieron en cada visita a su laboratorio. Especialmente a Vale, Juanma, Edgard y Carla, por todo lo que me enseñaron con infinita paciencia.*

*Un enorme GRACIAS a Ramiro Rodríguez, por la excelente predisposición para discutir cada paso de esta Tesis, por aportar siempre nuevas soluciones y guiarme con tanta claridad y simpleza.*

*A todos mis compañeros del IFISE, realmente no me alcanzan las palabras para agradecerles todo lo que hicieron por mí estos años. Por hacer que la cotidianidad del laboratorio sea tan agradable. Porque siempre encontré en todos una respuesta inmediata y ofrecida desde el corazón a la hora de necesitar un protocolo, un anticuerpo, una idea. También por ayudarme a atravesar los momentos difíciles que me tocó vivir en lo personal. Por aquél gesto que tuvieron conmigo que me dio tantas fuerzas y no olvidaré nunca. Un gracias muy especial a Paula, Agustina, Ariel, Juan Pablo y Gisel, por los divertidos almuerzos, los debates de café, la contención y el cariño. A Tere, Luján y Flavia, por escucharme incontables veces, por todos los valiosos aportes científicos y no tan científicos que hicieron a mi Tesis. A Peco y Virginia, por estar absolutamente siempre bien dispuestos a brindarme sus mágicas soluciones.*

*A Leandro, sostén fundamental desde el día que entré al IFISE y gran ejemplo de persona e investigador. Por sus charlas sinceras, su visión crítica, su aliento.*

*A mis amigas y compañeras de facultad Laurita, Ceci, Romi, Lau, Vale, Flor y Sony, que a pesar de no compartir un mismo espacio de trabajo, fueron mis compañeras codo a codo del doctorado. Por los interminables debates científicos, pseudos-filosóficos y de la vida cotidiana que tanto ayudan a seguir adelante.*

*A mis compañeras Silvia y Ana, por escucharme, alentarme, aconsejarme.*

*A mi "familia grande": abuelos, tíos y primos, los de allá y los de acá. Loca y auténtica. Por sostenerme siempre y alentarme.*

*A mis hermanas y cuñados, sin duda mis mejores amigos. Siempre al pie del cañón, aguantando a esta hermana que tropieza, se levanta, un día ríe, otro día llora. Por mimarme tanto preocupándose por mí y alentándome siempre. A Juan y Guille, los tesoros más lindos que me regaló Dios. Porque aunque ellos aún no entiendan lo que significa una Tesis, la luz que le dan a mi vida hace que cualquier obstáculo se vea insignificante, me empuja todos los días hacia delante y me ayuda a ser mejor persona.*

*A mi papá, por confiar en mí más que yo misma. A Marcela, por su calidez desinteresada.*

*A mi mamá, por acompañarme siempre con su sonrisa y su cariño en cada paso que doy. Por su apoyo incondicional.*

## ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	i
Lenguaje especial	iv
<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
<b>2.1. El hígado</b>	<b>2</b>
2.1.1. Funciones	2
2.1.2. Breve descripción histológica del hígado	3
2.1.3. Hepatotoxicidad	4
2.1.3.1. Enfermedades hepáticas inducidas por drogas	4
2.1.3.2. Metabolismo hepático de compuestos exógenos	4
2.1.3.3. Hepatotoxicidad aguda	6
2.1.3.4. Respuesta al daño hepático inducido por drogas: mecanismos de reparación y regeneración	7
2.1.4. Hepatotoxicidad experimental	8
2.1.4.1. Modelos experimentales de hepatotoxicidad	8
2.1.4.1.1. Hepatotoxicidad inducida por tioacetamida	8
2.1.4.1.2. Hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono	9
2.1.4.1.3. Hepatotoxicidad inducida por D-galactosamina	10
2.1.4.1.4. Hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno	11
2.1.5. Hepatotoxicidad y alteración del patrón de expresión génica	13
<b>2.2. Real Time qPCR</b>	<b>14</b>
2.2.1. Historia	14
2.2.2. RT-qPCR empleando SYBR Green	16
2.2.3. <i>Stem-Loop</i> RT-qPCR	17
2.2.4. Cuantificación absoluta y cuantificación relativa	18
2.2.5. Validación de una reacción de amplificación por Real Time PCR	19
2.2.6. Normalización	19

<b>2.3. Regulación de la expresión génica mediada por micro-ARNs</b>	<b>22</b>
2.3.1. Historia	22
2.3.2. ARN pequeños en animales	24
2.3.2.1. Clasificación de ARN pequeños	24
2.3.2.2. miARNs: función y biogénesis	25
2.3.2.3. miARNs en enfermedades hepáticas	26
2.3.2.4. El miARN-122	27
2.3.2.4.1. Generalidades y función	27
2.3.2.4.2. Regulación de la expresión del miARN-122	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos	30
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1. Aspectos éticos y animales empleados	31
4.2. Establecimiento de modelos de hepatotoxicidad aguda	31
4.2.1. Determinaciones séricas de marcadores de daño hepático	32
4.2.2. Evaluación histológica	32
4.3. Purificación de ARN	32
4.3.1. Procesamiento de muestras de hígado	32
4.3.2. Procesamiento de muestras de sangre entera	32
4.4. Diseño de cebadores para amplificación por RT-qPCR	33
4.5. Síntesis de ADNc y Real Time qPCR	37
4.5.1. Tratamiento con DNasa y Retrotranscripción	37
4.5.2. Amplificación por PCR	37
4.5.3. Cálculo de eficiencias de amplificación	38
4.6. Análisis de datos	38
4.6.1. Cálculo de las cantidades relativas normalizadas	38
4.6.2. Evaluación de estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos	39
4.6.3. Evaluación de la eficiencia de la normalización	40
4.7. Determinación de proteínas específicas	41

4.7.1. Preparación de lisados totales y extractos nucleares	41
4.7.1.1. Obtención de lisados totales	41
4.7.1.2. Obtención de extractos nucleares	41
4.7.2. Cuantificación de proteínas totales	41
4.7.3. Western Blot	41
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 1. Desarrollo de una técnica de determinación de la expresión de ARNm y miARNs por Real Time PCR Cuantitativa en modelos experimentales de toxicidad hepática aguda inducida por hepatotoxinas clásicas.</b>	<b>43</b>
5.1.1. Establecimiento de modelos de hepatotoxicidad aguda	43
5.1.2. Selección de genes de referencia óptimos para estudios de expresión mediante RT-qPCR en los modelos de hepatotoxicidad establecidos	45
5.1.2.1. Diagrama de trabajo propuesto	45
5.1.2.1.1. Paso 1: Selección de GR candidatos a evaluar	47
5.1.2.1.2. Paso 2: Determinación de la expresión génica de los GR candidatos por RT-qPCR	47
5.1.2.1.3. Paso 3: Exclusión de los GR candidatos que alteran su expresión en el sistema estudiado	48
5.1.2.1.4. Paso 4: Establecimiento de un ranking de estabilidad de expresión dentro del grupo de GR restantes	50
5.1.2.1.5. Paso 5: Determinación del número óptimo de GR a utilizar	53
5.1.2.2. Confirmación de la expresión alterada de los genes de referencia candidatos excluidos	57
<b>CAPÍTULO 2: Estudio de la participación del miARN-122 en los modelos de hepatotoxicidad aguda: sus mecanismos regulatorios y funcionalidad.</b>	<b>59</b>
5.2.1. Caracterización del estado de proliferación y diferenciación celular	59
5.2.2. Evaluación de la red regulatoria del miARN-122	60
5.2.3. Estudio de los distintos mecanismos que podrían explicar la	

alteración de la expresión del miARN-122 en los modelos de hepatotoxicidad establecidos	62
5.2.3.1. Estudio de mecanismos generales de regulación	62
5.2.3.2. Estudio de mecanismos específicos de regulación del miARN-122	63
<b>6. ANEXO</b>	<b>67</b>
6.1. La disminución del miARN-122 en otros modelos de hepatotoxicidad permite inferir que ésta sería una respuesta general de las células hepáticas	67
6.2. Correlación entre la liberación en sangre del miARN-122 y transaminasas en la hepatotoxicidad	70
<b>7. CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>73</b>
<b>8. FIGURAS ADICIONALES</b>	<b>75</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>80</b>
Índice de Figuras	91
Índice de Tablas	93

## ABREVIATURAS

5S: ARN ribosomal 5S

18S: ARN ribosomal 18S

AA: Acetaminofeno

ACTB: Beta-actina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNdh: Ácido desoxirribonucleico doble hebra

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

AGO: Argonauta

ALB: Albúmina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNdh: Ácido ribonucleico doble hebra

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

B2M: Beta-2-microglobulina

BLAST: Herramienta de búsqueda de alineamiento local (del inglés *basic local alignment search tool*)

CAR: Receptor constitutivo de androstano (del inglés *constitutive androstane receptor*)

CAT-1: Transportador de aminoácidos catiónicos (del inglés *cationic amino acid transporter 1*)

C/EBP- $\alpha$ : Proteína de unión a secuencias potenciadoras CCAAT alfa (del inglés *CCAAT/Enhancer-binding protein alpha*)

Cq: Ciclo de cuantificación

CYCA: Ciclofilina A

CYP: Citocromo P450

DEPC: Dietilpirocarbonato

dNTP: Deoxinucleósido trifosfato

DNasa: Desoxirribonucleasa

DS: Desviación standard

DTT: Ditiotretitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHID: Enfermedad hepática inducida por droga

FMO: Flavina monooxigenasa

FN: Factor de normalización

GA: D-galactosamina

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GLD-2: proteína del desarrollo de la línea germinal 2 (del inglés *germ line development 2*)

GR: Gen de referencia

GS: Glutamina sintetasa

GSH: Glutación

HNF: Factor nuclear hepatocitario (del inglés *hepatocyte nuclear factor*)

HPRT: Hipoxantina-guanina fosfato ribosil transferasa

IDT: Tecnologías integradas del ADN (del inglés *Integrated DNA Technologies*)

LDH: Lactato deshidrogenasa

LETfs: Factores de transcripción enriquecidos en hígado (del inglés *liver-enriched transcription factors*)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *major histocompatibility complex*)

miARN o miR: micro ARN

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

NAPQI: Imina *N*-acetil-*p*-benzoquinona

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica (del inglés *National Center for Biotechnology Information*)

NEI: Índice de eficiencia de la normalización (del inglés *normalization efficiency index*)

NO: Óxido nítrico

NRQ: Cantidad relativa normalizada (del inglés *normalized relative quantity*)

Nt: Nucleótidos

Pb: Pares de base

PBS: *Buffer* fosfato salino

piARN: ARN asociado a Piwi

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular (del inglés *proliferating cell nuclear antigen*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*)

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF: Polivinilideno difluoruro

RDML: Lenguaje de datos de PCR en Tiempo Real (del inglés *Real Time PCR data markup language*)

RIPA: *buffer* de lisis de radioinmunoprecipitación (del inglés *radio-immunoprecipitation assay*)

RNasa: Ribonucleasa

RNU48: ARN pequeño nucleolar 48

ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

RQ: Cantidad relativa (del inglés *relative quantity*)

RT: Transcripción reversa (del inglés *reverse transcription*)

RT-qPCR: Transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (del inglés *reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction*)

siARN: ARN pequeño de interferencia (del inglés *small interfering RNA*)

SDHA: Succinato deshidrogenasa

SDS: Dodecil sulfato sódico

TA: Tioacetamida

TASO: Tioacetamida-S-óxido

TASO2: Tioacetamida-S,S-dióxido

TC: Tetracloruro de carbono

TCA: Ácido tricloroacético

TGF: Factor de crecimiento tumoral

Tm: Temperatura de disociación (del inglés *melting temperature*)

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral (del inglés *tumor necrosis factor*)

U6: ARN spliceosomal U6

UDP: Uridina difosfato

UDP-GlcN: Uridina difosfato-glucosamina

UMP: Uridil monofosfato, uridilato

UTP: Uracil tri-fosfato

UTR: Región no traducida (*untranslated region*)

## LENGUAJE ESPECIAL

### Del inglés

*Buffer*: solución reguladora, amortiguadora o tampón, que permite controlar la concentración libre de un determinado componente a pesar de un cambio en su concentración total (por ejemplo pH).

*Northern Blot*: técnica de detección de moléculas de ARN de una secuencia dada, que emplea la transferencia de ARNs separados electroforéticamente a una membrana apropiada para un posterior revelado con una sonda específica.

*Southern Blot*: técnica de detención de moléculas de ADN de una secuencia dada, que emplea la transferencia de ADNs separados electroforéticamente a una membrana apropiada para un posterior revelado con una sonda específica.

*Splicing*: proceso post-transcripcional de maduración del ARN en el cual se eliminan ciertos fragmentos de la secuencia.

*Stem Loop*: estructura secundaria en forma de tallo y burbuja.

*Western Blot*: técnica para la detección de proteínas específicas, que emplea la transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a una membrana apropiada para una posterior detección con anticuerpos específicos.

### Del Latín

*Ad libitum*: a placer, a voluntad

*In vitro*: que ocurre en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo

*In vivo*: que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo

*Resumen*

---

## 1. RESUMEN

La hepatotoxicidad, el daño al hígado inducido por xenobióticos, involucra una alteración importante de la expresión génica. Los microARNs (miARNs) son moléculas de ARN pequeñas que regulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional, y están involucrados en numerosos procesos fisiológicos y fisio-patológicos. La técnica de referencia para determinar los niveles de ARNm y miARNs es la PCR Cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR). Sin embargo, para poder obtener resultados confiables, exactos y precisos mediante esta técnica, es indispensable contar con un método de normalización apropiado que corrija las diferencias introducidas entre las muestras durante su manipulación.

En la primera etapa de este trabajo de Tesis se establecieron cuatro modelos experimentales de hepatotoxicidad aguda en ratas, mediante la administración de hepatotóxicos tradicionales: acetaminofeno, tetracloruro de carbono, D-galactosamina y tioacetamida. Estos modelos se caracterizaron mediante la determinación de actividades enzimáticas de marcadores de daño hepático y mediante examinación histológica. Sobre estos modelos se desarrolló una técnica de determinación de la expresión de ARNm y miARNs por Real Time qPCR (RT-qPCR), que consistió en la identificación de la combinación de genes óptima para la normalización de los resultados. Esto se llevó a cabo mediante el empleo de diferentes *software* diseñados específicamente para este fin.

El miARN-122 es un miARN altamente abundante y específico de hígado, donde está involucrado en funciones críticas del hepatocito, y está asociado a ciertas enfermedades hepáticas. En la segunda etapa de esta Tesis se estudió la participación del miARN-122 y sus mecanismos regulatorios en los modelos de hepatotoxicidad establecidos. Para esto, mediante la técnica RT-qPCR desarrollada en la primera etapa del trabajo y mediante *Western blot*, se determinó la expresión del miARN-122 maduro, de su precursor, sus genes blanco, marcadores de proliferación y diferenciación celular, y aquellos reguladores (globales y específicos) que pudieran alterar la expresión del miARN-122. Como conclusión, se postula que los niveles del miARN-122 se encuentran bajo un control transcripcional en procesos de hepatotoxicidad, a través de los factores de transcripción C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$ , y se propone que los cambios en la red regulatoria del miARN-122 se encuentran asociados a la respuesta del hígado frente a la lesión causada por las hepatotoxinas, probablemente a través de procesos de proliferación celular para reparar el tejido dañado.

# *Introducción*

---

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El hígado

#### 2.1.1. Funciones

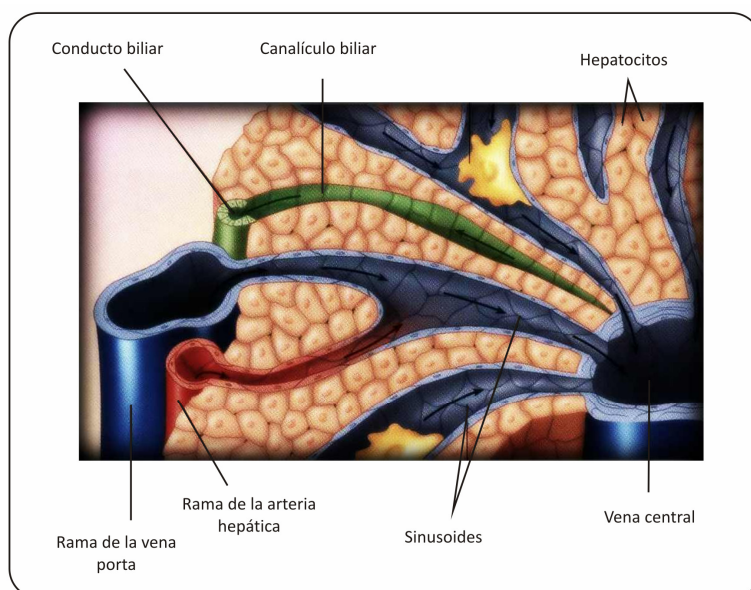
Se dice del hígado que es el gran órgano altruista del cuerpo. Además de cumplir un rol central en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas, también participa en la excreción de productos de desecho ligados a proteínas plasmáticas y, fundamentalmente, en la destoxificación del organismo. Esta última capacidad se debe a una inusual irrigación sanguínea: a diferencia de los demás órganos, la mayor parte de la sangre que llega al hígado es de naturaleza venosa, y es aportada a través de la vena porta desde el intestino. De esta forma, el hígado está estratégicamente situado para recibir no sólo nutrientes absorbidos sino también moléculas potencialmente dañinas, como fármacos y toxinas bacterianas. La mayoría de las drogas y xenobióticos (compuestos foráneos, ajenos al metabolismo celular) son sustancias lipofílicas, característica que les permite atravesar la membrana de células intestinales. Los hepatocitos contienen un amplio conjunto de enzimas que metabolizan y modifican toxinas tanto endógenas como exógenas, de manera que los productos finales sean, en general, más hidrosolubles y menos susceptibles de ser captados por el intestino, y sean excretados en la orina o bilis. Esta **biotransformación hepática** involucra una vía oxidativa, principalmente a través del sistema enzimático del Citocromo P-450. Luego de posteriores pasos metabólicos, el producto hidrofílico se exporta hacia el plasma o bilis mediante proteínas transportadoras localizadas en la membrana del hepatocito, y es posteriormente excretado por el riñón o el tracto gastrointestinal (Koeppen y Stanton, 2009).

Una consecuencia importante de este rol hepático en el metabolismo y la excreción de compuestos exógenos es la particular susceptibilidad del hígado al daño por agentes químicos. A pesar de que la transformación metabólica de sustancias exógenas se considera una función hepática de destoxificación, este fenómeno resulta ser un arma de doble filo, ya que muchos metabolitos productos de la biotransformación resultan dañinos para el hígado. La mayoría de las hepatotoxinas requieren ser bioactivadas, y ese metabolito activo producido en el hígado es el que efectúa los procesos nocivos en la célula. De hecho, cuanto mayor es la capacidad de un organismo de metabolizar un cierto compuesto, menor es la dosis que puede tolerar el

hígado. Este “sacrificio” hepático para una correcta funcionalidad del organismo entero es lo que hace al hígado el gran órgano altruista del cuerpo.

### 2.1.2. Breve descripción histológica del hígado

Los hepatocitos se disponen en cordones que forman capas de células epiteliales (placas hepáticas) orientadas de modo radial hacia una vena central, también denominada centrolobulillar (Figura 1). Las placas de hepatocitos que constituyen el parénquima hepático están irrigadas por una serie de sinusoides, que son cavidades irrigadas por ramas de la vena porta y de la arteria hepática. Finalmente, la sangre drena en las ramas centrales de la vena hepática. Las ramas de la vena porta, la arteria hepática y los conductos biliares transcurren en paralelo en la llamada tríada hepática, o espacios porta. Los hepatocitos más cercanos a esta tríada se denominan periportales, o zona 1, y reciben el mayor aporte de oxígeno y nutrientes. Los hepatocitos más alejados se denominan pericentrales, perivenosos o zona 3, y se ubican rodeando la vena central del lobulillo (Shier y col., 2009).



**Figura 1. Diagrama del lobulillo hepático.** Los hepatocitos se disponen en placas situadas radialmente alrededor de una vena central. Las ramas de la vena porta y la arteria hepática se sitúan en la periferia del lóbulo y forman la “tríada portal” junto con el conducto biliar. La sangre de la vena porta y de la arteria hepática se filtra alrededor de los hepatocitos a través de los sinusoides, antes de drenar en la vena central. Adaptado de Shier y col., 2009.

### 2.1.3. Hepatotoxicidad

#### 2.1.3.1. Enfermedades hepáticas inducidas por drogas

Las enfermedades hepáticas inducidas por drogas (EHIDs) representan aproximadamente un 10% de las causas de hepatitis aparentes y, entre pacientes de más de 50 años, un 40% (Benhamou, 1986). La importancia del estudio de la toxicidad por drogas surge a partir de la alta tasa de mortalidad (10% a 50%) que ésta conlleva (Zimmerman, 1999). Antes de la Segunda Guerra Mundial este fenómeno representaba un problema de menor importancia. Sin embargo, en los años siguientes, la introducción de un gran número de drogas nuevas en el mercado fue acompañado por un notable aumento en los casos clínicos de EHIDs (Sameshine y col., 1974). Muchos fármacos que habían sido empleados por varias décadas y que aparentaban no provocar efectos secundarios son reconocidos, en la actualidad, como importantes causales de daño hepático, como por ejemplo, la aspirina. El daño inducido por xenobióticos es uno de los motivos más comunes por lo cual las drogas en etapas de desarrollo no obtienen la aprobación de organismos regulatorios, o son retirados del mercado en el período post-aprobación (Abboud y Kaplowitz, 2007).

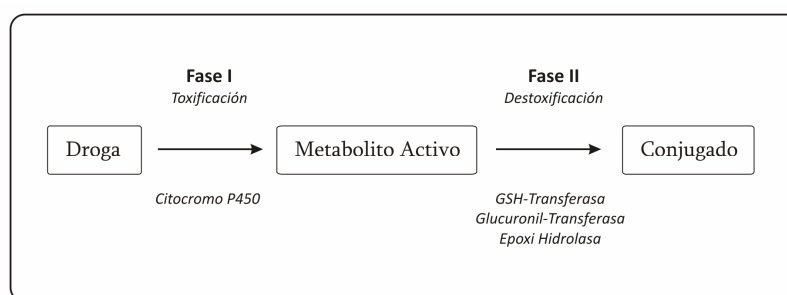
#### 2.1.3.2. Metabolismo hepático de compuestos exógenos

Todos los compuestos exógenos no polares son potencialmente tóxicos, ya que la insolubilidad en agua impide su excreción efectiva en la orina. La consecuente acumulación de estos compuestos en el cuerpo puede resultar una amenaza química si éste no es convertido en productos polares de fácil excreción. Este fenómeno también se aplica para los metabolitos endógenos del grupo hemo (como la bilirrubina) y de hormonas (como los esteroides) (Zimmerman, 1999).

El sistema enzimático responsable del metabolismo de compuestos exógenos se encuentra como parte del retículo endoplasmático liso, insertado en la membrana lipídica del hepatocito. La biotransformación involucra dos fases (Figura 2):

- **Fase I:** Prepara al compuesto para la conjugación (Fase II), mediante el agregado de grupos polares.
- **Fase II:** El producto metabólico de la Fase I (o el compuesto original si ya contiene un grupo polar) sufre una reacción de conjugación, ya sea con glutatión (GSH), glucuronato, sulfato o glicina.

Las reacciones oxidativas de la Fase I muy frecuentemente generan productos transitorios reactivos que pueden dañar al hígado, con lo cual se denomina también *fase tóxica* del metabolismo de drogas. En cambio, la Fase II, o también llamada reacción de biotransformación sintética, es la *reacción destoxificadora*, ya que destruye las propiedades biológicas tóxicas del compuesto original y permite su excreción. Las reacciones de Fases I y II normalmente están estrechamente coordinadas. El daño hepático depende del balance entre las fases de toxificación y destoxificación. Por ejemplo, una reducción en los niveles de reserva de GSH potencia la hepatotoxicidad de varios agentes, y su repleción disminuye esta toxicidad. Se sabe que el ayuno o el alcoholismo aumentan la susceptibilidad del paracetamol, y este aumento se atribuye, en parte, a la depleción de GSH (Whitcomb y Block, 1994).



**Figura 2. Biotransformación de compuestos exógenos.** En la Fase I del metabolismo de xenobióticos, los compuestos sufren reacciones de funcionalización de distinta naturaleza, destinadas a introducir nuevos grupos funcionales en la molécula. En la Fase II, los metabolitos son conjugados con moléculas endógenas, lo que finalmente facilita notablemente su eliminación del organismo.

Los hepatocitos perivenosos (zona 3) contienen mayor cantidad de enzimas responsables de las reacciones de Fase I, y esto hace que el daño producido por muchos hepatotóxicos sea predominante en esta zona. Los metabolitos activos resultantes de las reacciones de Fase I pueden dañar al hígado mediante diversos mecanismos. Algunos de estos mecanismos incluyen: i) disrupción de la membrana plasmática y necrosis producto de la unión covalente de la droga a proteínas celulares; ii) inhibición de vías celulares de metabolismo de drogas mediante la formación de unión covalente entre la droga y el componente enzimático del Citocromo P450; iii) generación de respuesta inmune por el reconocimiento de aductos droga-proteínas, que lleva al ataque citolítico por células T; iv) disminución del flujo biliar como

resultado de la disrupción de filamentos de actina subcelulares o interrupción de bombas de transporte; v) muerte celular programada (apoptosis); vi) inhibición de la función mitocondrial, con la consecuente acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica, acumulación de grasas y muerte celular (Navarro y Senior, 2006).

#### 2.1.3.3. Hepatotoxicidad aguda

Una lesión hepática aguda puede ser **hepatocelular** (citotóxica), cuando el daño es producido en el parénquima hepático; o **colestática**, cuando se produce una disminución en el flujo biliar, sin daño o con un daño mínimo al parénquima hepático. Frecuentemente la lesión es mixta, con características hepatocelulares y colestáticas al mismo tiempo. El tipo de daño producido por los hepatotóxicos estudiados en este trabajo de Tesis es hepatocelular. Estas lesiones se caracterizan, a grandes rasgos, por fenómenos de degeneración celular, necrosis y esteatosis (acumulación de triglicéridos intracelulares).

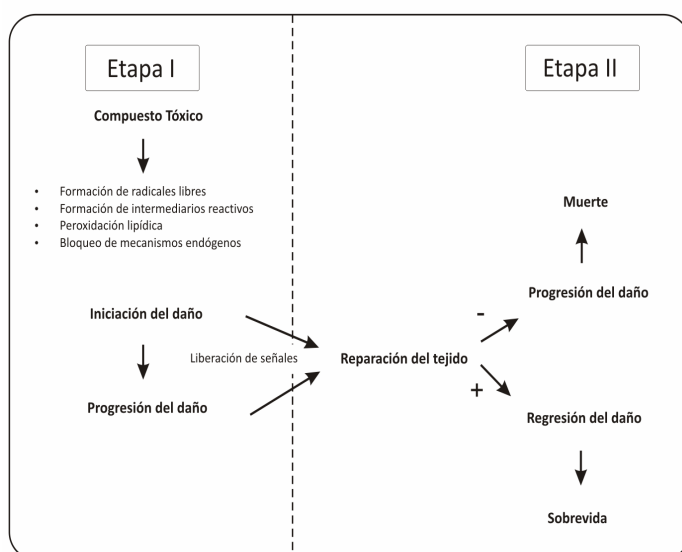
Los marcadores de daño hepático son biomoléculas presentes en la circulación sanguínea como resultado de la liberación del contenido de los hepatocitos al espacio extracelular. Como consecuencia, éstas aumentan sus niveles séricos en comparación con los sujetos controles. Los biomarcadores séricos de daño hepatocelular más ampliamente utilizados son las actividades enzimáticas de la alanina transaminasa (ALT) y la aspartato transaminasa (AST). El grado de aumento en la actividad sérica de estas enzimas depende de la gravedad y el alcance de la lesión hepática (Zimmerman, 1999).

Las enzimas aminotransferasas catalizan la reacción de transferencia de un grupo amino desde la alanina (ALT) o aspartato (AST) al  $\alpha$ -cetoglutarato para producir glutamato y piruvato (en el caso de ALT) u glutamato y oxaloacetato (en el caso de AST). La ALT se encuentra en el citosol de los hepatocitos, mientras que la AST es de localización citoplasmática y también mitocondrial. El patrón de actividades séricas enzimáticas como respuesta a la exposición de un tóxico es un reflejo del daño producido por el mismo. Las elevaciones séricas de ALT y AST se observan por respuestas necróticas de los hepatocitos (daño hepatocelular).

#### 2.1.3.4. Respuesta al daño hepático inducido por drogas: mecanismos de reparación y regeneración.

Los hepatocitos de un hígado adulto se encuentran normalmente en la fase G0 del ciclo celular (quiescentes), con muy escasa división celular. Sin embargo, mantienen la habilidad de proliferar en respuesta a un estímulo, como un daño inducido por xenobióticos, infección o resección quirúrgica. Esta alta capacidad regenerativa del hígado lo distingue de los demás órganos esenciales del cuerpo, y le permite restaurar por completo la arquitectura hepática y reestablecer sus funciones luego de una lesión (Taub, 2004).

El **modelo de toxicidad de dos etapas** propuesto por Mehendale (Mehendale, 2005) establece la importancia del efecto de la reparación compensatoria del tejido en el resultado final de la toxicidad: progresión o regresión del daño causado (Figura 3). En este modelo, la Etapa I es aquella en la cual el tóxico inicia el daño a través de su propio mecanismo de acción, determinado por los procesos de bioactivación y detoxificación. Luego, dependiendo de la ausencia / presencia de procesos de reparación del tejido, en la Etapa II ocurre una progresión / regresión del daño, respectivamente. Bajas a moderadas dosis de tóxicos estimulan el reemplazo celular y la reparación del tejido. Este fenómeno es dosis-dependiente hasta que se alcanza un umbral, donde altas concentraciones inhiben los procesos compensatorios, lo cual lleva a una progresión del daño, sin restricciones, con la consecuente muerte del animal. El modelo de dos etapas enfatiza el rol crítico de la interacción opuesta entre la progresión y la regresión del daño tóxico agudo en la determinación del resultado final.



**Figura 3. Modelo de dos etapas propuesto por Mehendale.** En la Etapa I, el tóxico inicia el daño tisular a través de los mecanismos de bioactivación. Luego, el daño progresa debido a mecanismos no del todo conocidos. En la Etapa II, se estimula la respuesta reparadora del tejido compensatoria cuando la dosis del tóxico administrada es baja o moderada, lo cual lleva a una rápida regresión del daño con la supervivencia del animal. Por el contrario, altas dosis de las drogas inhiben la reparación del tejido, lo cual lleva a una progresión sin restricciones del tejido, y muerte del animal.

#### 2.1.4.1. Modelos experimentales de hepatotoxicidad

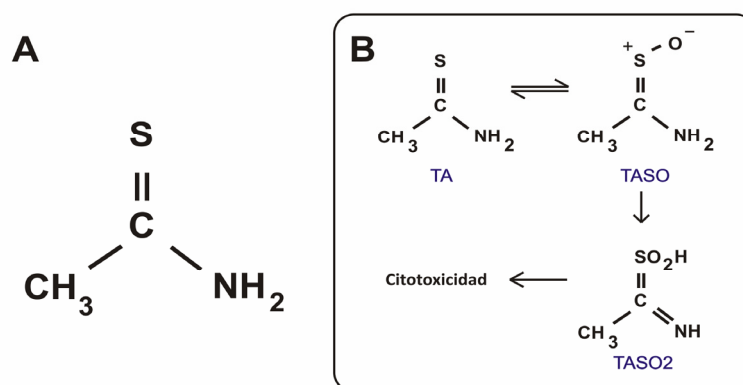
El uso de modelos experimentales de hepatotoxicidad tiene numerosas aplicaciones tanto dentro de la práctica médica como en la investigación básica. Algunos de estos modelos han contribuido a la prevención y el tratamiento de la toxicidad ambiental y accidental de ciertas drogas, debido a que permitieron la caracterización de sus mecanismos de acción. Además, la hepatotoxicidad experimental resulta fundamental para la evaluación de los potenciales efectos tóxicos de nuevos fármacos, previo a su introducción en el mercado. Finalmente, esta herramienta ha sido extensamente utilizada para estudiar la fisiología y patofisiología hepática, aplicando el principio enunciado por Claude Bernard: *“La inducción de lesiones es una herramienta útil para el estudio de los procesos fisiológicos”*. El establecimiento de modelos experimentales de daño hepático ha permitido el estudio del rol del hepatocito en la síntesis de proteínas y factores de coagulación, en el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y hormonas, en la formación de bilis, el transporte y metabolismo de drogas, entre otros importantes procesos fisiológicos (Zimmerman, 1999).

Los hepatotóxicos tioacetamida (TA), tetracloruro de carbono (TC), D-galactosamina (GA) y acetaminofeno (AA) son empleados frecuentemente en estudios de toxicidad experimental para la elucidación de mecanismos generales de daño, para evaluar tratamientos hepatoprotectores e identificar potenciales biomarcadores (Manibur Rahman y Hodgson, 2000; Mehendale, 2005; Zimmerman, 1999). Si bien estos cuatro tóxicos tienen diferentes mecanismos de acción, en todos los casos la lesión característica producida es una necrosis en la zona perivenosa del lobulillo hepático.

##### *2.1.4.1.1. Hepatotoxicidad inducida por tioacetamida*

La TA es un compuesto orgánico blanco, cristalino, empleado inicialmente como fungicida en cultivos de naranjas. A partir del conocimiento de los efectos tóxicos de la TA, se limitó su uso para cultivo y actualmente se utiliza en las industrias textiles, del cuero y papeleras (Sittig, 1985). Sin embargo, el principal uso que se le da en la actualidad es como modelo de toxina para el estudio de la hepatotoxicidad. También se emplea como modelo de hepatocarcinogenesis y cirrosis, ya que su administración crónica produce estas patologías (Zimmerman, 1999).

La activación de la TA a su metabolito tóxico ocurre mediante dos oxidaciones, generando en principio TA-S-óxido (TASO) y luego TA-S,S-dióxido (TASO<sub>2</sub>; Figura 4). Este último reacciona con proteínas modificando las cadenas laterales de lisina, lo cual lleva a la pérdida de su función y a la citotoxicidad. Además, estos metabolitos reactivos inician la necrosis hepática al unirse covalentemente a diferentes macromoléculas. También se generan especies reactivas del oxígeno como productos secundarios de la oxidación microsomal de la TA, los cuales consumen el GSH generando estrés oxidativo en las células, contribuyendo con el daño hepático (Zimmerman, 1999). La oxidación de TA y TASO puede ser llevada a cabo mediante el citocromo (CYP) 2B, el CYP2E1 y la flavina monooxigenasa (FMO), pero las contribuciones relativas de estas enzimas dependen de las condiciones (Hajovsky y col., 2012; Wang y col., 2000).

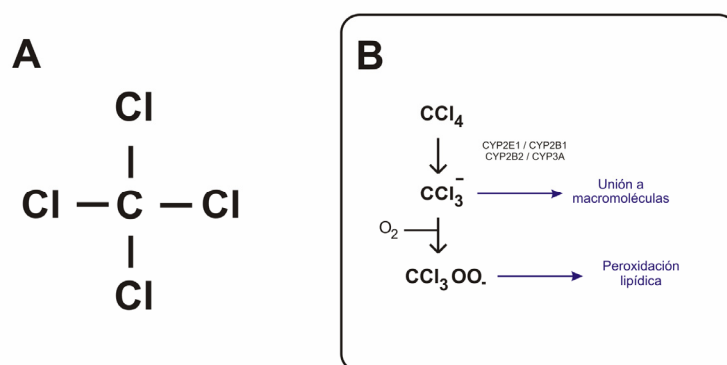


**Figura 4. Metabolismo de la tioacetamida (TA).** A) Estructura molecular de la TA. B) La TA sufre una S-oxidación reversible a TA-S-óxido (TASO). Una siguiente oxidación genera la especie altamente reactiva TA-S,S-dióxido (TASO<sub>2</sub>), que altera las macromoléculas produciendo daño celular.

#### 2.1.4.1.2. Hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono

El TC es una hepatotoxina clásica. Es un compuesto orgánico halogenado, presente en estado líquido, incoloro, casi insoluble en agua. Inicialmente, este compuesto fue utilizado para la fabricación de refrigerantes y propelentes de aerosoles, como solvente de aceites, grasas, barnices y resinas, como fumigante de cereales y como agente secador de aire. Luego, al igual que la TA, se limitó su uso sólo para propósitos industriales (Zimmerman, 1999).

El TC ( $\text{CCl}_4$ ) es activado por los citocromos CYP2E1, CYP2B1 o CYP2B2 y, posiblemente, CYP3A, formando el radical triclorometil,  $\text{CCl}_3^*$  (Figura 5). Este radical puede unirse a moléculas celulares (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos), alterando procesos celulares cruciales como el metabolismo de lípidos, lo cual conduce a la esteatosis. También puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical triclorometilperóxido,  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ , un metabolito altamente reactivo que inicia la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, la cual destruye los ácidos grasos poliinsaturados, en particular aquellos asociados con los fosfolípidos. Esto afecta la permeabilidad de membranas mitocondrial, del retículo endoplasmático y plasmática, lo cual altera el secuestro y la homeostasis del calcio, que a su vez produce un daño severo en la célula. Todo esto viene acompañado por la activación de células del sistema inmune, que conlleva a un mayor daño por la liberación de citoquinas y radicales de oxígeno (Weber y col., 2003).



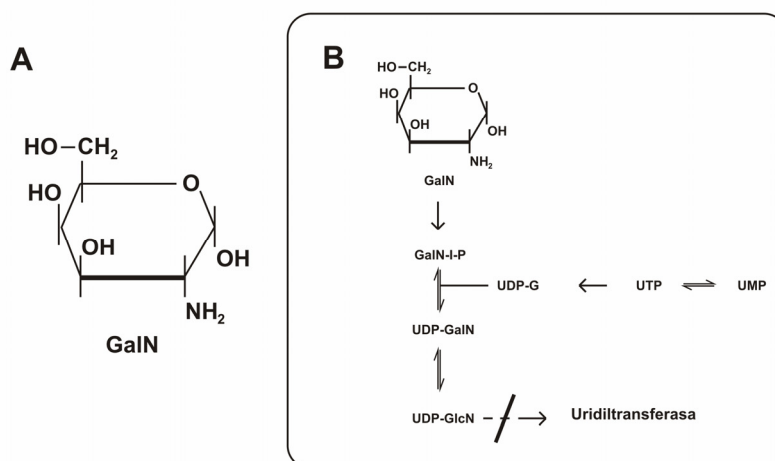
**Figura 5. Metabolismo del tetracloruro de carbono (TC).** A) Estructura molecular del TC. B) El metabolismo del TC comienza con la formación del radical triclorometil ( $\text{CCl}_3^*$ ) por la acción del sistema del citocromo P450. El  $\text{CCl}_3^*$  reacciona con macromoléculas produciendo daño celular. En presencia de oxígeno, el radical  $\text{CCl}_3^*$  es convertido al triclorometilperóxido,  $\text{CCl}_3\text{OO}^*$ , una especie mucho más reactiva que produce peroxidación lipídica, lo cual altera las funciones celulares debido a la disrupción de membranas y a la unión covalente de intermediarios de la reacción en cadena.

#### 2.1.4.1.3. Hepatotoxicidad inducida por D-galactosamina

La GA es un aminoácido simple, soluble en agua, que se encuentra naturalmente en las glicoproteínas y mucopolisacáridos de muchos tejidos animales. Es utilizado exclusivamente en

modelos animales de hepatotoxicidad, y ha servido como modelo para el estudio de los mecanismos de daño hepático, del metabolismo de drogas, entre otros aspectos patofisiológicos (Zimmerman, 1999).

El metabolismo hepático de la GA (Figura 6) depende de la vía metabólica de la galactosa, y genera uridina difosfato (UDP)-glucosamina (UDP-GlcN). Este compuesto, a diferencia de la UDP-glucosa (producto del metabolismo de la galactosa) no sirve como dador de uridilato (UMP) en la reacción de la uridiltransferasa\*, lo cual lleva a un “atrapamiento” del UMP. La velocidad de atrapamiento excede la capacidad del hígado adulto de generar UMP, y esto lleva a una importante disminución en los niveles de UDP-glucosa, UDP-galactosa, uracil tri-fosfato (UTP), uracil di-fosfato (UDP), y UDP-glucuronato. Esto, a su vez, provoca un importante daño celular por la disminución en la síntesis de ARN y ADN, proteínas, estructuras de membrana, glucosa y lípidos (Coen y col., 2007).



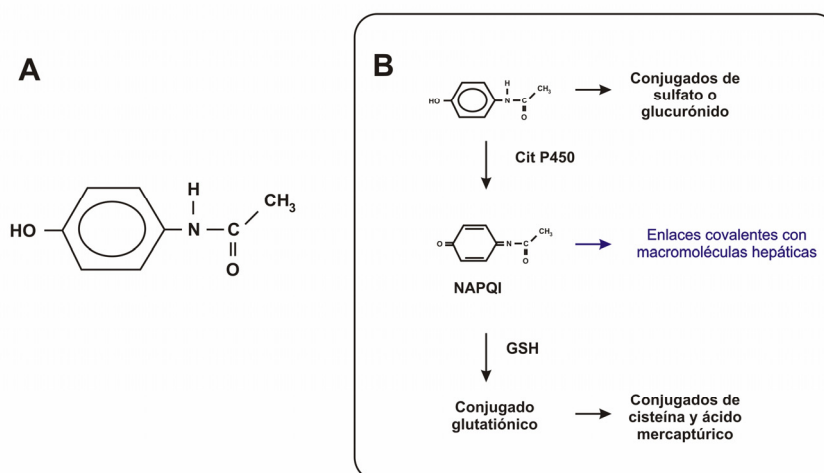
**Figura 6. Metabolismo de la D-galactosamina (GA).** A) Estructura molecular de la GA. B) El metabolismo de la GA produce uridina difosfato (UDP)-glucosamina (UDP-GlcN), el cual no puede ser incorporado en la ruta habitual de catabolismo de la galactosa. Esto produce una depleción en los niveles de UMP, lo cual conduce a una disminución en la síntesis de ARN y proteínas.

#### 2.1.4.1.4. Hepatotoxicidad inducida por acetaminofeno

El AA (paracetamol) es un fármaco con propiedades analgésicas que, a bajas dosis, normalmente no produce efectos secundarios. Sin embargo, es un potente hepatotóxico cuando se consume en altas dosis o en personas con susceptibilidad aumentada.

\* Uridiltransferasa: enzima responsable de convertir la galactosa ingerida a glucosa

Aproximadamente el 80% del AA es convertido a conjugados de glucuronato y sulfato. Una menor proporción (menos del 5%) se convierte, vía CYP2E1, CYP1A2 y CYP3A4, al metabolito activo imina *N*-acetil-*p*-benzoquinona (NAPQI), que reacciona inmediatamente con GSH. El compuesto resultante se conjuga con ácido mercaptúrico o cisteína (Figura 7). Cuando la cantidad de NAPQI formada excede la disponibilidad de GSH para su neutralización, el exceso del metabolito se une a moléculas celulares y produce necrosis y disfunción mitocondrial. Una producción incrementada del metabolito activo (por altas dosis de AA) o una disminución en las reservas de GSH potencia la toxicidad por AA. Ciertas drogas inducen isoformas claves de CYP encargadas de la biotransformación del AA, y de esta manera potencian el daño generado. Por ejemplo, el etanol induce la expresión de CYP2E1, y es conocido el hecho de que pacientes alcohólicos presentan una susceptibilidad aumentada a la toxicidad por AA. Un ayuno prolongado causa una depleción en los niveles de GSH, lo cual potencia también su toxicidad (Zimmerman, 1999).



**Figura 7. Metabolismo del acetaminofeno (AA).** A) Estructura molecular de AA. B) El AA es metabolizado principalmente formando conjugados con sulfato o ácido glucurónico, y una menor proporción es activado por citocromos P450, generando el metabolito activo imina *N*-acetil-*p*-benzoquinona (NAPQI), el cual es detoxificado por glutatión (GSH).

Si bien estos cuatro tóxicos se emplean como modelos clásicos de hepatotoxicidad, el modelo de dos etapas propuesto por Mehendale (Figura 3) fue particularmente caracterizado en los modelos de daño inducidos por TC y TA (Apte y col., 2003; Cai y Mehendale, 1991; Calabrese y Mehendale, 1996; Kodavanti y col., 1989; Mangipudy y col., 1995a; Mangipudy y

col., 1995b; Mangipudy y col., 1996; Mehendale 1995a; Mehendale 1995b; Mehendale y col., 1994; Rao y col., 1997; Rao y Mehendale, 1991; Wang y col., 2000). Fundamentalmente, la posibilidad del empleo de colchicina (un agente antimitótico) en estos modelos permitió demostrar la importancia de los procesos de proliferación celular en la resultante final de un evento tóxico. Tratamientos con colchicina convierten dosis de TA o TC sub-letales en 100% letales, debido a la progresión del daño en ausencia de un mecanismo reparador compensatorio (Mangipudy y col., 1996, Rao y Mehendale, 1991).

#### **2.1.5. Hepatotoxicidad y alteración del patrón de expresión génica**

La respuesta de un sistema biológico a un xenobiótico involucra la modificación de la expresión de varios miles de genes en un corto período de tiempo. Entre estos genes se encuentran los que participan directamente en el mecanismo de toxicidad y otros involucrados en la respuesta de recuperación del tejido frente a la injuria (Mehendale, 2005). Esto se ha verificado experimentalmente mediante la evaluación de los perfiles de expresión génica en experimentos de microarreglos (Gant y Zhang, 2005).

## 2.2. Real Time qPCR

*“A veces, una idea viene hacia ti cuando no la estás buscando. A través de una combinación improbable de coincidencias y errores con suerte, esa revelación me encontró una noche de viernes en Abril de 1983, en un camino del norte de California a la luz de la luna ”(...) “Frené el auto nuevamente y comencé a dibujar líneas de moléculas de ADN hibridándose y extendiéndose. Jennifer protestó nuevamente. ‘No vas a creer esto. Es increíble’, le dije alardeando. Ella rehusó a despertarse.” (...) “Fue difícil dormir aquella noche con las bombas desoxirribonucleicas explotando en mi cabeza”.*

*Kary Banks Mullis  
Inventor de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)  
Premio Nobel de Química de 1993*

### 2.2.1. Historia

Inicialmente, la cuantificación de ácidos nucleicos se llevaba a cabo mediante el agregado de UTP marcado radiactivamente a cultivos celulares y la posterior determinación de la incorporación de la marca por precipitación con ácido tricloroacético (TCA). Sin embargo, ésta técnica sólo permitía estudiar cambios globales en la población de ácidos nucleicos, y no permitía la identificación y cuantificación de genes o transcritos específicos (Dorak, 2006). El primer avance en la identificación de genes específicos llegó con el desarrollo de la técnica *Southern blot*, la cual fue seguida por el *Northern blot*, para ARNs. Ambos casos implicaban la hibridación de sondas marcadas radiactivamente a membranas sobre las cuales se habían fijado fragmentos de ADN o ARN. Sin embargo, ninguna de estas técnicas eran cuantitativas, sino semicuantitativas. Posteriormente, la técnica de protección del ARN frente a RNasas permitió la incorporación de ciertas ventajas. Esta consistía en la hibridación del ARN de interés con un ARN sintético antisentido marcado radiactivamente, y el producto ARN doble hebra, de esta forma, estaba protegido del ataque de RNasas de simple hebra. Finalmente, los productos de ARN doble hebra eran separados en una electroforesis en gel de poliacrilamida (Dorak, 2006).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fue introducida por Kary B. Mullis en 1983 (Mullis, 1990), por la cual fue galardonado con el premio Nobel en Química en 1993. Es difícil imaginar alguna otra técnica de laboratorio que haya tenido semejante impacto en tantos aspectos diferentes de la biología, como la PCR. Algunas de sus aplicaciones incluyen: secuenciación de ADN, determinación de huellas dactilares, tests de

parternidad, detección de enfermedades hereditarias, clonación de genes, mutagénesis dirigida, entre otros. En combinación con la reacción de transcripción reversa (RT), la PCR permite identificar transcritos específicos a partir de muy poca cantidad de material de partida. La determinación de expresión génica resulta esencial para el monitoreo de la respuesta biológica a varios estímulos. La reacción de PCR consiste en una replicación enzimática *in vitro* del ADN mediante una ADN polimerasa termoestable, empleando ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí y para hibridar los oligonucleótidos cebadores, iniciadores de la reacción. Debido a la naturaleza doble hebra del ADN, el material se duplica en cada ciclo de amplificación.

Desde su invención, el siguiente desafío fue convertir a la PCR en una técnica cuantitativa. Dos estrategias fueron desarrolladas para tal fin (PCR Comparativa y PCR Competitiva), sin embargo, la PCR en Tiempo Real Cuantitativa (*Real Time* PCR o RT-qPCR), desarrollada en 1996 por Heid y colaboradores (Heid y col., 1996) superó todas las limitantes encontradas hasta el momento y revolucionó el campo de la biología molecular. En esta técnica se incorpora a la reacción de PCR una señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de producto formado. Esta señal fluorescente pueden ser, por ejemplo, agentes intercalantes al ADN (como SYBR Green) o sondas marcadas fluorescentemente (TaqMan). La señal es recolectada continuamente en cada reacción de PCR y en todos los ciclos de amplificación, lo cual genera una curva sigmoidea que permite obtener datos numéricos para convertir la PCR en una reacción cuantitativa.

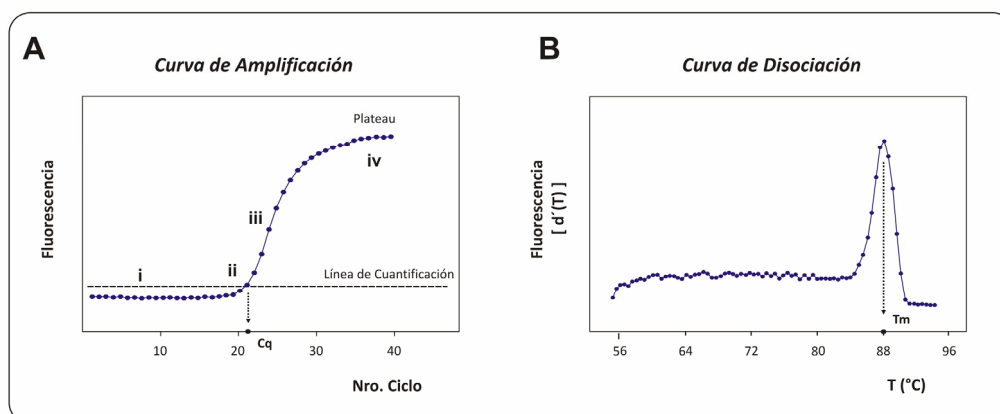
Actualmente, la RT-qPCR es la técnica de elección para la cuantificación de ARN debido a su amplio rango dinámico, elevada sensibilidad, precisión y especificidad. Además, requiere muy poca cantidad de material de partida y no requiere procedimientos post-amplificación (Wong y Medrano, 2005). Debido a estas características, es ampliamente utilizada tanto en la ciencia básica como en la clínica o industria. La introducción de la RT-qPCR en laboratorios de microbiología y virología clínica ha mejorado significativamente el diagnóstico de enfermedades infecciosas, permitiendo cuantificar la carga viral con alta sensibilidad y tipificar distintas cepas de virus y bacterias, así como identificar cepas resistentes (Dorak, 2006).

### 2.2.2. RT-qPCR empleando SYBR Green

El SYBR Green es un colorante fluorescente que se une únicamente a moléculas de ADN doble hebra (ADNdh). La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADNdh. En una reacción de PCR, la presencia de ADN cromosómico o ADNc es mínima, por lo tanto, el único ADNdh presente en cantidad suficiente como para ser detectado es el producto de la reacción de PCR. En los ciclos iniciales, la señal fluorescente emitida por SYBR Green unido al producto ADNdh es demasiado débil y generalmente se encuentra debajo del límite de detección del equipo. En la fase exponencial de la PCR, la fluorescencia se duplica en cada ciclo, y es seguida por una fase lineal de amplificación. Luego de 30 o 35 ciclos, la intensidad de la señal llega a un *plateau*, indicando que la reacción está saturada (Figura 8 A). El parámetro cuantificable de la reacción de RT-qPCR es el denominado ciclo de cuantificación (**Cq**), y representa el número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar un nivel de fluorescencia que supere el umbral de detección (línea de cuantificación o *threshold*). La línea de cuantificación debe cortar todas las curvas de amplificación en su fase exponencial (Figura 8 A). Una muestra que genere una curva con valor bajo de Cq significa que requiere pocos ciclos de amplificación para superar la fluorescencia basal, y por lo tanto, que contiene mucha cantidad inicial de ADNc. Dicho de otra manera, el valor de Cq se correlaciona inversamente con la cantidad inicial del transcripto de interés (Dorak, 2006).

Una desventaja del uso de SYBR Green como agente intercalante es que éste no discrimina entre diferentes productos de PCR, ya que se une a todos los ADNdh, incluyendo productos no específicos como los que se forman a partir de los dímeros de cebadores. Esto exige metodologías que evalúen la especificidad de los productos de amplificación, como la realización de una curva de disociación (o curva de *melting*), una vez finalizada la reacción de PCR (Figura 8 B). En este procedimiento, la intensidad de fluorescencia emitida por el SYBR Green intercalado en los productos de PCR se recolecta en puntos sucesivos de una rampa de temperaturas, desde 55°C a 95°C con pequeños incrementos. Este aumento de temperatura gradual desnaturaliza el ADNdh, e induce una reducción en la fluorescencia, que aparece como una caída aguda en la intensidad de la señal cuando las dos hebras se separan completamente. Al aplicar la función derivada de esta curva, se obtiene un gráfico como el de la Figura 8 B. Debido a que la temperatura de disociación (o de *melting*,  $T_m$ ) de un dúplex de ADN depende de la longitud y la composición de bases, el número de picos presente en la curva de disociación indica el número de productos de PCR generados (incluyendo dímeros de

cebadores). La presencia de picos múltiples indican la formación de productos de amplificación no específicos (Benes y Castoldi, 2010).



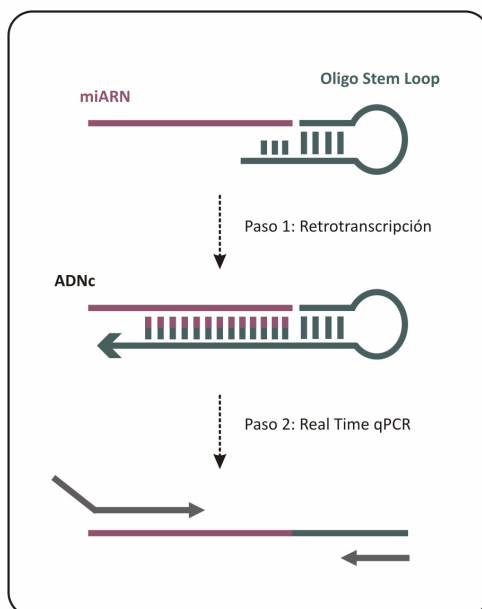
**Figura 8. Representaciones gráficas de curvas de amplificación y disociación.** Una curva de amplificación (A) presenta cuatro fases: i) una línea de base, donde la señal se encuentra por debajo del límite de detección del equipo, ii) un aumento exponencial de fluorescencia, iii) un aumento lineal, iv) una fase *plateau*, donde ya no hay aumento de la señal. La curva de disociación (B) es construida mediante incrementos sucesivos de 0.5 °C, en un rango de 55 – 95 °C. Cada pico obtenido refleja la degradación de un único producto de PCR.

### 2.2.3. Stem-Loop RT-qPCR

La determinación de la expresión de micro ARNs (miARNs) con alta sensibilidad y especificidad es un desafío importante ya que éstos presentan ciertas características que dificultan su determinación por técnicas convencionales: i) son moléculas cortas (22 nucleótidos); ii) son heterogéneos en su contenido GC, que resulta en un intervalo relativamente grande de  $T_m$  de sus productos ADNdh; iii) no tienen secuencias características comunes que facilitarían su purificación selectiva (como cola de poly-A); iv) la secuencia a amplificar se encuentra presente también en los precursores del miARN; y v) miARNs dentro de una misma familia pueden diferir por un único nucleótido.

Chen y colaboradores (Chen y col., 2005) desarrollaron una nueva metodología, denominada *Stem-Loop* Rt-qPCR, para la amplificación y cuantificación selectiva de miARNs. En esta técnica, el miARN es hibridado con un oligonucleótido específico en forma de tallo y burbuja (*stem-loop*) para iniciar la reacción de RT, y el ADNc resultante es utilizado como molde para la reacción de qPCR, con un oligonucleótido específico para el miARN y un segundo

oligonucleótido, universal (Figura 9). Los oligonucleótidos *stem-loop* presentan: i) un extremo simple hebra corto que es complementario al extremo 3' del miARN; ii) una región doble hebra (tallo, o *stem*) y iii) una región final en forma de *loop*, que contiene la secuencia para la unión del oligonucleótido universal. La estructura *stem-loop* del oligonucleótido reduce la probabilidad de hibridación con los precursores pri-miARN y pre-miARN, con lo que se aumenta la especificidad de la reacción (Benes y Castoldi, 2010). El cebador directo, específico del miARN contiene una cola sobresaliente en el extremo 5', de manera de aumentar la temperatura de hibridación ( $T_m$ ), dependiendo de la composición de secuencia del miARN.



**Figura 9. Descripción esquemática de la técnica Stem Loop RT-qPCR.** La técnica incluye dos pasos: 1) retrotranscripción (RT) con oligonucleótido Stem Loop (SLO) y 2) cuantificación por Real Time PCR. Los SLO se unen a la región 3' del miARN e inician la RT. Luego, el producto es amplificado mediante Real Time PCR convencional, incluyendo un cebador directo específico del miARN, y un cebador reverso universal.

#### 2.2.4. Cuantificación absoluta y cuantificación relativa

La determinación de la expresión génica por RT-qPCR puede realizarse mediante una cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta permite obtener el número de copias exacto de transcripto, y requiere de la construcción de una curva de calibración. El resultado se expresa típicamente como número de copias por célula, y se emplea cuando es necesario conocer la cantidad precisa de un amplicón, como por ejemplo, en la determinación de cargas virales. En cambio, en la cuantificación relativa, la expresión de un transcripto en una muestra se presenta como relativo a otra muestra, denominada calibrador (generalmente, es

el grupo control), y los resultados se expresan como tasas de cambio (Schmittgen y Livak, 2008).

#### **2.2.5. Validación de una reacción de amplificación por Real Time PCR**

La eficiencia de amplificación de una reacción de PCR es la razón con la cual un amplicón es generado, y se expresa comúnmente como un porcentaje. Si un amplicón duplica su cantidad durante la fase exponencial de amplificación, entonces la eficiencia de la reacción es del 100%. Eficiencias dentro del rango 90 – 110 % se consideran aceptables. Reacciones poco eficientes pueden resultar en una mayor variabilidad de los resultados de replicados, y como consecuencia, disminuir la calidad de la cuantificación. Además, una pequeña disminución en la eficiencia de amplificación puede afectar significativamente al producto final de la reacción. Este parámetro puede verse notablemente afectado por numerosas variables como:

- concentración de  $Mg^{2+}$ , dNTPs, cebadores
- secuencia de cebadores
- presencia de inhibidores
- cantidad de material de partido
- tamaño del amplicón
- rango lineal de la reacción
- temperatura de hibridación de cebadores

Es por esto que resulta indispensable la validación de una nueva reacción con un par de cebadores, ya sea de los genes de referencia como de los genes de interés, evaluando todas las variables mencionadas y realizando un control de la eficiencia de amplificación, tal como se menciona en la sección “Síntesis de ADNc y Real Time qPCR” de Materiales y Métodos. Además de la eficiencia de amplificación, es necesario corroborar la amplificación específica de los cebadores mediante el análisis de la curva de disociación y la obtención de una única banda del tamaño esperado en una corrida electroforética.

#### **2.2.6. Normalización**

La RT-qPCR es una técnica compleja que es el resultado de la combinación de tres etapas: a) transcripción reversa (RT) del ARN inicial; b) amplificación del ADNc por PCR; c) detección y cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real. Si bien esta técnica se convirtió en el estándar de oro para la cuantificación de ARNs, existen ciertas preocupaciones

importantes a considerar, que tienen un impacto directo sobre la confiabilidad de las determinaciones. Principalmente, estas son: i) los resultados dependen de la cantidad de material de partida, de la calidad y la optimización del ensayo; ii) la reacción de RT no estandarizada puede ser muy variable; y iii) el análisis de los datos es altamente subjetivo y, de realizarlo inapropiadamente, puede ofuscar el resultado final. Por tales motivos, resulta esencial minimizar la variabilidad y maximizar la reproducibilidad de la técnica mediante la optimización de la calidad de cada etapa (Nolan y col., 2006).

Para obtener información confiable y precisa es necesario corregir las variaciones no biológicas de las mediciones de niveles de expresión génica que pueden ser introducidas experimentalmente, como por ejemplo: diferencias en la eficiencia de la purificación de ARN y en la reacción de retrotranscripción, y diferencias en la cantidad inicial del material de partida utilizada (puntos i y ii del párrafo anterior). El objetivo de la **normalización** es reducir la variación técnica para permitir observar la variación biológica debido a un tratamiento. El concepto de normalización se aplica para cada una de las etapas múltiples de la RT-qPCR, e implica estandarizar la mayor cantidad de variables, como: masa de tejido procesado, cantidad inicial de ARN para la reacción de RT, cantidad de ADNc para reacción de PCR, concentración de oligonucleótidos, etc.

La normalización empleando genes de referencia (GR) es el método de elección para la minimización de la variabilidad técnica de la RT-qPCR. Por definición, los niveles de expresión de los GR deberían ser estables en las muestras provenientes de los distintos grupos experimentales en estudio. La profunda evaluación de los GR a emplear no es trivial, ya que se desconoce la existencia de un GR universal que se exprese establemente en todos los tejidos o en todas las situaciones fisiológicas y/o fisiopatológicas experimentales (Hellemans y col., 2007). La identificación y validación de los GRs óptimos para utilizar en un determinado modelo es un proceso crucial ya que, en última instancia, de éstos depende la exactitud resultante del nivel de expresión del gen de interés reportada. Además, el empleo de una estrategia de normalización incorrecta puede crear diferencias de expresión génica artificiales u ocultar diferencias reales entre grupos experimentales (Dorak, 2006).

La creciente preocupación respecto de la optimización de los métodos de normalización mediante GRs ha llevado al desarrollo de varios algoritmos matemáticos, como: BestKeeper (Pfaffl y col., 2004), GeNorm (Vandesompele y col., 2002) y NormFinder (Andersen y col., 2004), cuyo objetivo es determinar la estabilidad de los GRs. Además, mediante el *software*

RankAggreg, es posible comparar listas de genes ordenados de acuerdo a su estabilidad, generada por cada uno de los algoritmos mencionados, para obtener un ranking definitivo de GRs (Pihur y col., 2009). Sin embargo, hasta el momento no ha sido desarrollada una estrategia completa que permita evaluar posibles GR en su totalidad, incorporando, además del estudio mediante los *software* mencionados, la evaluación del número de genes óptimo a utilizar.

## 2.3. Regulación de la expresión génica mediada por micro-ARNs

*“A medida que la ciencia progresa y nuestros conocimientos se expanden, pensamos que lo comprendemos todo, y tendemos a volvernos sobre-confiados. Creo que siempre subestimamos la complejidad de la vida y de la naturaleza. El día de hoy es un día de celebración a esa belleza y esa complejidad”.*

*Craig C. Mello*

*Co-descubridor del fenómeno de ARN de interferencia*

*En el día de su recepción del Premio Nobel de Fisiología o Medicina, 2006*

### 2.3.1. Historia

Cuando se completó el Proyecto Genoma Humano, se estimó que el número de genes codificantes de proteínas contenidos en el genoma era entre 20.000 y 25.000, mucho menor al predicho inicialmente (100.000) en base a la longitud del mismo. Esta cantidad no es significativamente mayor al número de genes encontrados en organismos considerados “menos complejos”, tales como *C. elegans* (alrededor de 20.000 genes) y *Drosophila melanogaster* (alrededor de 13.500 genes). Todos los genes conocidos y supuestos genes representan un pequeño porcentaje (alrededor del 1.5 – 2 %) del genoma entero. Estas observaciones, sin embargo, son indicadores pobres de la real complejidad de la genética en humanos. Se estima que la mayor parte del genoma humano no codifica proteínas sino ARNs estructurales y regulatorios (Erson y Petty, 2008). La hipótesis más aceptada en la actualidad propone que la mayor complejidad genética de los eucariotas superiores resulta de las interacciones de redes regulatorias de la expresión génica, cada vez más grandes y entramadas (Mattick, 2007). La gran cantidad de regiones no codificantes de los organismos eucariotas es una característica que los distingue de los genomas de procariotas más compactos y simples. Se postula que estos niveles de control más sofisticados fueron la característica clave que permitió la evolución hacia la multicelularidad y el subsiguiente aumento en la complejidad fenotípica y diversidad encontrada en los organismos superiores (Mattick, 2007).

Fue recién en la década del '90 donde una serie de observaciones y experimentos llevaron al descubrimiento de un mecanismo regulatorio inesperado que involucra a transcritos no codificantes de proteínas (Almeida y col., 2011). En el año 1990, Napoli y colaboradores (Napoli y col., 1990) realizaron investigaciones para determinar si la chalcona sintasa, una enzima clave en la biosíntesis de flavonoides, era la enzima limitante de la biosíntesis de

antocianina en plantas. La vía de síntesis de antocianina es la responsable de la coloración violeta intensa en petunias. En un intento de generar petunias violetas, estos investigadores sobreexpresaron el gen codificante de chalcona sintasa. Sin embargo, contrario a lo esperado, obtuvieron plantas blancas. Tanto los niveles endógenos como exógenos de chalcona sintasa resultaron 50 veces menores que en las plantas salvajes, y esta observación les llevó a hipotetizar que el transgen introducido estaba “cosuprimiendo” al gen endógeno. En animales, este fenómeno fue notificado por primera vez en 1995 por Guo y Kempfues (Guo y Kempfues, 1995), quienes observaron que la introducción de ARN antisentido contra el ARNm de par-1 resultaba en la degradación de este ARNm en *Caenorhabditis elegans*. Se pensó que la hibridación de este ARN con el ARNm endógeno formaba un ARN doble hebra (ARNdh), el cual inhibía la traducción o resultaba ser un blanco para la degradación por ribonucleasas celulares (Sen y Blau., 2006). Sin embargo, la introducción de ARN sentido (que no hibridaría con el ARNm endógeno) también producía la degradación del transcripto. Más tarde, en 1998, Fire y Mello demostraron que los desencadenantes del fenómeno de silenciamiento no eran las moléculas de ARN simple hebra, sino doble hebra. Ellos observaron que las moléculas de ARN simple hebra (sentido o antisentido) resultaban de 10 a 100 veces menos efectivas que el ARNdh silenciando al mismo ARNm (Fire y col., 1998).

El primer ARN pequeño en ser identificado fue *lin-4*, en *C. elegans*, algunos años antes del descubrimiento de la “cosupresión” en este organismo (Lee y col., 1993). *Lin-4* actúa regulando negativamente los niveles de la proteína LIN-14, y es esencial para el control temporal del desarrollo post-embrionario. Este ARN pequeño fue identificado mediante el aislamiento de una mutante nula que provocaba problemas en el desarrollo. El grupo de trabajo de Lee identificó un fragmento de 700 pares de base (pb) que contenía al gen *lin-4* pero que no contenía los codones convencionales de iniciación y finalización de la traducción. A pesar de ello, introdujeron mutaciones en el probable marco abierto de lectura, pero la función de *lin-4* no se vio modificada. Concluyeron, entonces, que *lin-4* no codifica una proteína (Almeida y col., 2011). Además, identificaron dos transcriptos pequeños de *lin-4* de aproximadamente 22 y 61 nucleótidos (nt), que contenían secuencias complementarias a un elemento de secuencia repetida en la región 3' no traducida (UTR) del ARNm LIN-14, sugiriendo que *lin-4* regula la traducción de LIN-14 vía una interacción ARN-ARN (Lee y col., 1993).

El miARN Let-7a fue el segundo ARN pequeño en ser descubierto, en el año 2000 (Reinhart y col., 2000). Al igual que *lin-4*, este miARN tiene un rol en el desarrollo de la larva de

*C.elegans*. La secuencia de Let-7a se encuentra conservada entre especies, desde la mosca hasta los humanos, y esta observación desencadenó una revolución en la búsqueda de estos ARN pequeños no codificantes en otros organismos. Let-7a se detectó en vertebrados, moluscos, anélidos, ascidiáceos, artrópodos y hemicordados, pero no en plantas y organismos unicelulares (Almeida y col., 2011). En humanos se encuentra presente (en diferentes niveles de expresión) en la mayoría de los tejidos, incluyendo cerebro, corazón, hígado, riñón, pulmón, tráquea, colon, intestino delgado, vejiga, estómago y timo.

Desde su descubrimiento, miles de ARN pequeños han sido identificados en humanos y otras especies. Estudios recientes indican que tienen un rol fundamental en la mayoría de los eventos biológicos críticos, incluyendo el desarrollo, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, traducción de señales, desarrollo de órganos, diferenciación de linajes hematopoyéticos, interacciones huésped-virus y tumorigénesis. Datos recientes sugieren que los miARNs se expresan aberrantemente en varios cánceres humanos jugando un rol importante como oncogenes o supresores de tumores (Erson y Petty, 2008; Farazi y col., 2013). Actualmente, se predice que aproximadamente el 60% de los genes humanos están regulados por miARNs (Friedman y col., 2009), y que un único miARN potencialmente regula aproximadamente 200 transcritos diferentes, involucrados en distintas vías celulares (Krek y col., 2005).

### **2.3.2. ARN pequeños en animales**

#### 2.3.2.1. Clasificación de ARN pequeños

En el genoma de los animales existen al menos tres clases de ARN pequeños no codificantes, que se diferencian en su biogénesis y en sus mecanismos de acción: los ARN asociados a Piwi (piARNs), los ARN pequeños de interferencia (siARN, por sus siglas en inglés) y los microARN (miARNs; Kim y col., 2009). Los piARNs fueron los últimos en ser identificados y sus mecanismos y funciones son, por lo tanto, menos conocidos. Se encuentran en abundancia en células germinales y sus principales funciones se encuentran relacionadas a la protección de la integridad del genoma frente a los transposones (Siomi y col., 2011). La mayor parte de los piARN derivan de elementos repetitivos intergénicos (retrotransposones) y son moléculas de ARN simple hebra (Kim y col., 2009). Los siARN son generados a partir de moléculas de ARNdH y, mediante el proceso conocido como de ARN de interferencia (ARNi), silencian transcritos

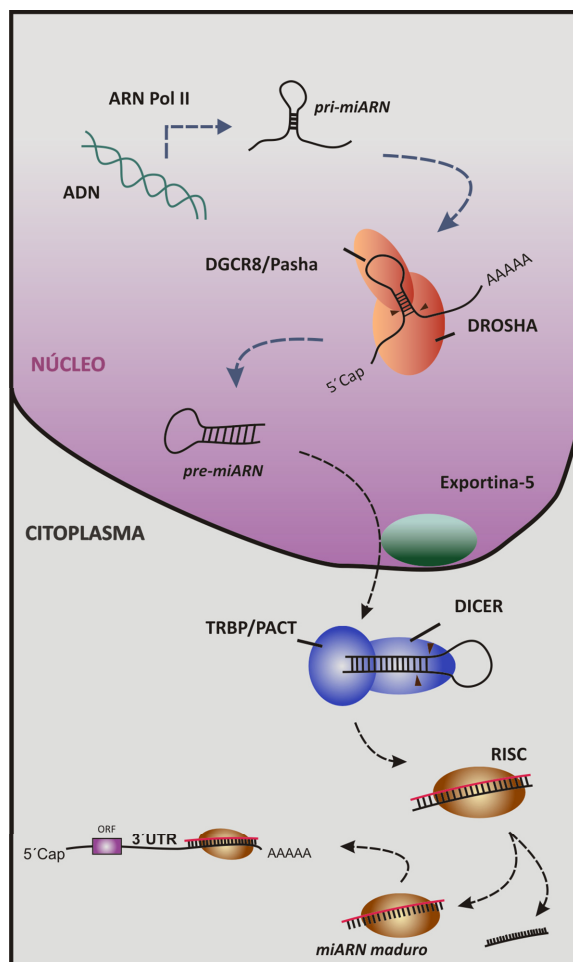
homólogos (Okamura y Lai, 2008). Este mecanismo sirve como defensa frente a virus (Li y col., 2002), a transposones y ARNdh endógenos generados por complementareidad de transcriptos y transcriptos con estructuras secundarias de tallo y burbuja (Umbach y Cullen, 2009). Los miARNs son la clase de ARN pequeños mayormente estudiados hasta el momento. A diferencia de los siARN, los miARNs son moléculas de simple hebra, y son generados a partir de transcriptos endógenos, codificados en el propio genoma.

#### 2.3.2.2. miARNs: función y biogénesis

Se postula que los miARNs median una regulación fina de la expresión génica (*fine tuning*), “ajustando” el fenotipo celular en procesos delicados como el desarrollo y la diferenciación en todos los organismos, desde plantas hasta animales. Muchas secuencias de miARNs se encuentran conservadas en organismos poco relacionados evolutivamente, sugiriendo que estas moléculas participan en procesos esenciales (Sevignani y col., 2006).

Los miARNs (de 21 a 23 nt) regulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los miARNs maduros en animales reconocen secuencias parcialmente complementarias en los ARN mensajeros blancos e inhiben su traducción o aceleran su degradación (Bartel, 2004). En los mamíferos, los miARNs son transcriptos, casi exclusivamente, por la ARN Polimerasa II, generando un transcripto miARN primario (pri-miARN) que contiene una o más estructuras de tallo y burbuja (horquilla o *hairpin*). Luego, dos reacciones subsecuentes y secuenciales (una en el núcleo y la otra en el citoplasma) procesan al pri-miARN para generar el miARN maduro (Figura 10). En el núcleo, el pri-miARN es procesado por un complejo multiproteico denominado Microprocesador, que genera un precursor (pre-miARN) con estructura de *hairpin* de aproximadamente 70 nt. Los dos componentes claves del Microprocesador son DROSHA (una enzima RNasa III) y DGCR8/Pasha, una proteína con dominio de unión a ARNdh. Este complejo también contiene una variedad de cofactores que le proveen fidelidad, especificidad y/o actividad al corte por DROSHA. El pre-miARN, producto de la reacción de DROSHA, contiene dos nt 3' sobresalientes, el cual es reconocido por la proteína Exportina-5, que transporta al pre-miARN hacia el citoplasma. Allí, es posteriormente procesado a un miARN maduro de 21 a 23 nt por otra RNasa III, denominada DICER, en colaboración con las proteínas de unión a ARNdh: TRBP/PACT. Luego, las dos hebras del miARN son separadas, y una de ellas se asocia con la proteína AGO, la cual forma parte del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés).

Dentro de este complejo, el miARN guía a RISC a sitios complementarios dentro del ARNm blanco, para mediar la represión del mismo. En animales, esta complementariedad de secuencias no es perfecta.



**Figura 10. Procesamiento de los miARNs.** En el núcleo, los miARNs son transcritos por la ARN Polimerasa II, generando transcritos primarios (pri-miARNs). Los pri-miARNs, que contienen una cola de poli (A) y un cap 5', son procesados por el complejo Microprocesador, que consiste en una endonucleasa (DROSHA) y una proteína de unión al ARN (DGCR8/Pasha). Esta reacción genera una estructura de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-miARN), que es posteriormente transportada hacia el citoplasma por medio de la Exportina 5, en un proceso dependiente de GTP. Finalmente, el pre-miARN es reconocido por la endonucleasa DICER, en colaboración con TRBP/PACT (proteína de unión al ARN), para generar el miARN maduro final, doble hebra. Sólo una de las hebras del miARN maduro es incorporada en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que guía al miARN a sitios complementarios dentro del ARNm blanco para inhibir su traducción o alterar su estabilidad.

### 2.3.2.3. miARNs en enfermedades hepáticas

Los avances en técnicas aplicadas a la caracterización y el análisis funcional de miARNs permitieron revelar patrones anormales de expresión de miARNs en varias enfermedades. Se sabe que en el hígado los miARNs están involucrados en numerosos procesos fisiopatológicos, como por ejemplo, en la respuesta inmune hepática, en infecciones virales, en el hígado graso, en patologías inducidas por el alcohol, fibrosis y hepatocarcinomas (Bala y col., 2009).

Respecto del rol que cumplen los miARNs en el daño hepático inducido por drogas, el campo de investigación se encuentra recién en sus comienzos. Un estudio de microarreglos en

ratas demostró que una administración aguda de AA o TC induce un cambio en la expresión de numerosos miARNs en el hígado (Fukushima y col., 2007). Una administración crónica de tamoxifeno en roedores también produce alteraciones en el patrón de expresión de miARNs (Pogribny y col., 2007). Estas observaciones sugieren que los miARNs cumplen funciones importantes en el desarrollo de la respuesta toxicológica hepática, sin embargo, el rol preciso que cumplen los miARNs en la respuesta a xenobióticos aún no está claramente establecido. En el año 2006 se publicó el primer artículo en donde se demostraba la regulación de un Citocromo P450 (CYP1B1) por un miARN (miR-27b; Tsuchiya y col., 2006), y a partir de ese momento numerosos estudios demostraron que existen más de 20 enzimas metabolizadoras de drogas y receptores nucleares que pueden ser reguladas post-transcripcionalmente por miARNs (Yokoi y Nakajima, 2011; Yokoi y Nakajima, 2013).

#### 2.3.2.4. El miARN-122

##### *2.3.2.4.1. Generalidades y función*

El miARN-122 es cuantitativamente el principal miARN en el hígado, donde representa alrededor del 70% del pool total de miARNs hepáticos, y se encuentra prácticamente ausente en otros tejidos. Esta observación fue confirmada por análisis de protección contra RNasas, indicando que el miARN-122 se presenta en aproximadamente 66.000 copias por célula en el hígado adulto, siendo el miARN mayormente expresado en cualquier tejido conocido (Lagos-Quintana y col., 2002). La secuencia del miARN-122 maduro se encuentra completamente conservada en 18 especies diferentes, incluyendo humano, rata y pez cebra. Todas las especies en donde se encontró el miARN-122 son vertebrados, y no se detectaron ortólogos en *Drosophila* o *C. elegans*, sugiriendo que el miARN-122 evolucionó junto con el linaje de los vertebrados, posiblemente en paralelo con la emergencia del hígado (Jopling, 2012).

Las principales especulaciones acerca de la función del miARN-122 en el hígado provienen de su patrón de expresión espacio - temporal a lo largo del desarrollo del órgano, así como por su abundancia en las células parenquimáticas del mismo. Los niveles de miARN-122 en el hígado de ratón aumentan a la mitad de su valor máximo aproximadamente a los 17 días de la embriogénesis, y alcanza el nivel máximo luego del nacimiento. Debido a que su expresión comienza rápidamente luego de la formación del hígado, desde su descubrimiento se postuló que el miARN-122 jugaría un rol en la modulación de diversos genes que se expresan durante

el desarrollo fetal del hígado y luego disminuyen durante el desarrollo del mismo (Chang y col., 2004). Más tarde, el rol del miARN-122 en el establecimiento del patrón de expresión génica responsable de mantener el estado de diferenciación del tejido hepático fue caracterizado por distintos autores (Deng y col., 2013; Doddapaneni y col., 2013; Jung y col., 2011; Laudadio y col., 2012). La disminución de los niveles de expresión del miARN-122 se observó en situaciones de alta tasa de división celular, como en el caso de diferentes líneas celulares derivadas del hígado. Recientemente se han publicado trabajos que demuestran que el miARN-122 disminuye en células hepáticas en estado de indiferenciación y/o de alta tasa de división celular (Chen y col., 2011; Tsai y col., 2009; Xu y col., 2010; Zeng y col., 2010). Su expresión se encuentra disminuida en hepatocarcinomas, sugiriéndose que esta modificación es parte del mecanismo carcinogénico y proponiéndolo como marcador biológico de cánceres hepáticos (Gramantieri y col., 2007; Kutay y col., 2006; Xu y col., 2012).

A través de oligonucleótidos antisentido específicos se ha demostrado que la modificación *in vivo* de la expresión del miARN-122 produce alteraciones en varios genes, como por ejemplo, genes involucrados en el metabolismo del colesterol, de lípidos y de los ácidos grasos en los hepatocitos (Esau y col., 2006; Krutzfeldt y col., 2005). También se ha reportado que el miARN-122 interacciona directamente con la región 5' UTR del genoma del virus de hepatitis C favoreciendo la replicación del ARN viral, a partir de lo cual se ha sugerido que el este miARN podría representar un importante blanco para la terapia antiviral (Jopling y col., 2005).

En base a patrones de secuencias de nucleótidos de la interacción miARN-ARNm blanco y a observaciones empíricas, se han desarrollado numerosos algoritmos para la predicción de los genes blanco regulados por un miARN (Ritchie y col., 2013). Posteriormente, la confirmación de la interacción miARN-ARNm blanco puede realizarse a través de ensayos con genes reporteros. Por medio de estos experimentos, fue posible identificar y validar numerosos genes blancos del miARN-122 (Tsai y col., 2009), con funciones variables como: proliferación y diferenciación celular, apoptosis, transcripción de genes específicos, transporte de aminoácidos y proteínas, fosforilación de proteínas, interacción célula-célula. Entre estos genes, unos de los más estudiados hasta el momento son los codificantes del transportador de aminoácidos catiónicos 1 (CAT-1; Chang y col., 2004) y de la Ciclina G1 (Gramantieri y col., 2007).

#### 2.3.2.4.2. Regulación de la expresión del miARN-122

La biogénesis de los miARNs está regulada estrictamente, y la producción de un miARN maduro puede controlarse mediante la regulación de los múltiples pasos de su procesamiento: transcripción, corte por DROSHA y DICER, exportación hacia el citoplasma y alteración de la estabilidad del miARN final (Siomi y Siomi, 2010). Un aumento o una disminución en la expresión o actividad de las enzimas del procesamiento pueden resultar en un cambio global en los niveles de expresión de los miARNs. Este tipo de regulación global se observó en algunos cánceres humanos (Schmittgen, 2008), y también en modelos de regeneración hepática por hepatectomía parcial en ratas (Shu y col., 2011). Por otro lado, está ampliamente aceptado que los ARNm pueden ser estabilizados mediante el agregado de adeninas (A) al extremo 3'. Luego, se identificó a la poli(A) polimerasa citoplasmática GLD-2 como la responsable de este proceso en el miARN-122, el cual compite con el agregado de uracilos (U), que resultaría en el reclutamiento de exonucleasas 3'-5' y degradarían por completo al miARN. El balance entre los procesos de adenilación y uridilación determinaría los niveles finales del miARN-122 (Katoh y col., 2009). Posteriormente se observó que esta enzima era capaz de adenilar otros miARNs, indicando que éste podría representar un proceso global de estabilización de miARNs (D'Ambrogio y col., 2012).

La expresión de los miARNs también pueden ser regulados individualmente mediante factores que confieren especificidad y que responden a distintas condiciones fisiológicas o fisiopatológicas. En los últimos años, mediante trabajos de análisis del promotor del miARN-122 se identificaron factores de transcripción enriquecidos en hígado (LETFs) que se unen a secuencias específicas en el promotor del pri-miARN-122. Uno de ellos es el factor C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha*), el cual es una proteína que se expresa altamente en hígado y es un fuerte inhibidor de la proliferación celular (Zeng y col., 2010). El otro es el factor HNF4 $\alpha$  (*Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha*), una proteína receptora nuclear que se expresa mayoritariamente en hígado, intestino, riñón y páncreas (Li y col., 2011; Xu y col., 2010). HNF4 $\alpha$  es un factor clave para el desarrollo hepático y está involucrado en la regulación del metabolismo energético, como en la homeostasis de lípidos y de la glucosa. También se han identificado otros factores de transcripción pertenecientes a la familia HNF (HNF3 $\alpha$  y HNF1 $\beta$ ) que regulan la expresión del miARN-122, aunque su efecto es minoritario en comparación con los factores C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$  (Xu y col., 2010).

## *Objetivos*

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

El objetivo de este trabajo de Tesis es contribuir al conocimiento de los procesos de hepatotoxicidad, evaluando la participación de la regulación de la expresión génica por miARNs. En particular, se propuso estudiar el miARN-122 en modelos animales de hepatotoxicidad.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Establecer modelos experimentales de hepatotoxicidad aguda inducida por tóxicos en ratas: tioacetamida, tetracloruro de carbono, D-galactosamina y acetaminofeno.
2. Desarrollar una técnica de determinación de la expresión de ARNm y miARNs por Real Time qPCR en los modelos experimentales de hepatotoxicidad establecidos.
3. Estudiar la participación del miARN-122 en los modelos de hepatotoxicidad aguda: sus mecanismos regulatorios y funcionalidad.

# *Materiales y Métodos*

---

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos y animales empleados

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (300-350 g) del bioterio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario). Los animales fueron alimentados según una dieta estándar *ad libitum* y endocriadas bajo condiciones controladas de temperatura (21-23°C), humedad (45-50%) y ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Todos los animales fueron manipulados respetando la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR; Res. Nro 267/020) y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Uso de Animales de la misma facultad (BIO226, Res. Nro 544/2009).

### 4.2. Establecimiento de modelos de hepatotoxicidad aguda

Diferentes animales (n=5) recibieron una inyección única intraperitoneal de vehículo o diferentes dosis de cada hepatotóxico en estudio, y fueron sacrificados luego de 24 hs. Las dosis administradas de cada compuesto y los vehículos empleados para cada uno de ellos se indican en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Dosis administradas y vehículos empleados para cada uno de los hepatotóxicos estudiados

	TA	TC	AA	GA
<b>Vehículo</b>	SF: 6 ml/kg PC	AM: 4.4 ml/kg PC	CMC 1%: 10 ml/kg PC	SF: 6 ml/kg PC
<b>Dosis 1</b>	10 mg/kg	0.1 ml/kg	0.3 g/kg	0.2 g/kg
<b>Dosis 2</b>	50 mg/kg	0.4 ml/kg	0.6 g/kg	0.5 g/kg
<b>Dosis 3</b>	150 mg/kg	1.0 ml/kg	1.2 g/kg	0.9 g/kg

TA: tioacetamida; TC: tetracloruro de carbono; GA: D-galactosamina; AA: acetaminofeno; PC: peso corporal; SF: solución fisiológica; AM: aceite de maíz; CMC: carboximetilcelulosa;

Luego de las 24 hs, las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas por pneumotórax, y se recogieron muestras de sangre e hígado. El correcto establecimiento de los modelos de hepatotoxicidad por cada toxina fue confirmado mediante la determinación de los niveles de marcadores de daño hepático en suero y por examinación histopatológica.

#### 4.2.1. Determinaciones séricas de marcadores de daño hepático

Se recolectaron muestras de sangre por punción cardíaca y se centrifugaron por 5 minutos a 4.000 rpm a temperatura ambiente para separar el suero. Los niveles de ALT y AST fueron determinados mediante kits comerciales (Roche Diagnostics) en un Autoanalizador Modular Roche-Hitachi (Roche Diagnostics), con la colaboración de la Dra. Stella Danielle, del Área de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR.

#### 4.2.2. Evaluación histológica

Las muestras de hígado se fijaron en solución *buffer* Formol 10% por 24 hs a 4°C. Luego fueron incluidas en parafina para la obtención de cortes histológicos, que fueron posteriormente coloreados con hematoxilina y eosina. La valoración histopatológica se realizó mediante microscopía de campo claro, en colaboración con la Dra. Ana Lía Nocito, de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNR.

En base al análisis del estudio dosis-respuesta se decidió realizar los estudios posteriores en los hígados de ratas tratadas con la mayor dosis de cada hepatotóxico (n=5) y los hígados de ratas administradas con cada vehículo (n=5).

### **4.3. Purificación de ARN**

Se extrajo el ARN total de muestras de hígado y sangre total de ratas tratadas con los hepatotóxicos y con sus respectivos vehículos utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### 4.3.1. Procesamiento de muestras de hígado

Los hígados extraídos luego del sacrificio del animal fueron congelados inmediatamente en Nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -70°C. Para la purificación del ARN total, por cada muestra de hígado se colectaron cinco partes diferentes del tejido para obtener una muestra representativa, que se homogenizó previo enfriado en Nitrógeno líquido utilizando mortero y pilón. Se trabajó con 1 ml de TRIzol por cada 10 mg de tejido.

#### 4.3.2. Procesamiento de muestras de sangre entera

Se recolectaron muestras de sangre por punción cardíaca en tubos eppendorf (libres de RNasa) tratados con solución EDTA Anticoagulante (Wiener Lab), homogenizando

rápidamente. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la purificación del ARN. Se trabajó con 1 ml de TRIzol por cada 100  $\mu\text{l}$  de sangre.

La concentración y pureza del ARN obtenido se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV NanoVue (GE Healthcare). Se evaluó la integridad del ARN calculando la razón entre las intensidades de las bandas de 18S y 28S de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio. El ARN obtenido se disolvió en 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Solo se incluyeron en el estudio aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 de aproximadamente 2 (1.9 a 2.2) y una relación 28S/18S de aproximadamente 1.8.

#### **4.4. Diseño de cebadores para amplificación por RT-qPCR**

El listado de todos los genes determinados en este trabajo de Tesis (incluyendo genes de interés y GR) se encuentra en la Tabla 2. Las secuencias de los cebadores para la amplificación por qPCR de todos ellos, con las referencias bibliográficas correspondientes y sus tamaños de amplicón se listan en las Tablas 3 y 4. Se emplearon las bases de datos: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) para la búsqueda de secuencias de genes de ratas disponibles para diseñar los cebadores a través de Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000), teniendo en cuenta las posibles estructuras secundarias del amplicón (Mfold; Zuker, 2003), la especificidad de los cebadores (BLAST; Altschul y col., 1990), y la probabilidad de generación de dímeros de cebadores a través de la herramienta de analizador de oligonucleótidos de IDT (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Las condiciones de reacción se optimizaron determinando la temperatura de disociación del amplicón (*annealing*) y la concentración óptima de los cebadores.

**Tabla 2:** Descripción de los genes de referencia candidatos seleccionados y los genes de interés.

Símbolo	Nombre	Nro. GenBank / miRBase	Función
<b>Genes de Ref. candidatos para la normalización de miARNs</b>			
<b>5S</b>	ARN Ribosomal 5S	K01594.1	Síntesis de proteínas
<b>miR-16</b>	miARN 16	MI0000844	Regulación de la apoptosis
<b>miR-103</b>	miARN 103	MI0000888	Regulación de la migración celular en neuroblastomas
<b>miR-191</b>	miARN 191	MI0000934	No se conocen blancos funcionales validados
<b>miR-Let7a</b>	miARN Let7a	MI0000827	Regulación de la proliferación celular
<b>RNU48</b>	ARN pequeño nucleolar 48	X96648.1	Modificación de ARNs pequeños nucleares
<b>U6</b>	ARN spliceosomal U6	K00784.1	<i>Splicing</i> del ARN
<b>Genes de Ref. candidatos para la normalización de ARNm</b>			
<b>18S</b>	ARN Ribosomal 18S	V01270	Síntesis de proteínas
<b>ACTB</b>	Beta Actina	NM_031144.2	Proteína estructural del citoesqueleto
<b>ALB</b>	Albumina	NM_134326.2	Principal proteína plasmática
<b>B2M</b>	Beta 2 Microglobulina	NM_012512.1	Componente del MHC
<b>CYCA</b>	Ciclofilina A	M19533.1	Inhibidor de Ser-Thr fosfatasa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-P Deshidrogenasa	NM_017008.3	Enzima de la glicólisis
<b>HPRT</b>	Hipoxantina-Guanina-P Ribosil Transferasa	NM_012583.2	Metabolismo de purinas
<b>SDHA</b>	Succinato Deshidrogenasa	NM_130428.1	Enzima del ciclo de Krebs
<b>Genes de interés</b>			
<b>miR-122</b>	miARN 122	MI000891	Regulación del metab. lipídico / prolif. celular
<b>CCNG1</b>	Ciclina G1	NM_012923.2	Regulación del ciclo celular
<b>CAT-1</b>	Transportador de Aminoácidos Catiónicos	NM_013111.2	Transporte de aminoácidos catiónicos
<b>pri-miRNA-122</b>	Precursor de miR-122	NR_031864.1	Precursor de miR-122
<b>DICER</b>	DICER	XM_001068155.1	Procesamiento de miARNs
<b>DROSHA</b>	DROSHA	NM_001107655.1	Procesamiento de miARNs
<b>GLD-2</b>	<i>Germ-line development 2</i>	NM_001008372.1	Estabilización de miARNs
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>	NM_012524.2	Factor de transcripción
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha</i>	NM_022180.1	Factor de transcripción
<b>HNF1<math>\alpha</math></b>	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha</i>	NM_012669.1	Factor de transcripción
<b>HNF3<math>\beta</math></b>	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 3 beta</i>	NM_012743.1	Factor de transcripción
<b>CYP3A1</b>	Citocromo P450 Fam.3, Subfam.a, polipéptido 1	NM_013105.2	Metabolización de xenobióticos
<b>PCNA</b>	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular	NM_022381.3	Proliferación celular
<b>CCND1</b>	Ciclina D	NM_171992.4	Proliferación celular
<b>GS</b>	Glutamina Sintetasa	NM_017073.3	Metabolismo del nitrógeno
<b>CYP2E1</b>	Citocromo P450 Fam.2, Subfam.E, polipéptido 1	NM_031543.1	Metabolización de xenobióticos

**Tabla 3:** Características de los cebadores utilizados para la cuantificación por RT-qPCR de potenciales genes de referencia

Símbolo	Secuencia de cebadores (5'-3')	Am. (pb)	Tm (°C)	Ef
<b>Genes de Ref. candidatos para la normalización de miARNs</b>				
5S	RT: AGCCTACAGCACCCGGTATT D: GCCCGATCTTGCTGATCTC R: CCTGACCCTGCTTAGCTTCC	40	81.6	94
miR-16	RT: GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCAA D: CAGCCTAGCAGCAGTAAAT R: GAGGTATTCGCACCAGAGGA	50	83.5	91
miR-103	RT: GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCATAG D: TACGCAGCAGCATTGTACAG R: GAGGTATTCGCACCAGAGGA	51	79.8	104
miR-191	RT: GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAGCTG D: CACCAACGGAATCCAAA R: GAGGTATTCGCACCAGAGGA	49	80.0	104
miR-Let7a	RT: GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAATAT D: CGCGCTGAGGTAGTAGGTTG R: GAGGTATTCGCACCAGAGGA	50	81.5	96
RNU48	RT: GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGGTCAG F: TCTGAGTGTCTTCGCTGACG R: GAGGTATTCGCACCAGAGGA	65	88.5	93
U6	RT: AACGCTTCACGAATTTGCGT D: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	93	85.7	94
<b>Genes de Ref. candidatos para la normalización de ARNm</b>				
18S	RT: GAGCTGGAATTACCGCGCT D: AAACGGCTACCACATCCAAG R: TTGCCCTCCAATGGATCCT	159	87.8	97
ACTB	D: ATTGCTGACAGGATGCAGAA R: TAGAGCCACCAATCCACACAG	109	86.7	104
ALB	D: GATGCCGTGAAAGAGAAAGC R: CGTGACAGCACTCTTGTG	196	89.2	93
B2M	D: ACATCCTGGCTCACACTGAA R: ATGTCTCGGTCCAGGTG	109	87.1	94
CYCA	D: AGCACTGGGAGAAAAGGATT R: AGCCACTCAGTCTTGCCAGT	248	87.8	97
GAPDH	D: GTATCGGACGCTGGTTAC R: CTTGCCGTGGGTAGATCAT	128	87.1	93
HPRT	D: GCTGAAGATTTGAAAAGGTG R: AATCCAGCAGGTCAGCAAAG	157	87.7	92
SDHA	D: AGACGTTTGACAGGGGAATG R: TCATCAATCCGCACCTGTA	160	89.8	97

Am: tamaño amplicón. Pb: pares de bases. Tm: temperatura de melting. Ef: eficiencia de amplificación  
RT: cebador para la retro-transcripción. D: cebador directo. R: cebador reverso

**Tabla 4:** Características de los cebadores utilizados para la cuantificación por RT-qPCR de genes de interés

Símbolo	Secuencia de cebadores (5'-3')	Am. (pb)	Tm (°C)	Ef
<b>Genes de interés</b>				
<b>miR-122</b>	RT: GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAAACA D: GGCTGTGGAGTGTGACAATG R: GAGGTATTCGCACCAGAGGA	50	83.4	97
<b>CCNG1</b>	D: AGTCTTAAGGGGACGTGAGGAG R: GCTGAGGAGCTACCCACATT	119	86.1	92
<b>CAT-1</b>	D: TTGTCCCGTACTTCCTGTC R: CAGGGATGCTTCCTCACTGT	155	82.4	93
<b>pri-miRNA-122</b>	RT: AGCGTCCAGAGCAAATGACCG D: GTTAGCACCCCTGTGCCTACA R: TAGACGGATAGCCTAGCAGTAGC	122	79	100
<b>DICER</b>	D: GTGGTCTGGCAGGTGACTA R: ACTTCCACGGTACTCTGAC	168	87.3	100
<b>DROSHA</b>	F: GGTGGCCGTTTACTCAAAGG R: GTCCATTGCTGCTCCATT	85	85.8	95
<b>GLD-2</b>	D: GGCCAGATGATATGGAATGG R: TTCAGGGTAGCAGCTCTCAAA	193	78.6	98
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	D: GCCAAGAAGTCGGTGATAA R: CGGTATTGTCACTGGTCAA	149	90.4	95
<b>HNF4<math>\alpha</math></b>	D: GCTGCTGCTCTGCCACTC R: GGCAGACCCCTCAAGCAGCA	127	88.9	100
<b>HNF1<math>\alpha</math></b>	D: ACAATGCCTGCCTGGTAAGT R: TTGCCTCTGCGTAGTTACA	95	87.7	90
<b>HNF3<math>\beta</math></b>	D: CTTAAGGCCCAAAGGAGCA R: CAGGTGCCTTGAGAAGCAGT	138	85.5	90
<b>CYP3A1</b>	D: GATGTTGAAATCAATGGTGTGT R: TAATTCAGAGGTATCTGTGTTCC	294	88.2	110
<b>PCNA</b>	D: AGGACGGGGTGAAGTTTCT R: CAGTGGAGTGGCTTTTGTGA	173	86.9	91
<b>CCND1</b>	D: TGCAAATGGAAGTCTTCTG R: CTGGCATTGTGGAGAGGAAG	96	86.7	90
<b>GS</b>	D: TTGGCTCTTAGGGGAAGTGA R: ATGGAGGTGGGGTGTGTTT	158	79.3	90
<b>CYP2E1</b>	D: AAAGCGTGTGTGTGTGGAGAA R: AGAGACTTCAGGTAAAAATGCTGCA	90	86.9	90

Am: tamaño amplicón. Pb: pares de bases. Tm: temperatura de melting. Ef: eficiencia de amplificación  
RT: cebador para la retro-transcripción. D: cebador directo. R: cebador reverso

## 4.5. Síntesis de ADNc y Real Time qPCR

### 4.5.1. Tratamiento con DNasa y Retrotranscripción

Los niveles de expresión de miARNs y ARN pequeños se determinaron por *Stem-Loop* RT-qPCR (Chen y col., 2005), y la expresión de ARNm y 18S se determinaron por RT-qPCR convencional. Previamente a la reacción de transcripción reversa, 1 µg del ARN total se trató con RQ1 DNasa libre de RNasa (Promega) en un volumen final (Vf) de 20 µl, siguiendo las instrucciones del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó con la Transcriptasa Reversa SuperScript III (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se realizaron controles sin retrotranscriptasa para evaluar la presencia de ADN contaminante. Para la síntesis de cDNA de los miARNs y ARN pequeños, en la mezcla de reacción se incluyeron los oligonucleótidos con una estructura secundaria de tallo y burbuja (*Stem Loop*) específicos para cada miARN y oligonucleótidos específicos para la retrotranscripción de U6 y 5S (50 nM). La síntesis de ADNc de ARNm se realizó utilizando un oligo-dT y un oligonucleótido específico para el 18S (ver Tablas 3 y 4 para la secuencias de los oligonucleótidos). La mezcla de reacción también incluyó un inhibidor de RNasas (RNase OUT, Invitrogen). Las reacciones fueron incubadas a 16°C por 30 min, a 42°C por 30 min, 50°C por 60 min e inactivadas a 70°C por 15 min en el caso de la retrotranscripción de miARNs y ARN pequeños. Por otro lado, el protocolo térmico para la retrotranscripción de ARNm y 18S fue el siguiente: 50°C por 60 min y 70°C por 15 min. Las muestras de ADNc se diluyeron 1/50 para la determinación de miARNs y ARN pequeños, o 1/20 para la determinación de ARNm y 18S. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20°C.

### 4.5.2. Amplificación por PCR

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un Termociclador Real Time Mx300P (Stratagene) utilizando SYBR Green I (Invitrogen) como agente fluorescente, en un volumen final de 20 µl. La mezcla de reacción consistió en 2 µl de 10X PCR Buffer, 1.2 µl de 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl de 10 mM GeneAmp dNTP Mix (Applied Biosystems), 0.8 µl de 10X SYBR Green I (Invitrogen), 0.1 µl de 5 U/µl Platinum Taq DNA Polimerasa (Invitrogen), 4 µl de mix de cebadores 2.5 µM (cebadores directo y reverso) y 5 µl de ADNc diluido. Las reacciones de qPCR se iniciaron con 1 min de incubación a 95°C, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 40 seg. Se realizó una curva de disociación al final de cada corrida de qPCR

dentro del rango de temperaturas 55°C – 95°C, aumentando 0.5°C cada 2 seg. La línea de base y el C<sub>q</sub> se determinaron automáticamente utilizando el programa MxPro versión 4.10 (Stratagente). Por cada diferente reacción con un particular par de cebadores se incluyeron controles negativos (sin templado) y controles positivos (con una muestra de ADNc conocida) y cada reacción de qPCR se llevó a cabo por duplicado. La amplificación específica de cada gen se confirmó mediante la observación de un único pico en la curva de disociación y por la obtención de una única banda de tamaño esperado en una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio del producto de la amplificación. Para establecer el número de muestras y genes a estudiar en cada corrida se empleó el criterio de maximización por muestras.

#### 4.5.3. Cálculo de eficiencias de amplificación

Se crearon diluciones seriadas de un mix de ADNc para construir curvas estándares para calcular la eficiencia de amplificación de cada par de cebadores. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo, como se mencionó anteriormente, por duplicado. Se graficaron los valores de C<sub>q</sub> promedio para cada dilución de ADNc vs. el logaritmo del factor de dilución correspondiente. Se calculó la eficiencia de amplificación de cada amplicón a través de la fórmula:  $[10^{(1/S)} - 1] * 100\%$ , donde S representa la pendiente de la regresión lineal de la curva estándar (Nolan y col., 2006; Schmittgen y Livak, 2008).

### **4.6. Análisis de datos**

#### 4.6.1. Cálculo de las cantidades relativas normalizadas

Se calcularon los valores de cantidad relativa (RQ) a partir de los C<sub>q</sub> vía el método delta- C<sub>q</sub> (Livak y Schmittgen, 2001), incorporando los valores de eficiencia de amplificación de qPCR calculados mediante la curva estándar realizada para cada gen (Pfaffl, 2001). El RQ representa la diferencia de expresión (no normalizada) de un gen en una muestra, respecto de otra (calibradora). Los valores de RQ se calcularon utilizando como calibrador al promedio de C<sub>q</sub> de todas las muestras (Hellemans y col., 2007). En todos los análisis estadísticos, los datos de expresión se convirtieron en valores logarítmicos para obtener una distribución de datos simétrica. Para comparar dos grupos de muestras independientes de ratas controles y tratadas se aplicó el t-test no apareado de una o dos colas. El test ANOVA de un factor se utilizó para la

comparación de más de dos grupos, seguido de una prueba Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples. En todos los casos, la significancia estadística se consideró con valores de p menores a 0.05. Se evaluó la distribución normal de los datos empleando el test Shapiro-Wilk. Todos los test estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa R [<http://www.R-project.org>], v2.13.1.

Las diferencias estadísticamente significativas en los valores de RQ entre los grupos de ratas controles y tratadas que presentaron algunos GR candidatos fueron confirmadas empleando un nuevo grupo de animales tratados con el mismo protocolo (n=5). Finalmente, los valores de RQ fueron normalizados utilizando como GR a los propuestos resultantes de los análisis reportados en este trabajo. Los valores de NRQ (cantidad relativa normalizada) de cada grupo se obtuvieron aplicando el factor de normalización (FN), el cual se calculó como la media geométrica de la expresión relativa de los GR seleccionados.

#### 4.6.2. Evaluación de estabilidad de la expresión de los genes de referencia candidatos

Para calcular la estabilidad de expresión de los GR candidatos, se utilizaron los siguientes *software*:

- BestKeeper versión 1 (Pfaffl y col., 2004)  
[<http://genequantification.com/bestkeeper.html>]
- GeNorm versión 3.5 (Vandesompele y col., 2002)  
[<http://medgen.ugent.be/jvdesomp/genorm/>]
- NormFinder versión 0953 (Andersen y col., 2004)  
[<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>]

Estos paquetes de *software* disponibles abiertamente son herramientas de aplicación para Microsoft Excel. Las medidas de estabilidad producidas por GeNorm, NormFinder y BestKeeper fueron combinadas para establecer un ranking consenso de los genes aplicando el paquete RankAggreg [<http://cran.rproject.org/web/packages/RankAggreg/index.html>] del proyecto R (Pihur, 2009). Este programa permite combinar listas de diferentes orígenes, que de otra manera no serían directamente comparables, según fue utilizado en un trabajo previo (Mallona y col, 2010).

#### 4.6.3. Evaluación de la eficiencia de la normalización

La expresión simulada de un gen de interés hipotético se utilizó para evaluar la eficiencia de un determinado método de normalización (determinado por la identidad y número de los genes seleccionados). En este trabajo aplicamos una modificación de la estrategia original reportada por Ponton y colaboradores (Ponton y col., 2011). Se evaluaron diferentes métodos de normalización, incluyendo: a) los análisis de todos los GR, uno por uno, y b) la evaluación de distintas combinaciones de GR establecidas por el agregado sucesivo de GR, de acuerdo al orden de estabilidad propuesto previamente. Estos métodos de normalización fueron evaluados en dos situaciones hipotéticas: con un aumento o con una disminución de la expresión del gen de interés hipotético en los grupos tratados, respecto de los grupos controles. Para las muestras controles, este valor se estableció como 1 en ambas situaciones hipotéticas (de aumento o disminución de la expresión), y los valores de RQ en los grupos tratados correspondientes se ajustaron al mínimo valor que produjo un aumento (o disminución) significativo(a) en el logaritmo del valor de NRQ entre los grupos, utilizando el t-test ( $p=0.05$ ). Finalmente, se calculó la razón entre el NRQ promedio del gen de interés en los grupos tratados y controles, y este valor se definió como el Índice de Eficiencia de la Normalización (NEI, por sus siglas en inglés) para cada condición de regulación, correspondiente a un método de normalización específico y a una hepatotoxina específica. Entonces, en ambos casos, el NEI representa la razón de cambio (de aumento o disminución) que refleja la diferencia mínima de expresión que puede ser detectada con el método de normalización que se está utilizando en una condición en estudio. Cuanto menor es el NEI, mayor es la eficiencia del método de normalización aplicado. Considerando que el NEI es un valor de NRQ de un gen hipotético bajo condiciones específicas, podemos estimar el error asociado a esta determinación a través del método de propagación de errores reportado por Hellemans y colaboradores (Hellemans y col., 2007). En este trabajo, se calculó el valor de NEI promedio (considerando todos los hepatotóxicos) para las situaciones de aumento y disminución de la expresión, con el fin de evaluar cada método de normalización y establecer el número óptimo de GR a utilizar.

## 4.7. Determinación de proteínas específicas

### 4.7.1. Preparación de lisados totales y extractos nucleares

A partir de los hígados de ratas tratadas y sin tratar, se prepararon extractos nucleares y lisados totales. Las fracciones subcelulares enriquecidas en núcleos fueron obtenidas según el método descrito por De Duve y colaboradores (De Duve y col., 1955).

#### *4.7.1.1. Obtención de lisados totales*

1 g de hígado fueron homogenizados en 3 ml de *buffer* RIPA [1% (v/v) de Tritón X-100, 1% (p/v) de deoxicolato sódico, 0,1% (p/v) SDS, 20 mmol/L de Tris, 5 mmol/L (EDTA) y 200 mmol/L de NaCl; pH 8] conteniendo inhibidor de proteasas (1 mmol/L PMSF). Posteriormente, se incubó 30 min a 4°C y se realizaron 3 ciclos de congelado/descongelado de 10 min cada uno. Luego se centrifugó 30 min a 4°C a 15000 rpm, y el sobrenadante fue fraccionado y almacenado a -70°C hasta su utilización.

#### *4.7.1.2. Obtención de extractos nucleares*

1 g de hígado fueron homogenizados en 3 ml de un solución de sacarosa 0.3 M conteniendo inhibidor de proteasas (1 mmol/L PMSF). A continuación, se centrifugó a 1.000 g durante 10 min a 4°C. Los pellets, enriquecidos en núcleos celulares, fueron lavados dos veces con la solución de sacarosa 0.3 M conteniendo inhibidores, resuspendidos en *buffer* de lisis RIPA con inhibidores de proteasas, incubados en hielo durante 1 h y centrifugados a 8.000 g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se utilizaron como fracciones nucleares.

### 4.7.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry, utilizando albúmina bovina como estándar (Lowry y col., 1951).

### 4.7.3. Western Blot

Alícuotas conteniendo cantidades iguales de proteínas (20 µg/calle) disueltas en *buffer* de muestra (Tris-HCl 1 mol/L, pH 6,8, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,005% p/v), glicerol 10% (p/v), H<sub>2</sub>O destilada y DTT 10% (v/v)) se sembraron en mini-geles de SDS-poliacrilamida al 12% (p/v) y se sometieron a electroforesis (Laemmli, 1970). Los mini-geles se prepararon y

corrieron utilizando un equipo comercial (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad). Luego, las proteínas se transfirieron eléctricamente a membranas de PVDF (PerkinElmer Life Sciences) durante 1 hora a voltaje constante de 360 mV, utilizando un equipo comercial (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad). Después de ser bloqueadas durante 1 hora con leche al 10% en PBS-Tween (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mmol/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol/L; NaCl 100 mmol/L; Tween 20 0,1% (v/v), pH 7,5), las membranas se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS-Tween/Albúmina 3%. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con PBS-Tween y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con peroxidasa de rabanito, dilución 1:5000, Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína inmovilizada fue detectada por quimioluminiscencia, utilizando un equipo comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Pierce® ECL-Western Blotting Substrate; Termo Scientific). Para la detección, las membranas de PVDF se expusieron a films radiográficos (Amersham Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare Limited) y las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics).

Debido a que varias proteínas comúnmente empleadas como controles de carga ( $\beta$ -actina, tubulina, GAPDH, prohibitina, histona H1) presentaron alteraciones en sus niveles, en todos los estudios por *Western blot* la uniformidad de carga de las proteínas se chequeó mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Anti-CAT-1 (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.); anti-Ciclina G1 (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.); anti-C/EBP $\alpha$  (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.); anti-HNF4 $\alpha$  (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.).

## *Resultados y Discusión*

---

# *Capítulo 1*

**Desarrollo de una técnica de determinación de la expresión de ARNm y miARNs por Real Time PCR Cuantitativa en modelos experimentales de toxicidad hepática aguda inducida por hepatotoxinas clásicas.**

---

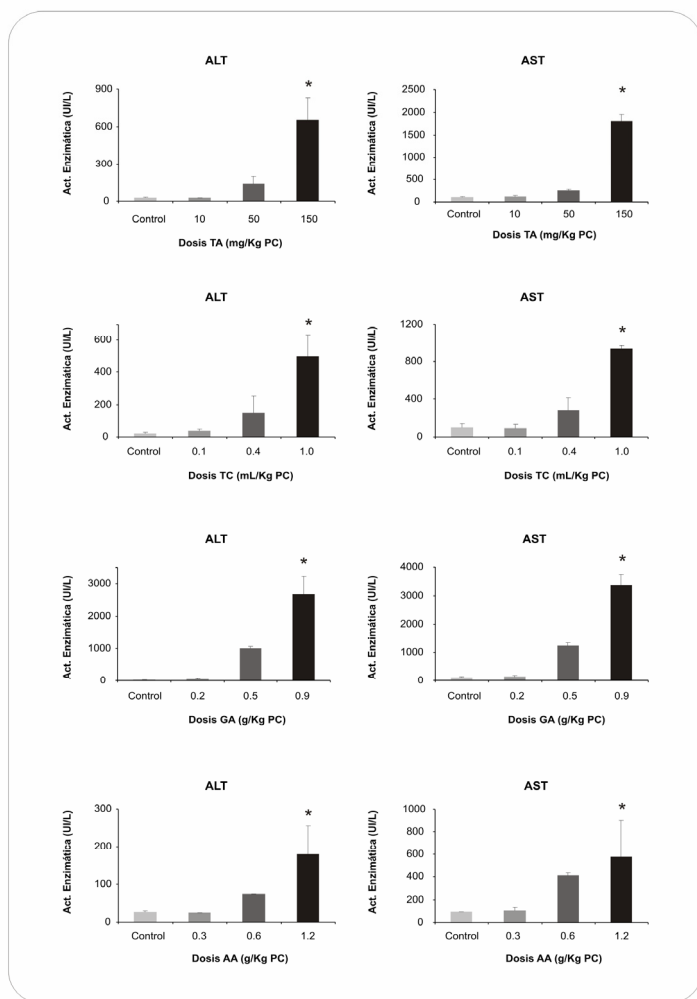
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **CAPÍTULO 1. Desarrollo de una técnica de determinación de la expresión de ARNm y miARNs por Real Time PCR Cuantitativa en modelos experimentales de toxicidad hepática aguda inducida por hepatotoxinas clásicas.**

#### **5.1.1. Establecimiento de modelos de hepatotoxicidad aguda**

Los compuestos TA, TC, GA y AA son hepatotóxicos de uso frecuente en estudios de toxicidad experimental para la elucidación de mecanismos generales de daño, para evaluar tratamientos hepatoprotectores e identificar potenciales biomarcadores (Mehendale, 2005; Zimmerman, 1999). Para lograr una caracterización de la respuesta fisiológica del hígado a agentes externos, el correcto desarrollo y la validación de modelos experimentales que sean representativos de daño hepático es un aspecto fundamental, ya que un daño masivo e inespecífico (como efecto secundario de la droga) podría ofuscar el resultado esperado, e impediría la observación de los mecanismos moleculares específicos que se desean estudiar.

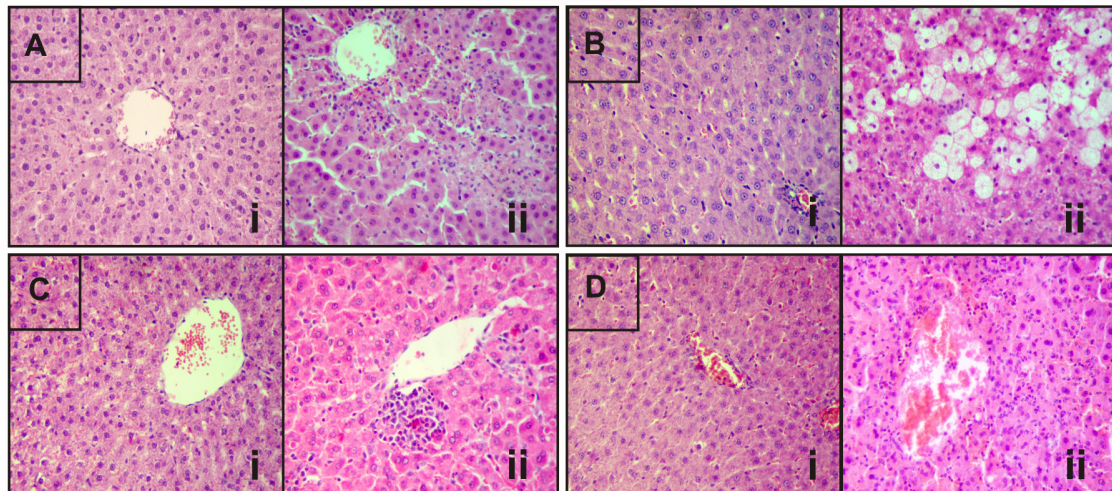
Los modelos de hepatotoxicidad aguda para cada uno de los cuatro tóxicos, administrados en un protocolo dosis-respuesta, fueron caracterizados evaluando los niveles séricos de marcadores de daño hepático y mediante examinación histológica a las 24 hs del tratamiento. Las actividades de ALT y AST de los grupos tratados con AA, TC, GA y TA se vieron aumentadas significativamente en los grupos a los cuales se les administró la mayor dosis (Figura 11).



**Figura 11. Determinación de niveles de marcadores de daño hepático en suero.** Se evaluaron los niveles de ALT y AST en ratas tratadas por 24 hs con tioacetamida (TA), tetracloruro de carbono (TC), D-galactosamina (GA) y acetaminofeno (AA) en dosis crecientes, y en ratas tratadas con los respectivos vehículos. Los resultados se evaluaron mediante el test ANOVA de un factor seguido de una prueba de Newman-Keuls para comparaciones múltiples, y se representan como la media aritmética +/- la desviación estándar (\*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ).

La evaluación histológica de los hígados permitió verificar el daño producido por cada hepatotóxina. En la Figura 12 se muestran secciones representativas de los hígados de ratas controles y ratas tratadas con los hepatotóxicos luego de 24 hs de exposición a las mayores dosis. Las ratas tratadas con TA (150 mg/kg de peso corporal) presentaron una severa infiltración de neutrófilos, necrosis hepatocitaria y apoptosis. El tratamiento con TC (1 ml/kg de peso corporal) resultó en una necrosis hepatocitaria moderada a intensa y una vacuolización citoplasmática. Los animales tratados con GA (0.9 g/kg de peso corporal) presentaron un moderado infiltrado de linfocitos, macrófagos y neutrófilos en la región centrilobular, necrosis hepatocitaria y cuerpos apoptóticos. Finalmente, la administración de AA (1.2 g/kg de peso corporal) indujo una necrosis en la región centrilobular con infiltración de neutrófilos y linfocitos. Los hígados de las ratas tratadas con los vehículos de cada hepatotóxina no presentaron lesiones.

Los estudios posteriores se realizaron sobre los hígados de ratas tratadas con la mayor dosis de cada uno de los tóxicos empleados y en los animales controles, administrados con el correspondiente vehículo.



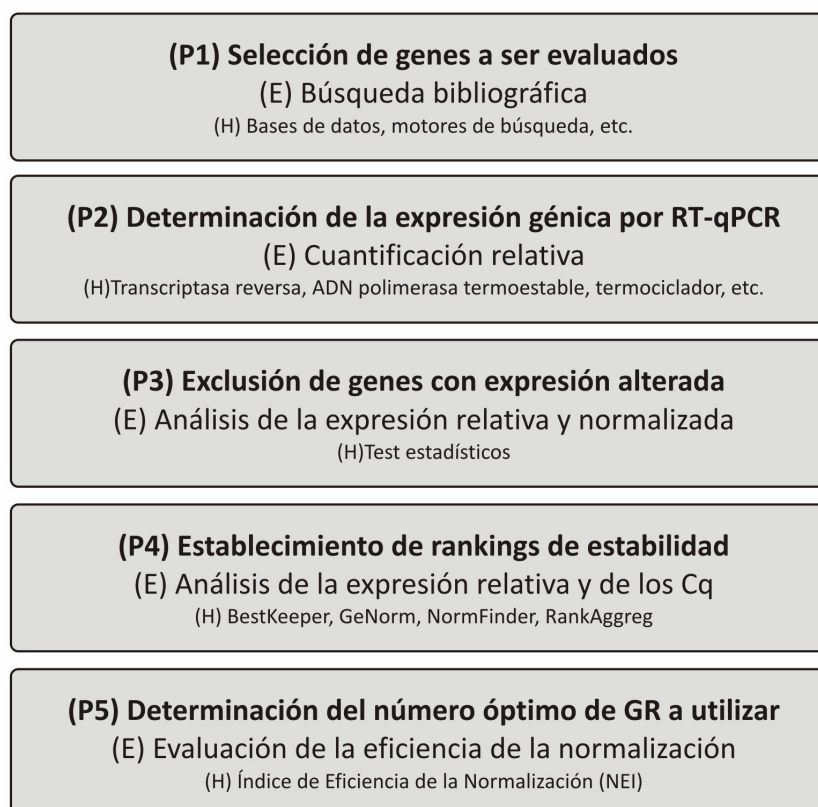
**Figura 12. Estudio anatomopatológico sobre tejido hepático.** Se muestran imágenes representativas de coloraciones de cortes histológicos con hematoxilina-eosina luego de tratamiento de ratas por 24 hs con los tóxicos en estudio a las mayores dosis (ii) y sus respectivos vehículos (i). A) tioacetamida, B) tetracloruro de carbono, C) D-galactosamina y D) acetaminofeno.

### 5.1.2. Selección de genes de referencia óptimos para estudios de expresión mediante RT-qPCR en los modelos de hepatotoxicidad establecidos

#### 5.1.2.1. Diagrama de trabajo propuesto

La cuantificación relativa de la expresión génica mediante la técnica RT-qPCR se ha convertido en una de las principales metodologías para estudiar los niveles de miARNs y ARNm en tejidos o cultivos celulares. Sin embargo, el rendimiento de esta técnica depende principalmente del uso de una eficiente estrategia de normalización de los valores de expresión génica, lo que involucra la selección de GR de expresión más estable y la evaluación del número óptimo necesario de los mismos. Está demostrado que para todos los GR utilizados comúnmente existe por lo menos una situación experimental en la cual su expresión se ve alterada (Thellin y col., 2002; Vandesompele y col., 2002).

En los modelos de hepatotoxicidad aguda establecidos se seleccionaron los GR óptimos para estudios de RT-qPCR, de acuerdo a un esquema de trabajo original, diseñado a partir de una exhaustiva revisión bibliográfica, y consistente en cuatro pasos (Figura 13): i) selección de GR candidatos a evaluar; ii) determinación de la expresión génica de los GR candidatos por RT-qPCR; iii) exclusión de los GR candidatos que alteran su expresión en el sistema estudiado; iv) establecimiento de un ranking de estabilidad de expresión dentro del grupo de GR restantes; y v) determinación del número óptimo de GR a utilizar. Si bien existen ciertos trabajos en donde se aplican alguno de estos pasos, el diagrama de análisis propuesto en este trabajo de Tesis representa una estrategia integral original para seleccionar GR en diferentes diseños y modelos experimentales.



**Figura 13: Esquema de trabajo para un estudio de selección de genes de referencia.** Se muestran todos los pasos (P) seguidos en este trabajo para la selección de los genes de referencia. En cada panel se muestra la estrategia aplicada (E) y las herramientas utilizadas (H) en cada paso.

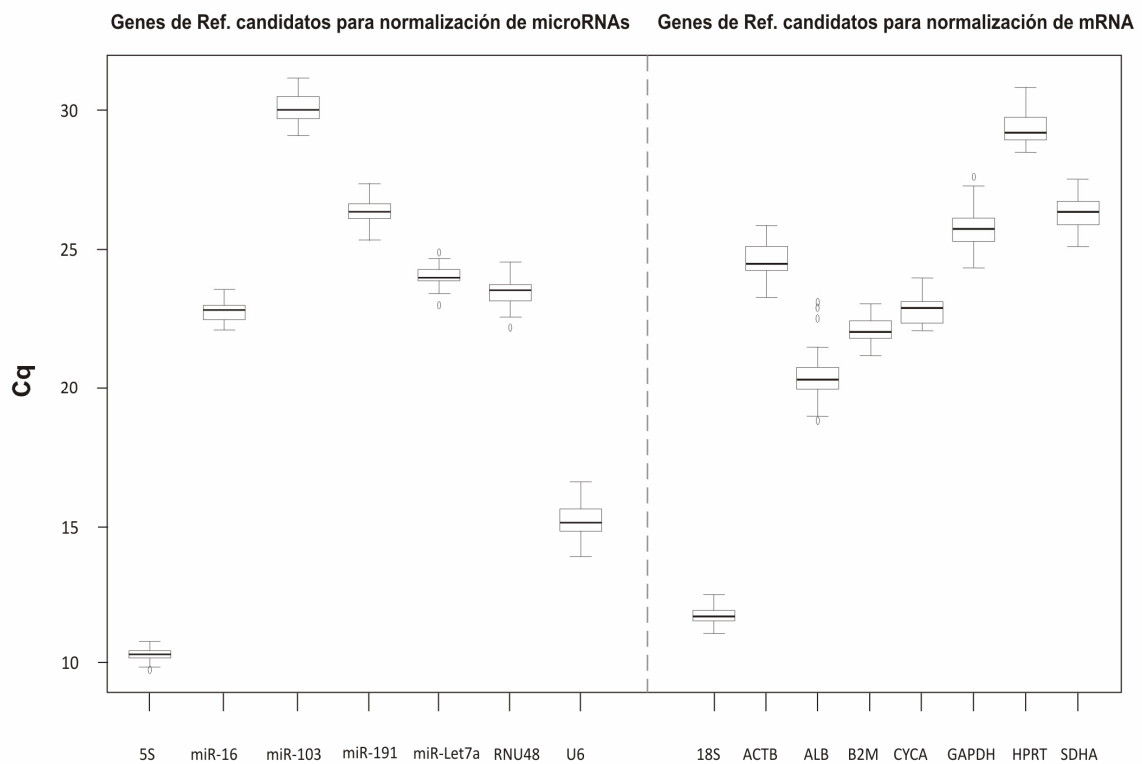
#### 5.1.2.1.1. Paso 1: Selección de GR candidatos a evaluar

La selección de los GR candidatos para la normalización de miARNs y ARNm se realizó entre dos grupos diferentes de genes (Tabla 2). En el caso de los miARNs, los GR candidatos evaluados fueron: 5S, miARN-16, miARN-103, miARN-191, miARN-Let7a, ARN spliceosomal U6 (U6) y ARN pequeño nucleolar 48 (RNU48). Estos genes candidatos se escogieron debido a que son utilizados comúnmente como controles endógenos de normalización en diferentes tejidos pero teniendo en cuenta también sus cantidades relativas en hígado (Meyer y col., 2010; Mestdagh y col., 2009). En el caso de los GR para la normalización de ARNm, los genes evaluados fueron: 18S, Beta 2 Microglobulina (B2M), Beta Actina (ACTB), Albúmina (ALB), Ciclofilina A (CYCA), Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenada (GAPDH), Hipoxantina-guanina Fosfo Ribosil Transferasa 1 (HPRT1) y Succinato Deshidrogenada (SDHA), los cuales fueron seleccionados a partir de la literatura, que muestra que son frecuentemente utilizados como normalizadores en estudios de expresión en hígado (Xing y col., 2009; Wang y Xu, 2010). Para ambos casos, se aseguró que los genes a evaluar pertenezcan a diferentes clases funcionales para reducir la probabilidad de que los genes puedan ser co-regulados.

#### 5.1.2.1.2. Paso 2: Determinación de la expresión génica de los GR candidatos por RT-qPCR

Se purificó el ARN total a partir de muestras de hígado de ratas controles y tratadas con los diferentes hepatotóxicos. Sólo se incluyeron en el estudio las muestras de alta calidad de ARN, acorde a las especificaciones establecidas en el ítem “purificación de ARN” de la sección Materiales y Métodos. Los valores de eficiencia de amplificación para todos los cebadores utilizados se encontraron dentro del rango 91 a 104% (Tabla 2, Figura adicional 1), con coeficientes de correlación de la curva Estandar que variaron desde 0.9732 a 1.000. Todos los genes presentaron picos únicos en las curvas de disociación y bandas únicas del tamaño esperado en los geles de agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio, lo cual permitió confirmar la amplificación específica de cada par de cebadores. Se realizó la técnica de RT-qPCR para evaluar los patrones de expresión de los GR candidatos en los hígados de ratas controles y tratadas con los diferentes xenobióticos. La desviación estándar promedio entre los duplicados realizados de la qPCR para todas las mediciones incluidas en este estudio fue de 0.10 ciclos. Los niveles de expresión de los distintos genes mostraron un amplio rango de valores de Cq, desde 9.82 a 31.06 para los GR de miARNs y desde 11.09 a 30.93 para los GR de ARNm. Los genes miARN-103 y HPRT1 mostraron relativamente baja expresión (Cq > 28.37),

mientras que los genes 5S y 18S presentaron la mayor expresión ( $Cq < 12.45$ ) en cada grupo de GR (Figura 14). Comparando los  $Cq$  de los GR en cada grupo, los genes 5S y 18S presentaron la menor variabilidad, mientras que los genes U6 y ALB resultaron ser los más variables.



**Figura 14: Diagrama de cajas y bigotes de los ciclos de cuantificación ( $Cq$ ) de RT-qPCR de los genes de referencia (GR) candidatos.** Se presentan los diagramas de cajas y bigotes de los valores de  $Cq$  obtenidos para cada GR para la normalización de miARNs y ARNm en todas las muestras de hígado estudiadas ( $n=35$ ), derivadas de ratas tratadas con las hepatotoxinas estudiadas (tioacetamida, tetracloruro de carbono, D-galactosamina y acetaminofeno) y sus respectivos animales controles administrados con vehículo. La línea que cruza la caja representa la media. Los extremos de la caja indican los percentiles 25% y 75%. Los bigotes representan los valores máximos y mínimos, los círculos representan valores atípicos.

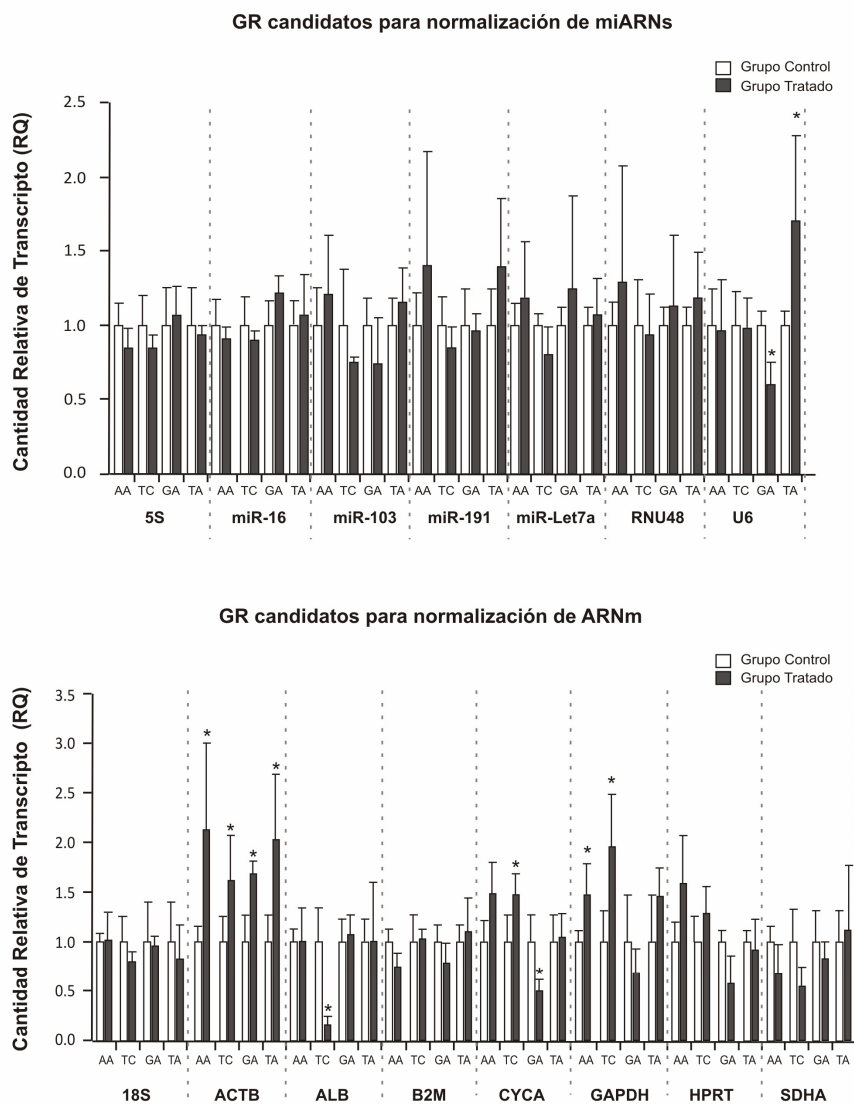
#### 5.1.2.1.3. Paso 3: Exclusión de los GR candidatos que alteran su expresión en el sistema estudiado

El requerimiento básico de un gen candidato para poder ser empleado como normalizador es que su expresión no se modifique entre los grupos experimentales del estudio. Por lo tanto, es necesario validar esta hipótesis específicamente para cada GR candidato previo al estudio de su estabilidad. El uso de GRs que presentan alteraciones en sus niveles de expresión entre

grupos experimentales puede producir alteraciones artificiales en los valores de expresión génica, lo cual podría llevar a conclusiones incorrectas. A pesar de esto, se observa que en pocos trabajos de selección de GR se realizaron constataciones de la no alteración de la expresión de los mismos (Pohjanvirta y col., 2006; Kheirelseid y col., 2010; Li y col., 2009; Jung y col., 2007; Fox y col., 2010).

Para comparar la expresión de los GR candidatos entre las muestras de los grupos controles y tratados con cada hepatotoxina se evaluaron las cantidades relativas de cada transcrito (RQ), esto es, los valores de expresión sin normalizar (Figura 15). Los RQ se compararon empleando el test t de Student (t-test) previa transformación logarítmica. Cuando se obtuvieron valores de p entre 0.1 y 0 se repitieron los experimentos empleando un nuevo conjunto de animales para confirmar los resultados (datos no mostrados). En conjunto, se observó que varios GR candidatos (entre ellos, los convencionales GAPDH y ACTB) mostraron expresión alterada en los modelos de hepatotoxicidad aguda estudiados. En diferentes trabajos se encontró una situación similar, en los cuales se evaluaron GR candidatos para la normalización de ARNm: en un estudio de citotoxicidad empleando AA (Fox y col., 2010) y en ratas tratadas con dioxina (Pohjanvirta y col., 2006) se observó que aproximadamente un 40 y 50% de los GR candidatos alteraban su expresión en respuesta al hepatotóxico, respectivamente. Estas observaciones remarcan la importancia de evaluar la posibilidad que se modifique la expresión de los GR candidatos en estudios de toxicidad.

Particularmente, se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos controles ( $p < 0.05$ ) en las RQ de ACTB y GAPDH de las ratas tratadas con AA, en la expresión de ACTB, ALB, CYCA y GAPDH en los hígados de ratas tratadas con TC, en la expresión de U6, ACTB y CYCA en los hígados del grupo GA y en las RQ de U6 y ACTB en los hígados de ratas tratadas con TA. Estas expresiones alteradas observadas demuestran que estos genes no pueden ser utilizados para la normalización de los datos de RT-qPCR, por lo que fueron excluidos de los análisis posteriores.



**Figura 15: Efecto de la exposición de hepatotóxicos sobre la expresión hepática de genes de referencia candidatos en la rata.** Se muestra la expresión relativa de los genes de referencia candidatos para la normalización de miARNs y ARNm en los hígados de ratas tratadas con las hepatotoxinas (tioacetamida: TA; tetracloruro de carbono: TC, D-galactosamina: GA y acetaminofeno: AA) y sus respectivos vehículos, por 24 hs. El asterisco (\*) indica diferencia significativa, con un valor de  $p < 0.05$  empleando el test t de Student de la expresión transformada logarítmicamente.

#### 5.1.2.1.4. Paso 4: Establecimiento de un ranking de estabilidad de expresión dentro del grupo de GR restantes

Desde un punto de vista teórico, el grupo de genes: 5S, miARN-16, miARN-103, miARN-191, miARN-Let7a y RNU48; y los genes: 18S, B2M, HPRT1 y SDHA pueden utilizarse para la normalización de la expresión de miARNs y ARNm en los modelos de hepatotoxicidad aguda

establecidos, respectivamente, debido a que no presentaron alteración de expresión por los tratamientos. Sin embargo, para definir cuáles son los mejores GR que aseguren una estrategia de normalización más exacta, es necesario determinar cuáles son aquellos genes con expresión más estable, es decir, los GR con la mínima variación biológica. Debido a que no existe un único criterio para evaluar este aspecto, se decidió aplicar los tres programas más frecuentemente utilizados para este propósito: BestKeeper, GeNorm y NormFinder. Posteriormente, se utilizó el programa RankAggreg para obtener un ranking de estabilidad definitivo consensuando los resultados de la evaluación de la estabilidad de cada uno de los tres programas de evaluación de estabilidad utilizados.

Los resultados se resumen en la Tabla 5. El programa BestKeeper evalúa la estabilidad de expresión de cada GR mediante la estimación de dos parámetros: la estabilidad a través de la desviación Standard (DS) y la correlación de sus valores de Cq al índice BestKeeper (coeficiente de correlación de Pearson  $r$  y valor de  $p$ ; Pfaffl y col., 2004). Esto es, este programa realiza un análisis de correlación de a pares para todos los genes candidatos basado en los valores de Cq, con el valor calculado de la media geométrica de los mejores GR para establecer el índice BestKeeper. Basándose en el análisis de la DS, BestKeeper reveló una estabilidad general de la expresión génica adecuada ( $SD < 1$ ) para todos los GR candidatos (Figura adicional 4 y 5). Todos los GR, excepto RNU48, se correlacionaron significativamente al índice de BestKeeper ( $p < 0.05$ ). Según el coeficiente de correlación de Pearson, la mayor estabilidad de expresión resultó ser la de los genes miARN-16 y miARN-191 para el estudio de miARNs (Figura adicional 4), y la de los genes SDHA y 18S para la normalización de ARNm (Figura adicional 5).

El programa GeNorm calcula una medida de estabilidad de expresión "M". Este valor se fundamenta en que la razón de la expresión de dos GR ideales debe ser idéntica en todas las muestras estudiadas, independientemente de la condición experimental. Una variación en esta relación es reflejo de que uno de los genes (o ambos) no se expresa/n constantemente. Cuanto mayor es la variación de la relación (mayor M), menor es la estabilidad de la expresión (Vandesompele y col., 2002). El programa excluye sucesivamente los genes menos estables y recalcula el valor de M para los genes restantes, generando un ranking de los genes, que resulta en la identificación de aquellos que presentan la mayor estabilidad entre las muestras estudiadas. Vandesompele y colaboradores (Vandesompele y col., 2002) establecieron un valor de corte del valor M en 1.5, significando que cualquier gen que presente un valor menor a éste se expresa relativamente estable. En este trabajo, todos los valores de M de los genes

evaluados resultaron debajo de 1.5. De acuerdo a este programa, los genes de expresión más estable son miARN-16 y 5S (dentro del grupo de normalizadores de miARNs, Figura adicional 4) y B2M y 18S (para los genes candidatos de normalización de ARNm; Figura adicional 5).

El programa NormFinder emplea un modelo de aproximación que, además de la variación general de los niveles de expresión, tiene en cuenta la variación dentro de cada grupo experimental y entre los mismos (para cada gen candidato, Andersen y col., 2004). Utilizando este programa, los GR más estables fueron: miARN-16 y 5S, dentro del grupo de GR candidatos para la normalización de miARNs (Figura adicional 4) y B2M y 18S dentro de los genes para la normalización de la expresión de ARNm (Figura adicional 5).

La diferencia de los rankings obtenidos mediante el uso de los diferentes programas es una consecuencia de las diferentes estrategias de resolución de la problemática de seleccionar el gen de expresión más estable, reflejado en los diferentes algoritmos empleados por cada uno (Tabla 5). Las listas con el orden de estabilidad de los diferentes GR candidatos generadas por GeNorm, NormFinder y BestKeeper se combinaron para establecer un ranking consenso entre las mismas, mediante la aplicación del programa RankAggreg. En este caso, fue posible emplear la función BruteAggreg debido a que se contaba con un número de GR menor a 10, en ambos casos. Específicamente, esta aplicación genera todas las posibles listas de estabilidad de GR y establece, mediante un valor arbitrario, el grado de acuerdo que tiene cada una de las mismas con las listas originalmente provistas por cada programa. La función de “Spearman *footrule*” fue utilizada para calcular la “distancia” entre las distintos ranking generados. Debido a que el programa GeNorm calcula un mismo valor de M para los dos genes más estables, para este caso se generaron dos listas de GR, alternando la posición de los dos genes más estables. Si los dos análisis posibles (con cada una de las posibilidades de los rankings generados por GeNorm) resultaran en rankings diferentes, se escogió el ranking consenso con el menor puntaje. Finalmente, de acuerdo a la función BruteAggreg del programa RankAggreg, los genes más estables fueron: miARN-16, 5S y miARN-Let7a dentro del grupo de GR candidatos para miARNs (Figura adicional 4), y B2M, 18S y SDHA dentro del grupo de GR para ARNm (Figura adicional 5).

**Tabla 5:** Ranking de los genes de referencia candidatos de acuerdo a sus valores de estabilidad

Orden de estabilidad	Bestkeeper	GeNorm	NormFinder	Consenso
<b>Genes de referencia candidatos para la normalización de miARNs</b>				
1	miR-16	miR-16/5S	miR-16	miR-16
2	miR-191		5S	5S
3	5S	miR-Let7a	miR-Let7a	miR-Let7a
4	miR-103	miR-191	miR-191	miR-191
5	miR-Let7a	miR-103	miR-103	miR-103
6	RNU48	RNU48	RNU48	RNU48
<b>Genes de referencia candidatos para la normalización de mARNs</b>				
1	SDHA	B2M/18S	B2M	B2M
2	18S		18S	18S
3	B2M	SDHA	SDHA	SDHA
4	HPRT1	HPRT1	HPRT1	HPRT1

#### 5.1.2.1.5. Paso 5: Determinación del número óptimo de GR a utilizar

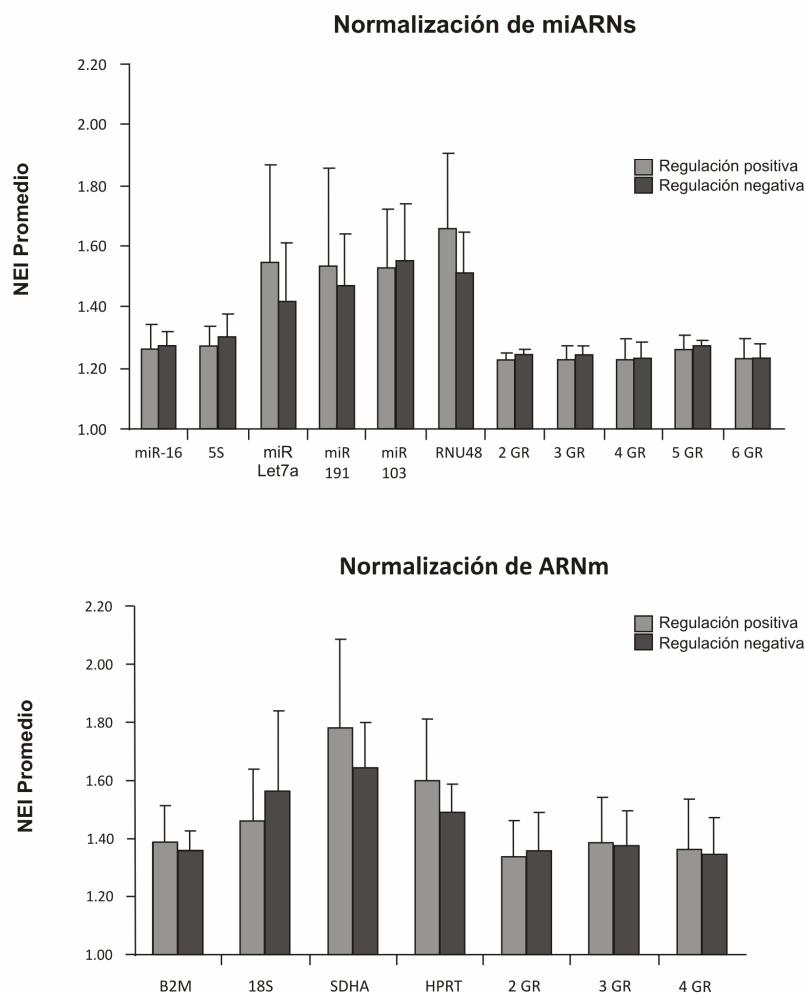
Una metodología de normalización eficiente permite la obtención de resultados de RT-qPCR exactos, reproducibles y biológicamente relevantes, corrigiendo las variaciones no biológicas entre muestras que pueden ser introducidas por las inconsistencias propias de los protocolos de trabajo. Idealmente, la principal fuente de variabilidad en la expresión génica que se observa es una consecuencia del tratamiento aplicado a las muestras, resultando en la posibilidad de detectar, a través de los análisis estadísticos, diferencias biológicas significativas más pequeñas.

Es posible evaluar la eficiencia de la normalización que se obtiene utilizando diferentes combinaciones de los GRs más estables. Esta estrategia fue diseñada originalmente en nuestro laboratorio continuando con un trabajo descrito previamente (Ponton y col., 2011). El método desarrollado consiste en simular la expresión de un gen de interés hipotético para evaluar la exactitud de la cuantificación del transcripto que resulta del uso de cada diferente combinación de GR en evaluación, agregados de a uno utilizando la lista de estabilidad obtenida. Finalmente, la elección del número óptimo de GRs a utilizar en la normalización se realiza teniendo en cuenta el balance entre la mejora de la exactitud introducida por el agregado de un GR al grupo de normalizadores, y la desventaja de determinar un mayor número de GR, en cuanto a costos y labor del experimento.

Esto se realiza, en la práctica, a través de la determinación de la diferencia de expresión mínima necesaria de un gen de interés hipotético para detectar diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales, para cada combinación de GR cuya eficiencia de

normalización está siendo evaluada. La expresión del gen de interés hipotético se simula en los grupos controles y tratados de manera tal que, luego de que el valor de expresión arbitrario es normalizado con una combinación específica de GR, se establece la mínima diferencia entre los grupos experimentales que es estadísticamente significativa.

Según lo descrito anteriormente, se definió un nuevo parámetro denominado Índice de Eficiencia de Normalización (NEI) como la mínima alteración (aumento o disminución) en el cociente de la expresión génica (NRQ) entre grupos tratado y control necesaria para observar diferencias estadísticamente significativas (t-test,  $p=0.05$ ) utilizando un método de normalización particular (una combinación específica de GR en número y cantidad) y con un tratamiento hepatotóxico específico (TA, TC, GA o AA). Para cada combinación de GR se obtienen dos valores de NEI, uno que evalúa la relación mínima necesaria para el aumento y otro para la disminución de la expresión. En ambos casos, cuanto menor es el valor de NEI para una combinación de GR dada, más eficiente es la normalización. Si se analiza el ranking de los GR producido en base a la estabilidad de los genes (Tabla 5) y los valores de NEI promedio (considerando todos los hepatotóxicos) de la normalización con un sólo GR para aumento y disminución de la expresión (Figura 16), se puede observar que los menores valores de NEI corresponden a los primeros GR del ranking (es decir, a los más estables), y los mayores valores de NEI a los menos estables. Esta observación valida el procedimiento propuesto en este trabajo para evaluar la estabilidad de los GR putativos. El número óptimo de GR a utilizar se determinó evaluando la mejora de la eficiencia de la normalización que resulta del agregado sucesivo de un GR a la combinación de GR utilizada. El agregado se realizó de acuerdo al orden de estabilidad establecido previamente.



**Figura 16: Estudio de la eficiencia de la normalización de los genes de referencia candidatos.** Se muestran los valores promedio del índice de eficiencia de normalización (NEI) en los cuatro tratamientos con cada método de normalización de miARNs y ARNm, para cada situación de modificación de la expresión (aumento y disminución). Para cada tratamiento con una hepatotoxina específica, se define el valor NEI como el mínimo cambio (aumento o disminución) en la expresión simulada de un gen de interés hipotético necesario para observar diferencias estadísticamente significativas (t-test,  $p=0.05$ ,  $n=5$ ) utilizando diferentes métodos de normalización. Los valores de expresión hepática de un gen de referencia (GR) o de diferentes combinaciones de GR se utilizaron para normalizar la expresión del gen hipotético.

El uso de dos o más GR como normalizadores está altamente recomendado, ya que el uso de múltiples GR permite, además de la obtención de resultados más exactos, realizar también una corroboración de la estabilidad cotejada previamente en cada experimento, utilizando a uno como referente del otro (Hellemans y col., 2007). La definición del número de genes a

utilizar (comenzando desde dos) debe involucrar la evaluación del balance entre el beneficio de mejorar la exactitud de la determinación (disminución del NEI) mediante el agregado de un nuevo GR, y los aumentos en costos y trabajo del experimento. La Figura 16 demuestra claramente que el uso de dos o más GR es un método de normalización más eficiente que el uso de un único GR en nuestras condiciones experimentales. Además, puede observarse que el uso de tres o más GR no mejora significativamente la eficiencia de la normalización, a juzgar por los valores de NEI promedio en ambos grupos de GR, y considerando aumento o disminución de la expresión. El análisis de los valores de NEI para cada uno de los tratamientos (individualmente) demuestra que la inclusión de un tercer GR no mejora la eficiencia de la normalización en ninguno de los cuatro tratamientos estudiados, en ambos grupos de GR en estudio (Figura adicional 3). Por todo lo mencionado, como conclusión, se recomienda el uso de los genes miARN-16/5S y B2M/18S para la normalización de la expresión de miARNs y ARNm, respectivamente, en los modelos de hepatotoxicidad aguda inducida por TA, TC, GA y AA.

Vandesompele y colaboradores (Vandesompele y col., 2002) definieron una variable “V”, la cual es utilizada para evaluar la mejora en el método de normalización que resulta de la adición secuencial de un GR, comparada con la combinación de normalizadores sin el nuevo gen. En este caso “ $V_{n/n+1}$ ” representa la variación entre el FN para n GR y el FN para n+1 GR. Como consecuencia, este valor refleja el efecto que tiene la inclusión de un gen adicional sobre la estabilidad del FN. De acuerdo a esta publicación, se considera que el agregado de un GR adicional no mejora la exactitud de la normalización significativamente si el valor  $V_{n/n+1}$  se encuentra por debajo del valor de corte 0.15. Si aplicamos este parámetro a nuestro conjunto de potenciales GR para miARNs, los valores calculados son:  $V_{2/3} = 0.114$ ,  $V_{3/4} = 0.122$ ,  $V_{4/5} = 0.085$  y  $V_{5/6} = 0.080$ . Encontramos completa coincidencia entre este criterio y el que se propone en este trabajo de Tesis (mediante el índice NEI), indicando que dos GR (miARN-16 y 5S) son los mejores normalizadores para los estudios de expresión de miARNs. Para el caso de los GR candidatos para la normalización de ARNm se observa una discrepancia entre el número de genes recomendados. Aplicando el criterio según Vandesompele y col., se recomienda el uso de tres GR ( $V_{2/3} = 0.174$  y  $V_{3/4} = 0.140$ ). Sin embargo, considerando que está reportado en la bibliografía que en algunos casos no se mejora significativamente la eficiencia de la normalización mediante el agregado de GR con valores V incluso mayores a 0.20 (Chang y col., 2010; Goossens y col., 2005; Kheirelseid y col., 2010; Smits y col., 2009), y también

considerando las ventajas técnicas y económicas del uso de un GR menos, se confirma la recomendación de emplear a los genes B2M y 18S como normalizadores.

#### 5.1.2.2. Confirmación de la expresión alterada de los genes de referencia candidatos excluidos

Para confirmar las alteraciones de la expresión de los GR candidatos en los hígados de las ratas tratadas reportadas en las secciones anteriores [a partir de la comparación de sus niveles de expresión sin normalizar (RQ) entre grupos tratados y controles], se utilizaron los GR propuestos para normalizar su expresión. Se calculó el FN como la media geométrica de la expresión relativa (RQ) de los pares de GR (miARN-16/5S para miARNs y B2M/18S para ARNm), y entonces las RQ de los transcritos a estudiar se dividieron por este valor, obteniendo así los valores de NRQ. Se aplicó el t-test para evaluar la diferencia en los niveles de expresión entre los grupos (previa transformación logarítmica del NRQ), aceptando diferencias significativas en caso de obtener un valor de  $p < 0.05$ . Se presentan los valores de NRQ como la media aritmética  $\pm$  SD ( $n=5$ ). El NRQ de U6 disminuyó en los hígados de las ratas tratadas con GA respecto de las ratas controles (C 1.00  $\pm$  0.16 vs. GA 0.42  $\pm$  0.04,  $p < 0.001$ ) y aumentó en los hígados de ratas tratadas con TA (C 1.00  $\pm$  0.05 vs. TA 1.45  $\pm$  0.21,  $p < 0.001$ ). Respecto de los GR candidatos para la normalización de ARNm, se observa un aumento en el NRQ de ACTB en los hígados de ratas tratadas con los cuatro tóxicos: AA (C 1.00  $\pm$  0.17 vs. AA 1.84  $\pm$  0.78,  $p < 0.05$ ), TC (C 1.00  $\pm$  0.10 vs. TC 1.74  $\pm$  0.45,  $p < 0.001$ ), GA (C 1.00  $\pm$  0.17 vs. GA 1.86  $\pm$  0.31,  $p < 0.001$ ) y TA (C 1.00  $\pm$  0.29 vs. TA 2.56  $\pm$  0.43,  $p < 0.001$ ). En los hígados de ratas tratadas con TC el gen ALB presentó una marcada disminución de su NRQ (C 1.00  $\pm$  0.22 vs. TC 0.35  $\pm$  0.07,  $p < 0.001$ ), mientras que, en las mismas ratas, CYCA aumentó significativamente su expresión (C 1.00  $\pm$  0.14 vs. TC 1.99  $\pm$  0.31,  $p < 0.001$ ). Finalmente, el gen GAPDH presentó un aumento en sus niveles de expresión en los hígados de ratas tratadas con AA (C 1.00  $\pm$  0.34 vs. AA 2.55  $\pm$  0.74,  $p < 0.005$ ) y con TC (C 1.00  $\pm$  0.16 vs. TC 1.64  $\pm$  0.36,  $p < 0.005$ ). Al haberse confirmada la alteración de la expresión de estos genes (inicialmente excluidos por presentar RQ alteradas), es posible aseverar que la estrategia propuesta en este trabajo para descartar posibles genes de referencia resultó adecuada.

Para evaluar la calidad de las determinaciones de los niveles de expresión se calcularon los parámetros M (Vandesompele y col., 2002) y el coeficiente de variación de los NRQ de los GR, en cada uno de los experimentos presentados en esta sección. Los valores resultantes en todos

los casos fueron debajo de los valores de corte sugeridos ( $M < 0.5$  y  $CV < 25\%$ , respectivamente), establecidos previamente (Hellemans y col., 2007).

En estudios previos se han descrito alteraciones similares de GAPDH y ACTB asociadas a la exposición de AA y TC, respectivamente. Heinloth y colaboradores (Heinloth y col., 2004) observaron que la expresión de GAPDH aumenta significativamente luego de un tratamiento de 24 y 48 hs con altas dosis de AA (1500 mg/kg) en ratas. Además, Armendáriz- Borunda y colaboradores (Armendáriz-Borunda y col., 1990) observaron un aumento de aproximadamente dos veces en los niveles del transcripto ACTB luego de un tratamiento de 24 hs con TC en ratas. Por lo tanto, es interesante remarcar que estas corroboraciones indican que las células hepáticas en los modelos experimentales evaluados están respondiendo a la exposición de los hepatotóxicos a nivel de expresión génica, representando otra validación importante del correcto establecimiento del modelo, junto con la evaluación de los marcadores plasmáticos de toxicidad y la observación histopatológica.

## *Capítulo 2*

**Estudio de la participación del miARN-122 en los modelos de hepatotoxicidad  
aguda: sus mecanismos regulatorios y funcionalidad.**

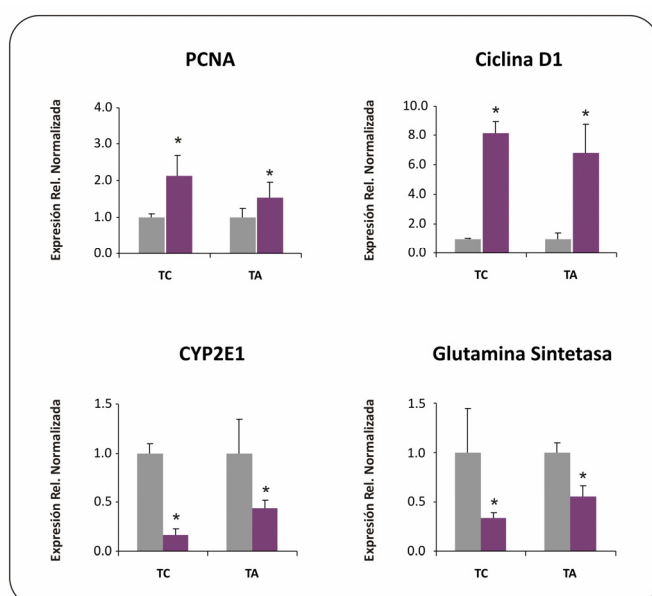
---

## CAPÍTULO 2: Estudio de la participación del miARN-122 en los modelos de hepatotoxicidad aguda: sus mecanismos regulatorios y funcionalidad.

Los compuestos TA, TC, TA y AA son hepatotoxinas clásicas empleadas en estudios de toxicidad para evaluar tratamientos hepatoprotectivos y para la identificación de biomarcadores potenciales (Zimmerman, 1999). Sin embargo, la mayor parte de los trabajos en donde se estudian los mecanismos de reparación del hígado luego de un daño agudo emplean a los tóxicos TC y TA (Mehendale, 2005). Por este motivo, la caracterización de la participación del miARN-122 en fenómenos de hepatotoxicidad de la segunda etapa de esta Tesis se llevó a cabo en los modelos de daño inducidos por estos dos tóxicos.

### 5.2.1. Caracterización del estado de proliferación y diferenciación celular

En los modelos experimentales de hepatotoxicidad aguda inducidos por TC y TA establecidos en el Capítulo 1 de esta Tesis se evaluaron los niveles de proliferación celular mediante la determinación de la expresión de los marcadores: antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y Ciclina D por RT-qPCR (Figura 17). Los niveles aumentados de estos transcritos demuestran que la proliferación hepática se encuentra aumentada a las 24 h de exposición a los xenobióticos. También se determinó la expresión del citocromo (CYP) 2E1 y glutamina sintetasa (GS), dos transcritos utilizados en este caso como marcadores de diferenciación de hepatocitos (Figura 17). Se observó que un daño agudo al hígado disminuye sus expresiones, indicando que el grado de diferenciación de las células hepáticas disminuye luego de 24 h de tratamiento.

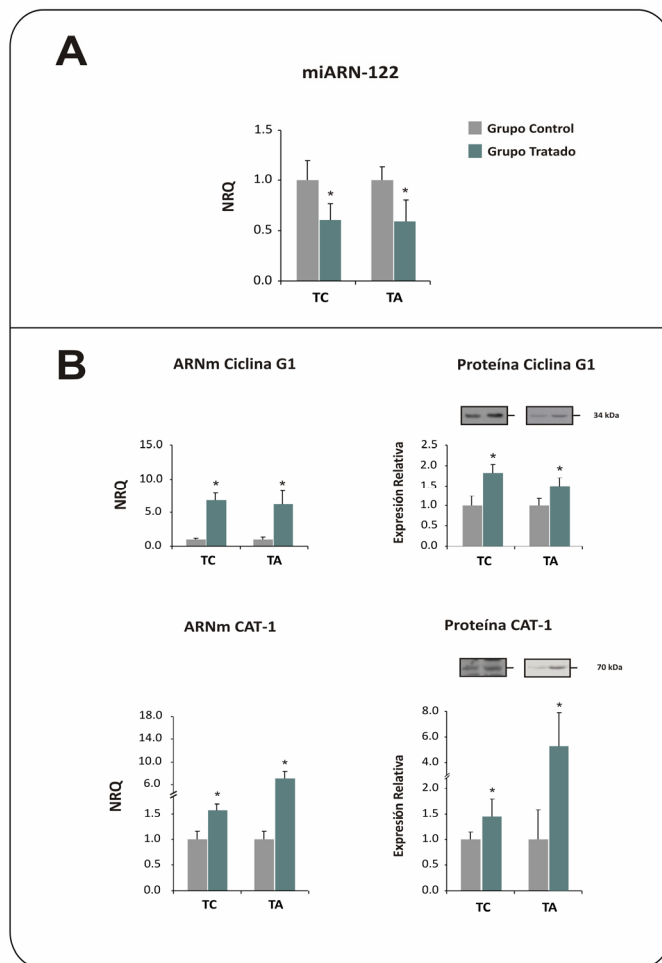


**Figura 17: Caracterización del estado de proliferación y diferenciación celular luego del daño inducido por tetracloruro de carbono (TC) y tioacetamida (TA).** Se evaluaron los niveles de Ciclina D, PCNA (marcadores de proliferación celular), CYP2E1 y GS (expresados en hepatocitos maduros) a través de RT-qPCR en ratas tratadas con TC o TA por 24 hs en comparación con las ratas tratadas con los respectivos vehículos. La Expresión Relativa Normalizada (NRQ) se obtuvo según fue descrito en la sección "Materiales y Métodos". Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.2. Evaluación de la red regulatoria del miARN-122

En los últimos años, varios grupos de investigación han demostrado que los mecanismos de regulación mediados por miARNs están implicados en mecanismos de hepatotoxicidad, regulando diferentes procesos celulares como la regulación de enzimas metabolizadoras de drogas y receptores nucleares (Yokoi y Nakajima, 2011). En este trabajo de Tesis, se estudió el comportamiento de la red regulatoria del miARN-122 debido a su abundancia, especificidad en el hígado y su rol regulatorio de las funciones hepáticas. Está demostrado que el miARN-122 es un efector crucial en la diferenciación hepatocitaria y en el metabolismo de lípidos, sin embargo, es altamente probable que cumpla otras funciones desconocidas en el hígado, en vista del alto número de genes blanco empíricamente validados (Tsai y col., 2009). Un reporte reciente propone que el miARN-122 está involucrado en procesos de hepatotoxicidad mediante la activación del Receptor Constitutivo de Androstano (CAR) inducida por fenobarbital (Shizu y col., 2002), sin embargo, su rol preciso y sus mecanismos regulatorios en fenómenos de toxicidad inducida por drogas no han sido establecidos.

Se determinaron los niveles de expresión del miARN-122 maduro a través de *Stem-Loop* RT-qPCR en los hígados de ratas luego de 24 h de tratamiento con TC y TA a las mayores dosis, y de ratas tratadas con sus correspondientes vehículos. Se observó que la expresión del miARN-122 disminuye significativamente en los grupos tratados, en comparación con los grupos controles (Figura 18). También se determinó la expresión de dos de los genes blanco del miARN-122, Ciclina G y CAT-1, a través de RT-qPCR y *Western blot*. La expresión de ambos, a nivel ARNm y proteína, se vieron aumentadas significativamente en las ratas con daño hepático agudo en relación a los animales de los grupos control (Figura 18). Estos resultados demuestran que existe una respuesta coherente de la red regulatoria del miARN-122 en procesos de hepatotoxicidad aguda, con una disminución de los niveles del miARN y un aumento en la expresión de sus genes blanco.



**Figura 18: Alteración de la red reguladora del miARN-122 durante el daño hepático.** A) Determinación de los niveles del miARN-122 maduro mediante Stem Loop RT-qPCR en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (TC) o tioacetamida (TA) por 24 hs en comparación con las ratas tratadas con los respectivos vehículos. B) Se midió la expresión de ARNm (izquierda) y proteína (derecha) de Ciclina G1 y CAT-1 mediante RT-qPCR y *Western blot*, respectivamente. Se obtuvo la Expresión Relativa Normalizada (NRQ) según fue descrito en la sección "Materiales y Métodos". La expresión proteica se normalizó mediante tinción con Rojo Ponceau (datos no mostrados). En todos los casos, los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La expresión reducida del miARN-122 se observó también utilizando otros compuestos, como dioxina y fenobarbital, según fue reportado previamente (Shizu y col., 2012; Yoshioka y col., 2011), pero el mecanismo de la alteración no fue caracterizado. Numerosos estudios demuestran que niveles reducidos del miARN-122 están asociados a la tumorigénesis hepática y proliferación celular (Chen y col., 2011; Tsai y col., 2009; Xu y col., 2010; Xu y col., 2012; Zeng y col., 2010) y que, además, muchos genes blanco validados del miARN-122 están involucrados en la proliferación celular (Tsai y col., 2009). Particularmente, CAT-1 es responsable del transporte de aminoácidos catiónicos, y este importe estimula la síntesis de ADN para la replicación celular (Byus y Wu, 1991). La Ciclina G1, por otro lado, modula la transición G2/M del ciclo celular, y evidencias experimentales obtenidas de líneas celulares cancerosas y xenoinjertos de tumores han demostrado que la supresión de Ciclina G1 reduce la

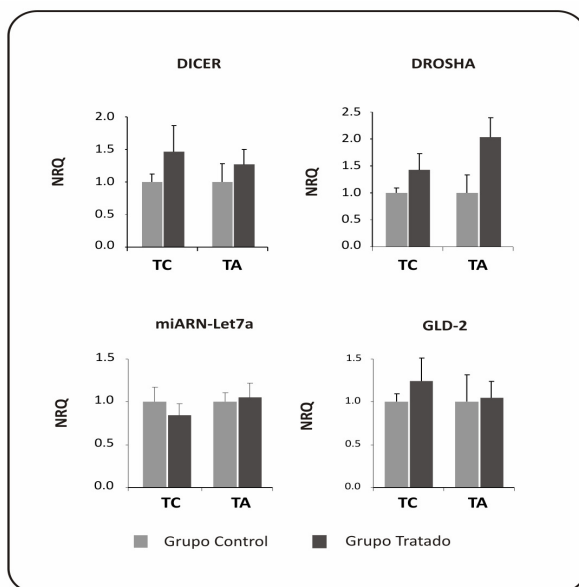
proliferación celular e induce la apoptosis, proceso que lleva a la inhibición del crecimiento tumores (Chen y col., 1997; Gordon y col., 2000). Considerando estos antecedentes, el aumento de CAT-1 y Ciclina G1 (Figura 18), y también los niveles de transcritos aumentados de PCNA y Ciclina D en nuestros modelos de hepatotoxicidad (Figura 17), se propone que la disminución de la expresión del miARN-122 luego del tratamiento por 24 h con TC y TA está asociada a un estatus de proliferación celular, el cual es parte de la respuesta regenerativa del hígado para reparar el daño causado.

### **5.2.3. Estudio de los distintos mecanismos que podrían explicar la alteración de la expresión del miARN-122 en los modelos de hepatotoxicidad establecidos.**

A pesar de que, en las últimas dos décadas, la importancia de la regulación por miARNs ha sido demostrada a través de un número creciente de trabajos publicados, los mecanismos por los cuales éstos son regulados en situaciones específicas, como la hepatotoxicidad, no han sido extensamente caracterizados.

#### 5.2.3.1. Estudio de mecanismos generales de regulación

En primera instancia, se consideró la posibilidad de que la expresión del miARN-122 esté reprimida como consecuencia de una alteración general en el procesamiento / estabilidad de los miARNs, ya que está demostrado que la expresión y actividad de DICER y DROSHA representan puntos importantes de regulación global de la biogénesis de miARNs (Schmittgen, 2008). Se determinaron los niveles de expresión de ARNm codificantes de DICER, DROSHA y GLD-2 en los hígados de ratas tratadas con TC y TA en comparación con sus grupos controles respectivos. También se midieron los niveles del miARN-Let7a, ya que está demostrado que regula negativamente la expresión de DICER (Forman y col., 2008). No se observó una disminución en la expresión de estos transcritos o miARN en los hígados de ratas de los modelos de hepatotoxicidad establecidos (Figura 19). Según estos resultados, y también considerando que varios otros miARNs (miARN-191, miARN-103 y miARN-16) no modifican su expresión en la hepatotoxicidad (Capítulo 1), se postula que los niveles de expresión reducidos del miARN-122 no son una consecuencia de una alteración general en el procesamiento o estabilidad de miARNs.



**Figura 19. La disminución del miARN-122 no está asociada a cambios de expresión de enzimas del procesamiento.** Se evaluaron los hígados luego de tratamiento por 24 h con: tetracloruro de carbono (TC) y tioacetamida (TA) o sus respectivos vehículos. Se evaluaron los niveles de DICER, DROSHA y GLD-2 a través de RT-qPCR, mientras que la expresión de miARN-Let7a se determinó por *Stem-Loop* RT-qPCR. La Expresión Relativa Normalizada (NRQ) se obtuvo según fue descrito en la sección “Materiales y Métodos”. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student.

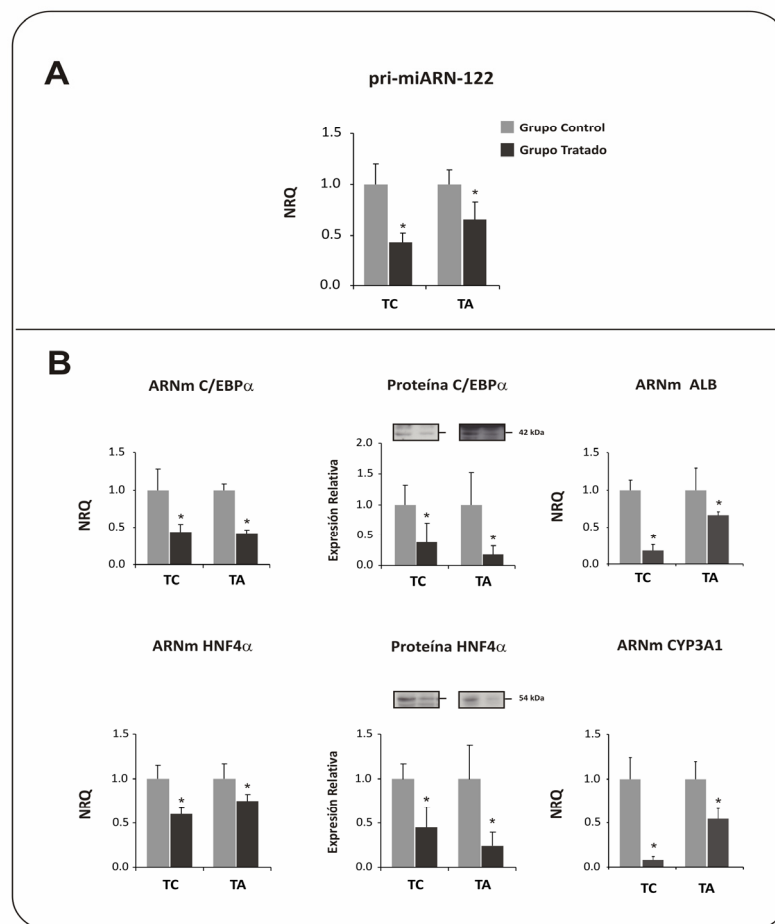
### 5.2.3.2. Estudio de mecanismos específicos de regulación del miARN-122

La transcripción es un punto principal de regulación de la biogénesis de miARNs. Existen numerosos factores de transcripción asociados a la ARN Polimerasa II que están involucrados en la modulación de la transcripción de varios genes de miARNs, entre ellos, los factores de transcripción específicos del miARN-122: C/EBP $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF3 $\beta$ , siendo los dos primeros los más importantes en la regulación de este miARN (Xu y col., 2010).

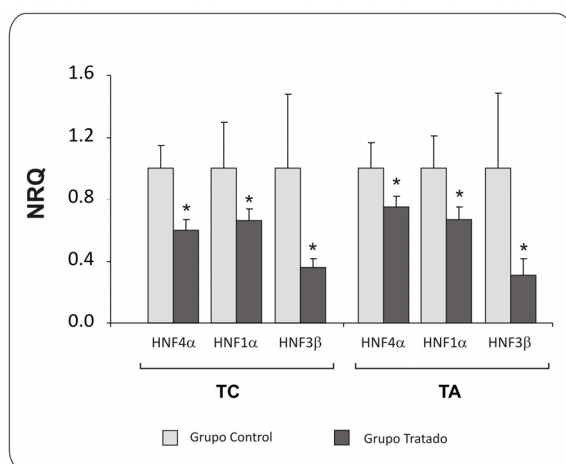
Se determinó la expresión del pri-miARN-122 en los hígados de ratas tratadas con las dos hepatotoxinas en estudio y sacrificadas a las 24 h post-tratamiento, en comparación con los grupos de ratas tratadas con los vehículos correspondientes. Se observó que el tratamiento con TC o TA redujo significativamente los niveles de pri-miARN-122 (Figura 20). Estos resultados sugieren que la expresión disminuida del miARN-122 inducida por estas drogas es una consecuencia, al menos en parte, de una reducción en la transcripción de su precursor.

Los niveles de expresión de ARNm de C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$  se vieron disminuidos en los modelos de hepatotoxicidad aguda establecidos, según fue estimado por RT-qPCR (Figura 20). Conforme a esto, los niveles proteicos de los mismos también disminuyeron en extractos nucleares (Figura 20), junto con los niveles de transcritos de otros miembros de la familia HNF (Figura 21). Finalmente, la expresión de transcritos de dos genes directamente regulados por

C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$ , ALB y CYP3A1 respectivamente, descendieron significativamente (Figura 20), demostrando que existe una respuesta coherente de la regulación de los factores de transcripción sobre otros genes blanco. Estos resultados sugieren que los niveles resultantes del miARN-122 en los hígados de ratas tratadas con TC o TA por 24 h están asociados a una disminución en la expresión de los LETFs.



**Figura 20. El daño al hígado disminuye la transcripción del pri-miARN-122.** Se evaluaron los hígados luego de tratamiento por 24 h con tetracloruro de carbono (TC) o tioacetamida (TA) o sus respectivos vehículos. A) Evaluación de los niveles del precursor del miARN-122 (pri-miARN-122) a través de RT-qPCR. B) Determinación de la expresión (ARNm y proteína) de los factores de transcripción C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$ , y sus genes directamente regulados (transcriptos ALB y CYP3A1, respectivamente) mediante RT-qPCR y Western blot. La Expresión Relativa Normalizada (NRQ) se obtuvo según fue descrito en la sección "Materiales y Métodos". La expresión proteica se determinó en extractos nucleares y se normalizó mediante tinción con Rojo Ponceau (datos no mostrados). En todos los casos, los resultados se expresan como la media +/- SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 21. Expresión reducida de los factores de transcripción de la familia HNF.** Determinación de los niveles de expresión de HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF3 $\beta$  mediante RT-qPCR en ratas tratadas con tetracloruro de carbono (TC) o tioacetamida (TA) por 24 hs en comparación con las ratas tratadas con los respectivos vehículos. La Expresión Relativa Normalizada (NRQ) se obtuvo según fue descrito en la sección “Materiales y Métodos”. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student.

Está demostrado que los niveles del miARN-122 aumentan en el tiempo junto con el desarrollo embrionario, alcanzando una meseta justo después del nacimiento (Chang y col., 2004), y que este incremento está fuertemente correlacionado de manera positiva con la expresión de LETFs en hígados de ratones en desarrollo (Xu y col., 2010). La expresión génica hepática está controlada por una red de LETFs (Cereghini, 1996), y se ha demostrado recientemente que la expresión del miARN-122 controla la diferenciación del hepatocito en una manera indirecta (Deng y col., 2013; Doddapaneni y col., 2013; Jung y col., 2011; Laudadio y col., 2012). En este trabajo, se propone que la disminución de la expresión de LETFs en los modelos de hepatotoxicidad establecidos conlleva a una disminución en la expresión del miARN-122 y que ambos procesos, en conjunto, inducen la desdiferenciación de las células hepáticas, con la concomitante pérdida de la expresión de genes específicos de hígado (Figura 20). Particularmente, la reducción en los niveles del citocromo CYP2E1 (Figura 20) inducida por la familia HNF (Cheung y col., 2003), responsable de la biotransformación y toxicidad hepática de TC y TA a sus metabolitos activos (Wang y col., 2000; Wong y col., 1998), contribuye a la protección de los hepatocitos de la exposición a los tóxicos.

La disminución de la expresión de C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$  también se encuentra asociada a la proliferación de los hepatocitos. Por ejemplo, se observa en carcinomas humanos hepatocelulares (Xu y col., 2001; Ning y col., 2010). Además, la transcripción de C/EBP $\alpha$  disminuye en el hígado regenerante (Mischoulon y col., 1992), y HNF4 $\alpha$  suprime la proliferación del hepatocito en ratones y células de hepatoma (Bonzo y col., 2012; Yin y col., 2008). Estos antecedentes apoyan nuestra hipótesis de que la disminución del miARN-122 en

el hepatocito, mediada por una reducción en la expresión de LETFs, conduciría a un proceso de proliferación celular para reparar el daño causado.

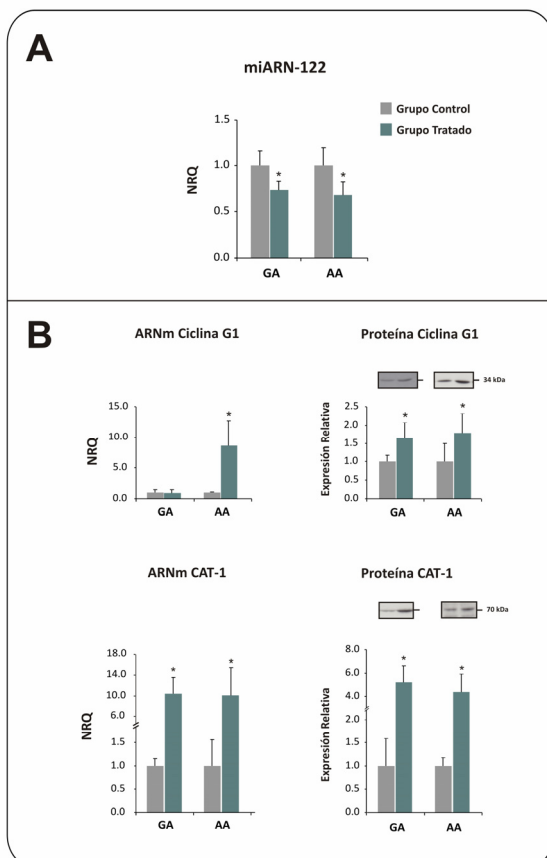
*Anexo*

---

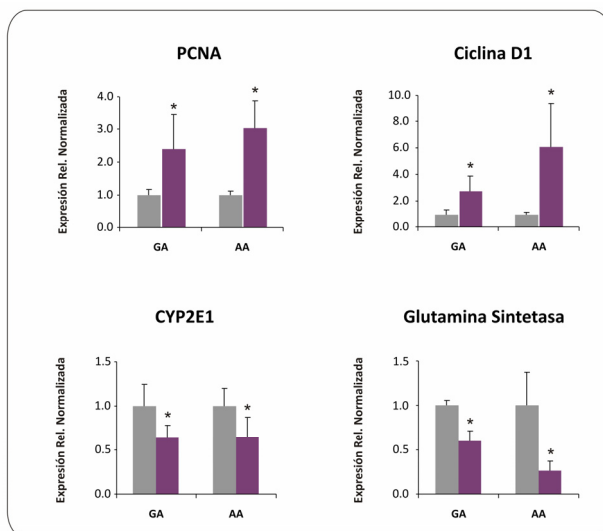
## 6. ANEXO

### **6.1. La disminución del miARN-122 en otros modelos de hepatotoxicidad permite proponerlo como una respuesta general de las células hepáticas en situaciones de injuria tóxica.**

La disminución en los niveles del miARN-122 acompañada por el aumento en la expresión de sus genes blanco Ciclina G1 y CAT-1 se observó también en los grupos de ratas tratadas con GA y AA a las mayores dosis, en comparación con los grupos control respectivos (Figura 22). Para el caso de Ciclina G1 en las ratas tratadas con GA, si bien no se obtuvo una expresión aumentada a nivel ARNm, sí se vieron aumentados sus niveles proteicos, corroborando de esta manera una expresión coherente miARN/gen blanco. Por otro lado, la administración de estos tóxicos por 24 hs también produce un aumento en la proliferación celular y una disminución de la diferenciación celular, según indican los niveles de PCNA, Ciclina D1, CYP2E1 y GS (Figura 23). Estos resultados permiten inferir, de manera general, que un daño agudo al hígado (independientemente del tóxico administrado) produce una disminución en la expresión del miARN-122, con la consecuente liberación de la inhibición de la expresión de sus genes blanco, y esto se encuentra asociado a un estadio de proliferación y desdiferenciación celular.



**Figura 22: Alteración de la red regulatoria del miARN-122 durante el daño hepático.** A) Determinación de los niveles del miARN-122 maduro mediante Stem Loop RT-qPCR en ratas tratadas con D-galactosamina (GA) o acetaminofeno (AA) por 24 hs en comparación con las ratas tratadas con los respectivos vehículos. B) Se midió la expresión de ARNm (izquierda) y proteína (derecha) de Ciclina G1 y CAT-1 mediante RT-qPCR y *Western blot*, respectivamente. Se obtuvo la Expresión Relativa Normalizada (NRQ) según fue descrito en la sección “Materiales y Métodos”. La expresión proteica se normalizó mediante tinción con Rojo Ponceau (datos no mostrados). En todos los casos, los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 23. Proliferación aumentada en células hepáticas luego del daño inducido por D-galactosamina (GA) y acetaminofeno (AA).** Se evaluaron los niveles de Ciclina D, PCNA (marcadores de proliferación celular), CYP2E1 y GS (expresados en hepatocitos maduros) a través de RT-qPCR en ratas tratadas con GA o AA por 24 hs en comparación con las ratas tratadas con los respectivos vehículos. La Expresión Relativa Normalizada (NRQ) se obtuvo según fue descrito en la sección “Materiales y Métodos”. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 5 animales por grupo. Para las comparaciones estadísticas se empleó el test t de Student. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Las drogas en etapas de desarrollo pueden presentar complicaciones en cualquier fase de su evaluación (clínica o pre-clínica), y cuanto más tarde se presentan estas complicaciones, mayores son las consecuencias. Una de las pruebas más importantes que debe superar una

droga para ser incorporada en el mercado es su ausencia de toxicidad, y esto se lleva a cabo, en la práctica, mediante su administración en modelos animales y mediante estudios en modelos *in vitro* empleando, por ejemplo, hepatocitos en cultivo primario. La comprensión de los mecanismos moleculares y celulares asociados a las EHID permite identificar factores de riesgo y facilita el desarrollo de estrategias para predecir y prevenir dichas enfermedades (Gómez-Lechón y col., 2010). Para lograr un estudio preciso y confiable de la toxicidad producida por drogas en hepatocitos, varios marcadores clave deberían ser evaluados. Una selección cuidadosa de una batería de *tests* puede proveer de pruebas tempranas de toxicidad. En la actualidad se emplean marcadores de hepatotoxicidad que evalúan: i) viabilidad celular e integridad de membrana (por ej: niveles de LDH intracelular, pérdida de enzimas citosólicas, *test* de exclusión del colorante azul de tripano, etc); ii) parámetros metabólicos generales (por ej: ensayo MTT, contenido de ATP y GSH, peroxidación lipídica, formación de ROS, etc); iii) funciones hepáticas específicas (por ej: síntesis de urea, inducción de citocromos P450, formación y secreción de glucosa, síntesis y acumulación de lípidos, morfología celular, etc) (Gómez-Lechón y col., 2010). Por otro lado, el análisis de la expresión génica aplicada a estudios toxicológicos (toxicogenómica) está siendo rápidamente incorporado por la industria farmacéutica para identificar drogas seguras de una manera más rápida, sensible y menos costosa (Yang y col., 2004). La disminución del miARN-122 encontrada en los cuatro modelos de hepatotoxicidad evaluados en esta Tesis, sumada a la observada en otros modelos inducidos por dioxina y fenobarbital (Shizu y col., 2012; Yoshioka y col., 2011) podría aportar una herramienta valiosa a ser incorporada dentro del conjunto de genes a determinar en estudios de toxicidad por drogas, ya que parecería representar, como se mencionó en el párrafo anterior, una respuesta no restringida a un tóxico en particular, sino general luego de un daño al hígado. La expresión basal del miARN-122 en cultivo primario de hepatocitos por 24 hs demostró ser estable (datos no mostrados), lo cual representa un requisito fundamental a ser considerado para ser incorporado como biomarcador de toxicidad *in vitro*.

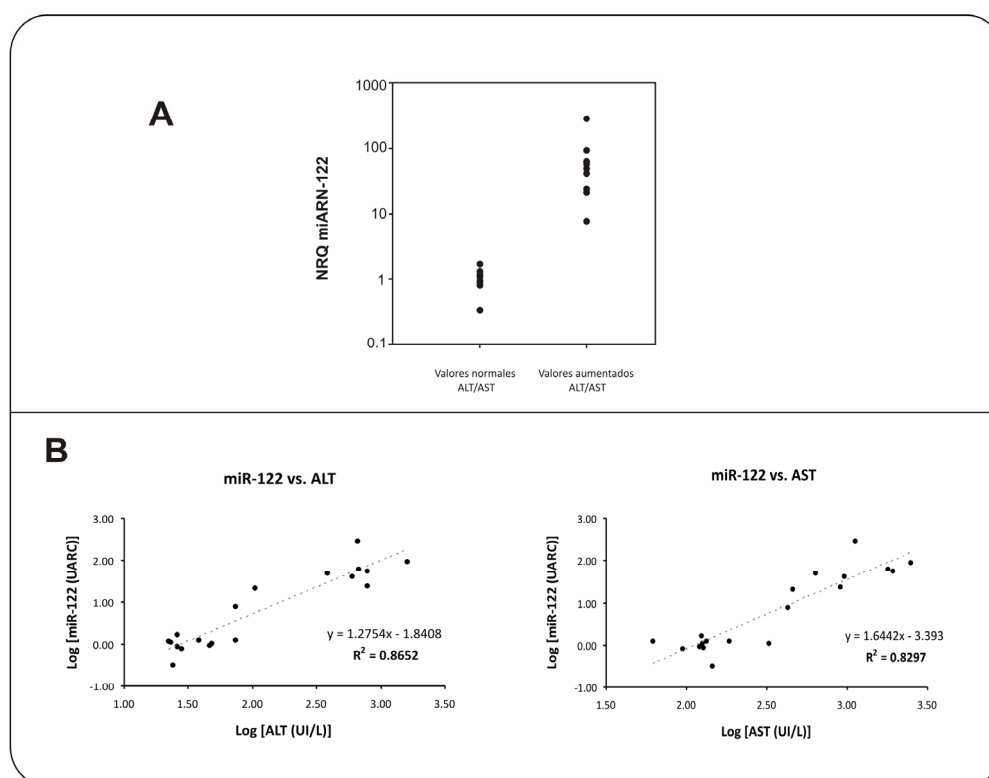
## 6.2. Correlación entre la liberación en sangre del miARN-122 y transaminasas en la hepatotoxicidad

Aunque inicialmente se pensaba que los miARNs eran moléculas inestables, recientemente se demostró que circulan de manera altamente estable y libre de células en varios fluidos corporales, incluyendo suero, plasma, saliva, orina y leche materna. Además, se demostró que los niveles circulantes de miARNs se ven alterados significativamente en una variedad de condiciones patológicas, como el cáncer, la diabetes y en daños tisulares (Chen y col., 2012). Estas propiedades, sumadas a la expresión altamente específica de numerosos miARNs, facilitan su uso como biomarcadores de enfermedades. Los perfiles de miARNs en el hígado de ratas de modelos de daño hepático pueden resultar muy útiles para la identificación de biomarcadores específicos y sensibles para diferenciar la patogénesis de daños hepáticos agudos o crónicos, y también injurias hepatocelulares, colestáticas, esteatosis, esteatohepatitis y fibrosis (Yokoi y Nakajima, 2013). Recientemente, Wang y colaboradores (Wang y col., 2009) demostraron que la hepatotoxicidad mediada por AA aumenta los niveles de miARN-122 y miARN-192 en el plasma de ratones, dependiendo de la dosis administradas y del tiempo de tratamiento. Este aumento resultó estar correlacionado a los niveles de ALT y a los cambios histopatológicos del hígado.

Se planteó evaluar el comportamiento del miARN-122 en la sangre de ratas presentando daño hepático agudo inducido por tóxicos. Se obtuvieron muestras de ARN total de sangre entera a partir de las ratas tratadas con TC (0, 0.1, 0.4 y 1 ml/kg de peso corporal), TA (0, 10, 50, 150 mg/kg de peso corporal) y AA (0, 0.3, 0.6 y 1.2 g/kg de peso corporal) y de las ratas tratadas con vehículo. Los niveles de miARN-122 se determinaron mediante *Stem-Loop* RT-qPCR, empleando al 5S como gen de referencia. Este gen de referencia se escogió a partir de una búsqueda bibliográfica de estudios por RT-qPCR en modelos similares. Se observó que el miARN-122 aumenta significativamente en sangre luego de un daño agudo al hígado (Figura 24 A). Se corroboró que las cantidades relativas del 5S no varían significativamente en los modelos establecidos. Sin embargo, debido a que la magnitud de cambio de la expresión del miARN-122 fue muy alta (rango 7.8 a 285.2), no se consideró estrictamente necesaria la validación de genes de referencia óptimos, ya que el error introducido en los múltiples pasos de la RT-qPCR resulta no significativo frente a un cambio biológico tan importante.

Para evaluar la correlación entre la magnitud del daño hepático determinado por los valores séricos de ALT o AST y el aumento en los niveles del miARN-122, los valores del miARN

fueron graficados en función de la actividad de ALT o AST en la muestra correspondiente. Las variables se expresaron en relación con los niveles de controles y se graficaron como log10 (Figura 24 b). Debido a que el tamaño de la muestra para cada grupo de dosis fue insuficiente para probar el test de asunción de normalidad, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (Pe, paramétrico) y por rangos de Spearman (Sp, no paramétrico). Se observó una correlación significativa y muy importante entre miARN-122 y ALT (Pe:  $r = 0.93$ ,  $p < 0.001$ ; Sp:  $r_s = 0.83$ ,  $p < 0.001$ ) y entre miARN-122 y AST (Pe:  $r = 0.91$ ,  $p < 0.001$ ; Sp:  $r_s = 0.82$ ,  $p < 0.001$ ). Estos resultados apoyan la hipótesis del uso potencial de miARN-122 como biomarcador sanguíneo de hepatotoxicidad.



**Figura 24. Estudio de correlación del miARN-122 vs. ALT / AST en sangre de rata:** **A)** Se evaluaron los niveles del miARN-122 a través de Stem Loop RT-qPCR en la sangre de ratas que presentaron daño hepático agudo (valores aumentados de ALT/AST) inducido por tetracloruro de carbono, tioacetamida o acetaminofeno, en comparación con las ratas sin daño al hígado (valores normales de ALT/AST). La Expresión Relativa Normalizada (NRQ) se obtuvo según fue descrito en la sección “Materiales y Métodos”. **B)** Los valores de expresión de miARNs-122 fueron graficados en función del valor de actividad de ALT o AST sérica en la muestra correspondiente. Las variables se expresaron en relación con los niveles de controles y se graficaron como log10. Se observó una correlación significativa y muy importante entre miARN-122 y ALT (Pe:  $r = 0.91$ ,  $p < 0.001$ ; Sp:  $r_s = 0.79$ ,  $p < 0.001$ ).

El rol de la liberación del miARN-122 en sangre no ha sido estudiado hasta el momento. Se piensa que los miARNs secretados representan un nuevo mecanismo por el cual las células dadoras pueden influenciar la expresión génica de células receptoras. Los mecanismos secretores no están claramente establecidos, aunque se han sugerido tres mecanismos posibles: i) liberación pasiva a partir de células dañadas, ii) secreción activa mediante microvesículas, y iii) secreción activa a través de mecanismos dependientes de proteínas de unión a ARN (Chen y col., 2012). Un estudio reciente demostró que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) pueden asociarse a miARNs exógenos e introducirlos en células receptoras (Vickers y col., 2011). Por otro lado, Arroyo y colaboradores (Arroyo y col., 2011) demostraron que una porción significativa de miARNs circulan en plasma asociados a la proteína AGO2. Respecto del mecanismo de liberación en sangre del miARN-122, los antecedentes son contradictorios, existiendo evidencias del miARN-122 tanto unido a AGO2 (Arroyo y col., 2011) como incluido en exosomas (Gallo y col., 2012). Estas evidencias abren un nuevo y novedoso campo de investigación que aportaría importantes herramientas para el diagnóstico de enfermedades hepáticas. ¿Qué conexión existe entre la disminución del miARN-122 en hígado y su aumento en sangre? ¿Qué rol fisiológico cumple el miARN-122 liberado? ¿Cuáles serían las células receptoras y por qué mecanismos atraviesa la membrana plasmática? Son algunas de las tantas preguntas que quedan por resolver.

## *Conclusiones Generales*

---

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

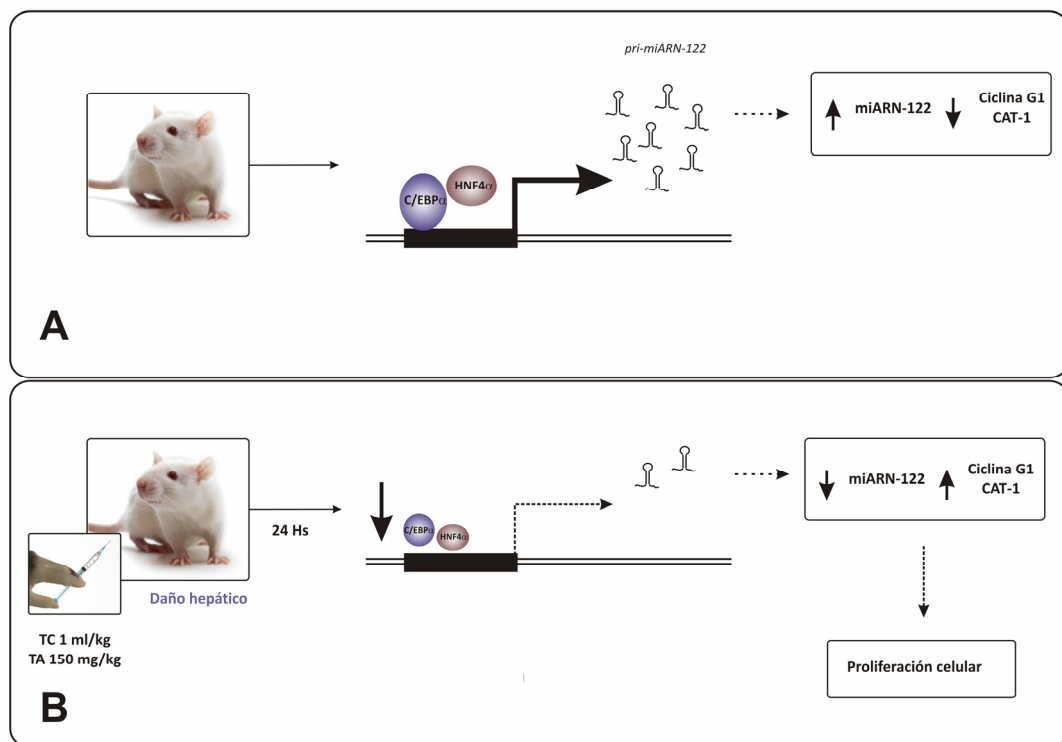
El desarrollo de nuevos fármacos, la incorporación de nuevos aditivos alimenticios y el aumento de la producción de desechos industriales hacen que de manera voluntaria o accidental nuestro organismo entre en contacto con un amplio espectro de sustancias químicas que, en los últimos años, causó un incremento en la importancia epidemiológica de la toxicidad hepática. El desarrollo de modelos experimentales de hepatotoxicidad ha permitido un estudio más riguroso y exhaustivo de esta patología, lo que conllevó a la caracterización mecanística de los fenómenos de toxicidad aportando herramientas para el diagnóstico, el tratamiento y la predicción de efectos adversos de drogas en desarrollo.

La validación de los modelos de hepatotoxicidad aguda inducida por TA, TC, GA y AA a través de la verificación del daño producido estuvo en concordancia con los reportes previos. Se confirmó la respuesta del hígado a la exposición de las cuatro hepatotoxinas a través de los estudios dosis-respuesta de los niveles de transaminasas plasmáticas y de la examinación histopatológica.

En este trabajo se presenta la primera comparación validada experimentalmente de potenciales GR para incluir en la normalización de la expresión génica de miARNs y ARNm por RT-qPCR en modelos de hepatotoxicidad aguda en ratas. Este trabajo fue llevado a cabo siguiendo una estrategia original de pasos secuenciales, donde la confirmación de la no alteración de la expresión de los GR candidatos debido al tratamiento aplicado resultó ser un aspecto importante. Se validó el uso combinado de los genes miARN-16/5S y B2M/18S como métodos óptimos de normalización de la expresión de miARNs y ARNm en hígado, respectivamente, en los modelos de hepatotoxicidad establecidos. Por lo tanto, los métodos de normalización propuestos en este trabajo contribuirán a mejorar los estudios sobre los mecanismos de hepatotoxicidad, permitiendo la obtención de medidas de expresión más exactas y confiables.

Se realizó un estudio integral de la regulación de la expresión del miARN-122 en eventos de hepatotoxicidad, que involucró la evaluación de su expresión, la de su transcrito primario y de genes blanco validados, de enzimas del procesamiento de miARNs y de factores de transcripción específicos de este miARN. Esta estrategia contribuirá al establecimiento de un modelo general para estudiar situaciones análogas. Los resultados obtenidos sugieren que un daño agudo al hígado produce una regulación negativa del miARN-122, y que este fenómeno es el resultado, al menos en parte, de una disminución en la transcripción de su precursor,

debido a una caída en la expresión de los factores de transcripción C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$  (Figura 25). Se propone que la regulación del miARN-122 a través de los LETFs en fenómenos de hepatotoxicidad está asociada a la respuesta hepática de autoprotección y recuperación del daño causado, a través de los mecanismos de diferenciación y proliferación celular, respectivamente. La alteración de la red regulatoria del miARN-122 en las ratas tratadas con los cuatro tóxicos en estudio permite hipotetizar que éste representa un mecanismo general de respuesta del hepatocito frente a una injuria tóxica.



**Figura 25. Esquema representativo del modelo propuesto acerca de la participación del miARN-122 en la hepatotoxicidad aguda.** A) La expresión proteica de Ciclina G1 y CAT-1 está regulada, al menos en parte, por un mecanismo post-transcripcional mediado por el miARN-122, cuyos niveles se encuentran bajo regulación, principalmente, por los factores de transcripción C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$ . B) Un daño agudo al hígado inducido por los tóxicos tetracloruro de carbono (TC) o tioacetamida (TA) induce una disminución en la transcripción del precursor del miARN-122 (pri-miARN-122), causado por una caída en los niveles de C/EBP $\alpha$  y HNF4 $\alpha$ . Esto produce una disminución en la expresión del miARN-122 maduro, acompañado por un aumento en la de sus genes blanco, lo cual, en última instancia, induce un aumento en la proliferación celular.

*Figuras adicionales*

---

## 8. FIGURAS ADICIONALES

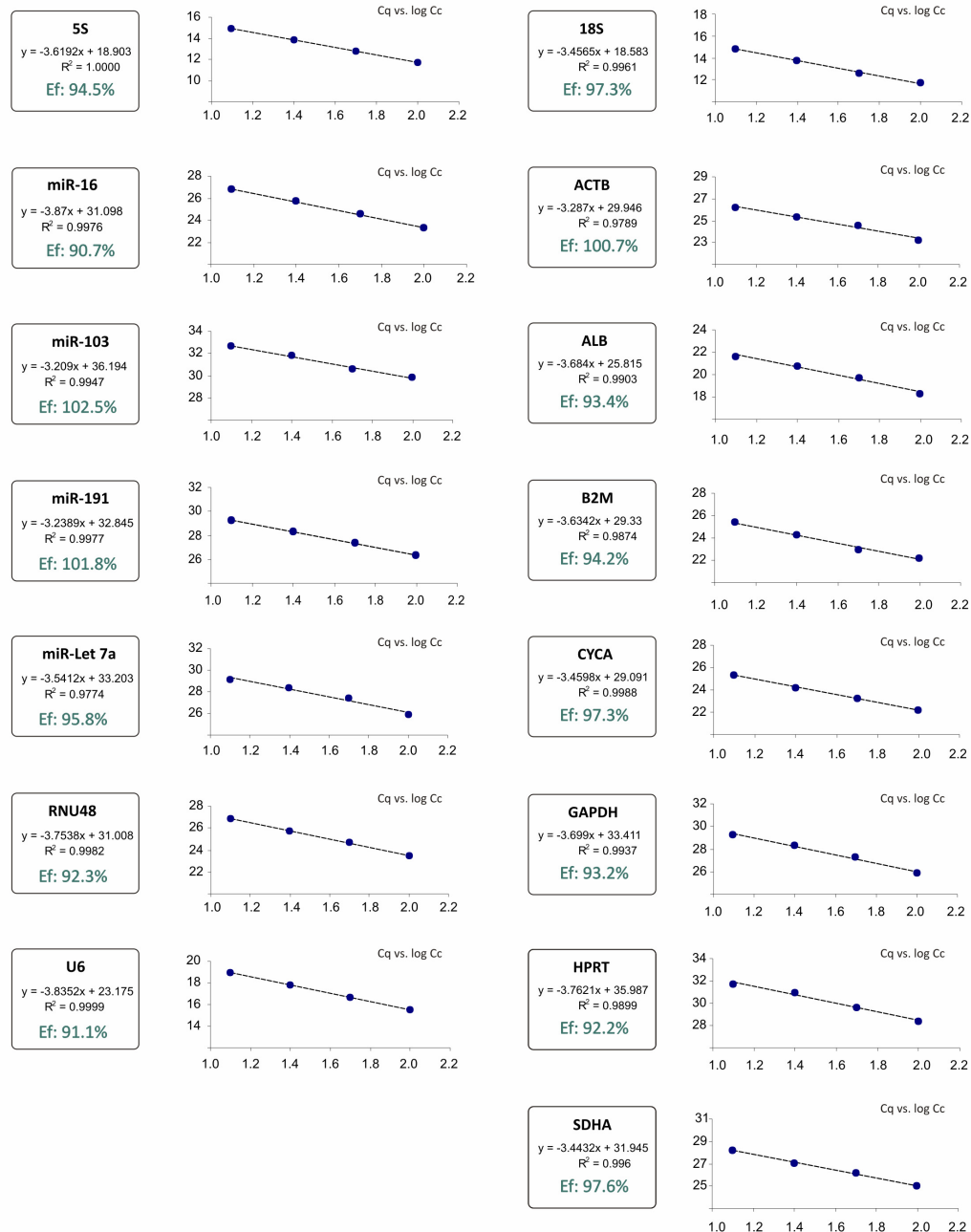


Figura adicional 1. Cálculo de eficiencias de amplificación para cada cebador de potenciales genes de referencia. Las curvas estándares se crearon mediante diluciones seriadas al medio de un mix de ADNc.

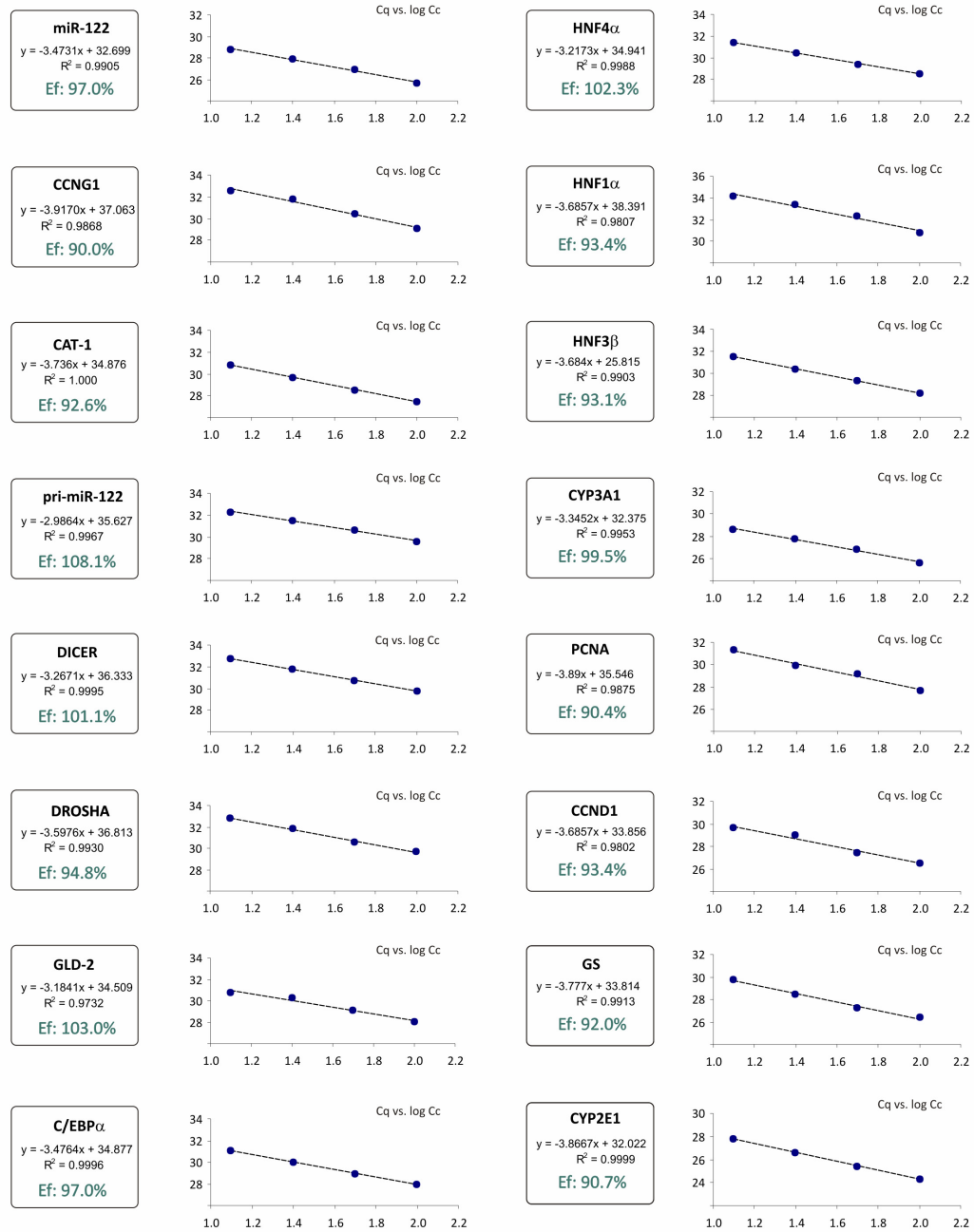
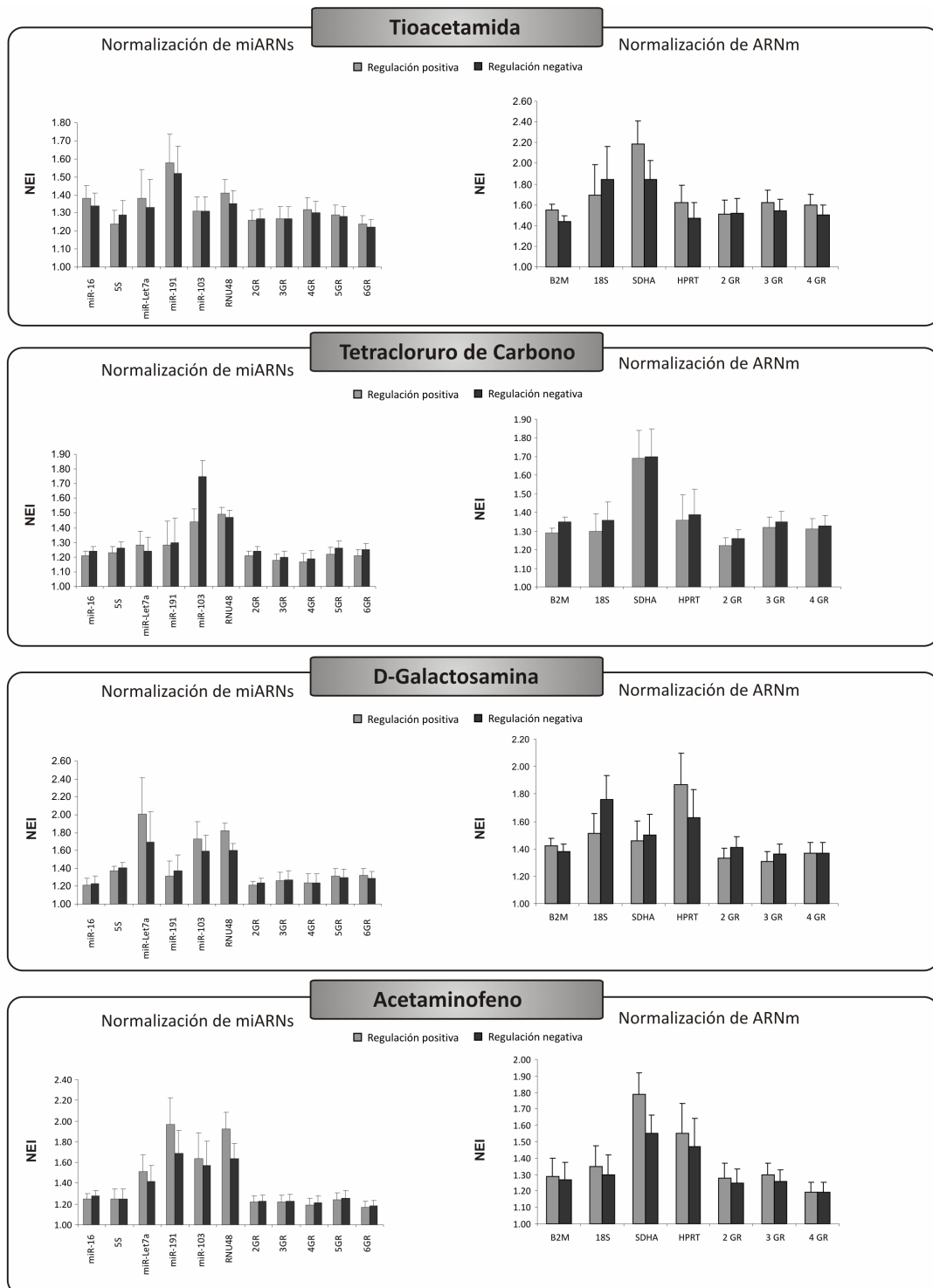


Figura adicional 2. Cálculo de eficiencias de amplificación para cada cebador de genes de interés. Las curvas estándares se crearon mediante diluciones seriadas al medio de un mix de ADNc.



**Figura adicional 3. Estudio de la eficiencia de la normalización de los genes de referencia candidatos para la normalización de miARNs y ARNm en modelos de hepatotoxicidad inducidos por tioacetamida, tetracloruro de carbono, D-galactosamina y acetaminofeno.** Se muestran los valores del Índice de eficiencia de la normalización (NEI) para los cuatro tratamientos con cada método de normalización de miARNs y ARNm. Se muestra para las situaciones de aumento y disminución de la expresión. Se define el valor NEI como el mínimo cambio (aumento o disminución) en la expresión simulada de un gen de interés hipotético necesario para observar diferencias estadísticamente significativas (t-test,  $p=0.05$ ,  $n=5$ ) utilizando diferentes métodos de normalización. Los valores de expresión hepática de un gen de referencia (GR) o de diferentes combinaciones de GR se utilizaron para normalizar la expresión del gen hipotético.

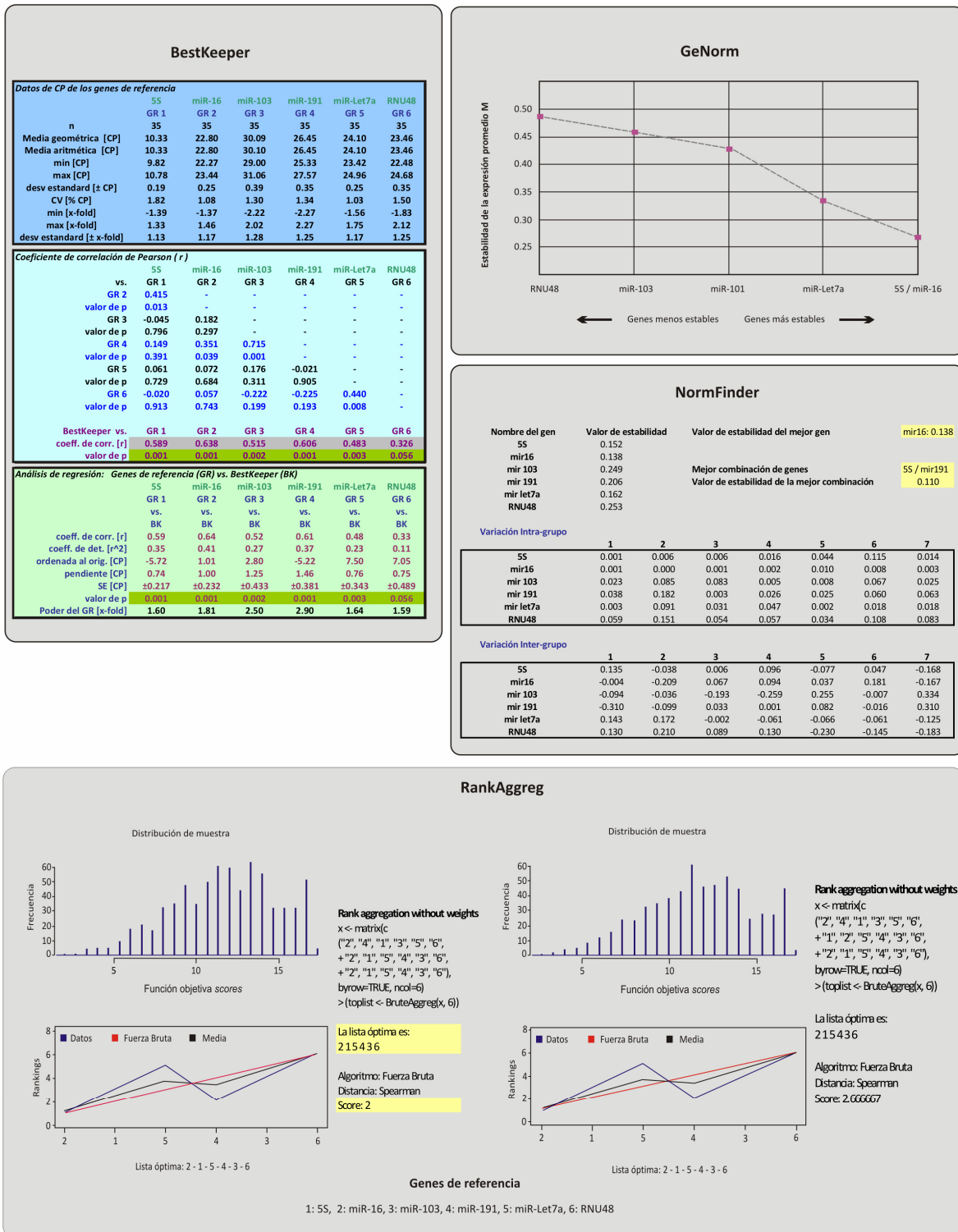
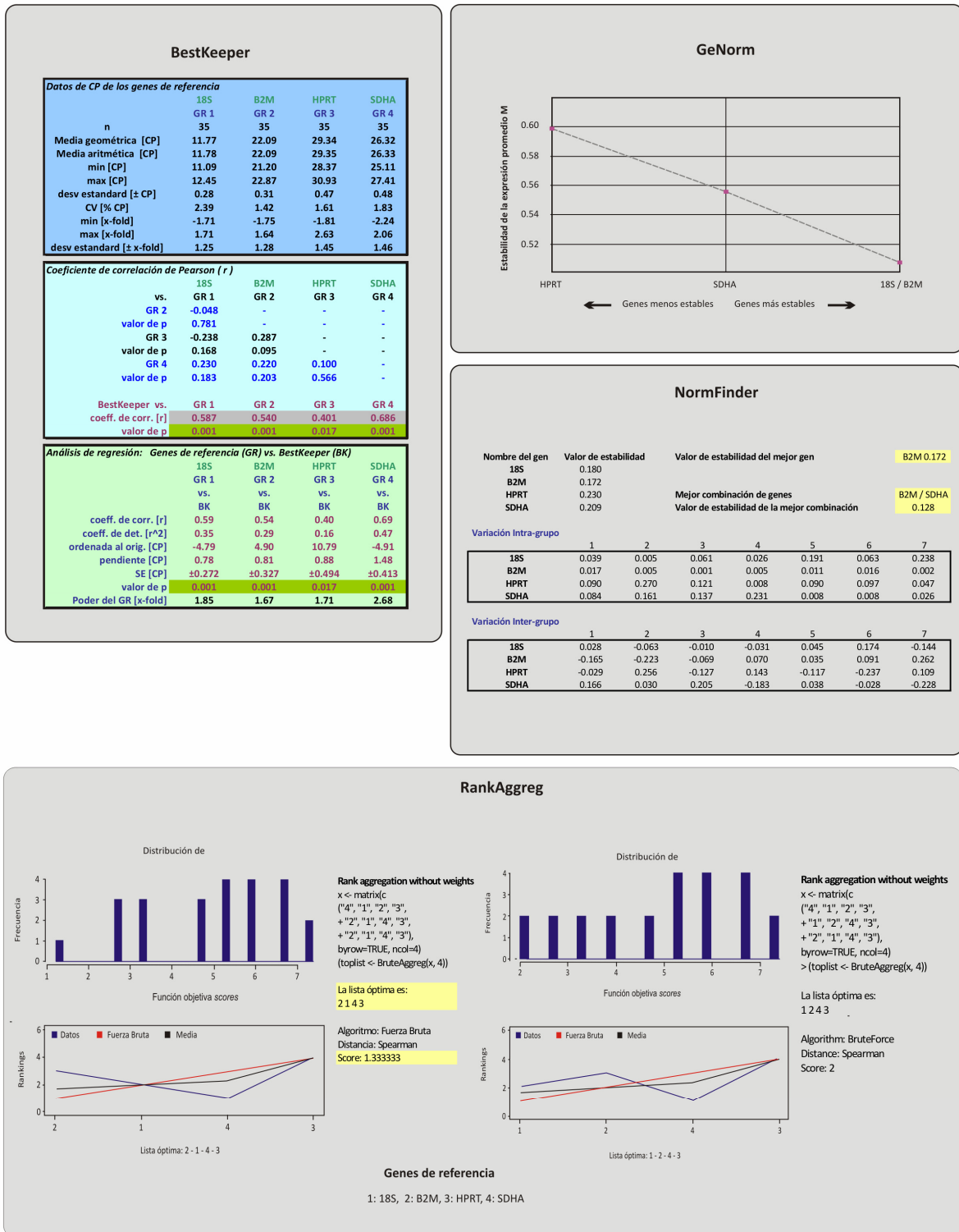


Figura adicional 4: Salida de los programas empleados para el establecimiento de un ranking de los genes de referencia candidatos para la normalización de miARNs.



### RankAggreg

Distribución de

Rank aggregation without weights  
`x <- matrix(c(
 ("4", "1", "2", "3",
 + "2", "1", "4", "3",
 + "2", "1", "4", "3"),
 byrow=TRUE, ncol=4)
 (toplist <- BruteAggreg(x, 4))`

La lista óptima es:  
2 1 4 3

Algoritmo: Fuerza Bruta  
 Distancia: Spearman  
 Score: 1.333333

Distribución de

Rank aggregation without weights  
`x <- matrix(c(
 ("4", "1", "2", "3",
 + "1", "2", "4", "3",
 + "2", "1", "4", "3"),
 byrow=TRUE, ncol=4)
 > (toplist <- BruteAggreg(x, 4))`

La lista óptima es:  
1 2 4 3

Algoritmo: BruteForce  
 Distancia: Spearman  
 Score: 2

Rankings

Lista óptima: 2 - 1 - 4 - 3

Genes de referencia

1: 18S, 2: B2M, 3: HPRT, 4: SDHA

Figura adicional 5: Salida de los programas empleados para el establecimiento de un ranking de los genes de referencia candidatos para la normalización de ARNm.

## *Referencias*

---

## 9. REFERENCIAS

- ❖ Abboud, G. y Kaplowitz, N. (2007) Drug-induced liver injury. *Drug Saf.* 30, 277–94.
- ❖ Almeida, M. I., Reis, R. M., y Calin, G. A. (2011) MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res Fund Mol M.* 717(1), 1-8.
- ❖ Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403–410.
- ❖ Andersen, C. L., Jensen, J. L. y Orntoft, T. F. (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250.
- ❖ Apte, U. M., Limaye, P. B., Desai, D., Bucci, T. J., Warbritton, A. y Mehendale, H. M. (2003). Mechanisms of increased liver tissue repair and survival in diet-restricted rats treated with equitoxic doses of thioacetamide. *Toxicol Sci.* 72(2), 272-282.
- ❖ Armendariz-Borunda, J., Seyer, J. M., Kang, A. H. y Raghov, R. (1990) Regulation of TGF beta gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. *FASEB J.* 4(2), 215-221.
- ❖ Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... y Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *P Natl A Sci.* 108(12), 5003-5008.
- ❖ Bala, S., Marcos, M. y Szabo, G. (2009) Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 15, 633–5640.
- ❖ Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2), 281-297.
- ❖ Benes, V. y Castoldi, M. (2010) Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods.* 50(4), 244.
- ❖ Benhamou, J. P. (1986) Drug-Induced hepatitis: clinical aspects. In: Fillastre JP, ed. *Hepatotoxicity of drugs.* Rouen: University de Rouen. 22-30.
- ❖ Bonzo, J. A., Ferry, C. H., Matsubara, T., Kim, J. H. y Gonzalez, F. J. (2012) Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in adult mice. *J Biol Chem.* 287(10), 7345-7356.
- ❖ Byus, C. V. y Wu, V. S. (1991) The level of substrate ornithine can alter polyamine dependent DNA synthesis following phorbol ester stimulation of cultured hepatoma cells. *J Cell Physiol.* 149(1), 9-17.

- ❖ Cai, Z. W y Mehendale, H. M. (1991). Protection from CCl<sub>4</sub> toxicity by prestimulation of hepatocellular regeneration in partially hepatectomized gerbils. *Biochem Pharmacol.* 42(3), 633-644.
- ❖ Calabrese, E. J. y Mehendale, H. M. (1996). A review of the role of tissue repair as an adaptive strategy: why low doses are often non-toxic and why high doses can be fatal. *Food Chem Toxicol.* 34(3), 301-311.
- ❖ Cereghini, S. (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10(2), 267-282.
- ❖ Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M. A., Xu, C., Mason, W. S., Moloshok, T., Bort, R., Zaret, K. S. y Taylor, J. M. (2004) miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol.* 1(2):106-113.
- ❖ Chang, K. H., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Kerin, M. J. y Miller, N. (2010) MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *Bmc Cancer.* 10(1), 173.
- ❖ Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T. ... y Guegler, K. J. (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 33(20), e179-e179.
- ❖ Chen, D. S., Zhu, N. L., Hung, G., Skotzko, M. J., Hinton, D. R., Tolo, V., Hall, F. L., Anderson, W. F. y Gordon, E. M. (1997) Retroviral vector-mediated transfer of an antisense cyclin G1 construct inhibits osteosarcoma tumor growth in nude mice. *Hum Gene Ther.* 8, 1667-74.
- ❖ Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. y Zhang, C. Y. (2012) Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 22(3), 125-132.
- ❖ Chen, X., Murad, M., Cui, Y. Y., Yao, L. J., Venugopal, S. K., Dawson, K. y Wu, J. (2011) miRNA regulation of liver growth after 50% partial hepatectomy and small size grafts in rats. *Transplantation.* 91(3), 293.
- ❖ Cheung, C., Akiyama, T. E., Kudo, G. y Gonzalez, F. J. (2003) Hepatic expression of cytochrome P450s in hepatocyte nuclear factor 1-alpha (HNF1 $\alpha$ )-deficient mice. *Biochem Pharmacol.* 66(10), 2011-2020.
- ❖ Coen, M., Hong, Y. S., Clayton, T. A., Rohde, C. M., Pearce, J. T., Reilly, M. D., ... y Nicholson, J. K. (2007). The mechanism of galactosamine toxicity revisited; a metabolomic study. *J Proteome Res.* 6(7), 2711-2719.
- ❖ D'Ambrogio, A., Gu, W., Udagawa, T., Mello, C. C. y Richter, J. D. (2012) Specific miRNA Stabilization by Gld2-catalyzed Monoadenylation. *Cell reports.* 2, 1537-1545.

- ❖ De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmans, F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 60, 604-617.
- ❖ Deng, X. G., Qiu, R. L., Wu, Y. H., Li, Z. X., Xie, P., Zhang, J. ... y Deng, J. M. (2013) Overexpression of miR-122 promotes the hepatic differentiation and maturation of mouse ESCs through a miR-122/FoxA1/HNF4a-positive feedback loop. *Liver Int.* 3 (10).
- ❖ Doddapaneni, R., Chawla, Y. K., Das, A., Kalra, J. K., Ghosh, S. y Chakraborti, A. (2013) Overexpression of microRNA-122 enhances in vitro hepatic differentiation of fetal liver-derived stem/progenitor cells. *J Cell Biochem.* 114(7), 1575-1583.
- ❖ Dorak, M. T. (2006). Real-time PCR. Editor: Taylor & Francis. Reino Unido.
- ❖ Erson, A. E. y Petty, E. M. (2008) MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet.* 74(4), 296-306.
- ❖ Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Watts, L., Booten, S. L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B. A., Freier, S., Bennett, C. F., Bhanot, S. y Monia, B. P. (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 3(2),87-98.
- ❖ Farazi, T. A., Hoell, J. I., Morozov, P. y Tuschl, T. (2013) MicroRNAs in Human Cancer. En: *MicroRNA Cancer Regulation* (pp. 1-20). Springer Netherlands.
- ❖ Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. y Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391(6669), 806-811.
- ❖ Forman, J. J., Legesse-Miller, A. y Coller, H. A. (2008) A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets DICER within its coding sequence. *P Nat A Sci.* 105(39), 14879-14884.
- ❖ Fox, B. C., Devonshire, A. S., Schutte, M. E., Foy, C. A., Minguéz, J., Przyborski, S. ... y Marshall, D. (2010) Validation of reference gene stability for APAP hepatotoxicity studies in different in vitro systems and identification of novel potential toxicity biomarkers. *Toxicol In Vitro.* 24(7), 1962-1970.
- ❖ Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. y Bartel, D. P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19(1), 92-105.
- ❖ Fukushima, T., Hamada, Y., Yamada, H. y Horii, I. (2007) Changes of micro-RNA expression in rat liver treated by acetaminophen or carbon tetrachloride—regulating role of micro-RNA for RNA expression. *J Toxicol Sci.* 32, 401–409.
- ❖ Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. y Illei, G. G. (2012) The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*, 7(3), e30679.
- ❖ Gant, T. W. y Zhang, S. D. (2005) In pursuit of effective toxicogenomics. *Mutat Res.* 575(1-2),4-16.

- ❖ Goossens, K., Van Poucke, M., Van Soom, A., Vandesompele, J., Van Zeveren, A. y Peelman, L. J. (2005) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. *BMC Dev Biol.* 5(1), 27.
- ❖ Gordon, E. M., Liu, P. X., Chen, Z. H., Liu, L., Whitley, M. D., Gee, C., Groshen, S., Hinton, D. R., Beart, R. W. y Hall, F. L. (2000) Inhibition of metastatic tumor growth in nude mice by portal vein infusions of matrix-targeted retroviral vectors bearing a cytotoxic cyclin G1 construct. *Cancer Res.* 60, 3343–7.
- ❖ Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V. y Donato, M. T. (2010). The use of hepatocytes to investigate drug toxicity. En: *Hepatocytes* (pp. 389-415). Humana Press.
- ❖ Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C. G., Calin, G. A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G. L., Croce, C. M., Bolondi, L. y Negrini, M. (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 67(13), 6092-6099.
- ❖ Guo, S. y Kemphues, K. J. (1995) Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.* 81(4), 611-620.
- ❖ Hajovsky, H., Hu, G., Koen, Y., Sarma, D., Cui, W., Moore, D. S. ... y Hanzlik, R. P. (2012). Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 25(9), 1955-1963.
- ❖ Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. y Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10), 986-994.
- ❖ Heinloth, A. N., Irwin, R. D., Boorman, G. A., Nettesheim, P., Fannin, R. D., Sieber, S. O., ... y Paules, R. S. (2004). Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol Sci.* 80(1), 193-202.
- ❖ Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. y Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8. R19.
- ❖ Jopling, C. L. (2012) Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.* 9(2), 137-142.
- ❖ Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. y Sarnow, P. (2005) Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science.* 309(5740), 1577-1581.
- ❖ Jung, C. J., Iyengar, S., Blahnik, K. R., Ajuha, T. P., Jiang, J. X., Farnham, P. J. y Zern, M. (2011). Epigenetic modulation of miR-122 facilitates human embryonic stem cell self-renewal and hepatocellular carcinoma proliferation. *PloS one*, 6(11), e27740.

- ❖ Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G. y Jung, K. (2007) In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 8(1), 47.
- ❖ Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T. y Suzuki, T. (2009) Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.* 23, 433–438.
- ❖ Kheirleisid, E. A., Chang, K. H., Newell, J., Kerin, M. J. y Miller, N. (2010) Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. *BMC Mol. Biol.* 11(1), 12.
- ❖ Kim, V. N., Han, J. y Siomi, M. C. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 10(2), 126-139.
- ❖ Kodavanti, P. R., Joshi, U. M., Young, R. A., Meydrech, E. F. y Mehendale, H. M. (1989). Protection of hepatotoxic and lethal effects of CCl<sub>4</sub> by partial hepatectomy. *Toxicol Pathol.* 17(3), 494.
- ❖ Koeppen, B.M. y Stanton, B.A. (2009). Funciones de transporte y metabólicas del hígado. En: Berne y Levy Fisiología, 6ta edición. Editores: Koeppen, B.M. y Stanton, B.A. Diorki Servicios Integrales de Edición. Pp 542-553.
- ❖ Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J. y Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 37(5), 495-500.
- ❖ Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M. y Stoffel, M. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 438(7068), 685-689.
- ❖ Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S. T. y Ghoshal, K. (2006) Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem.* 99(3), 671-678.
- ❖ Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 12, 735-739.
- ❖ Laudadio, I., Manfredi, I., Achouri, Y., Schmidt, D., Wilson, M. D., Cordi, S., Thorrez, L., Knoops, L., Jacquemin, P., Schuit, F., Pierreux, C. E., Odom, D. T., Peers, B. y Lemaigre, F. P. (2012) A feedback loop between the liver-enriched transcription factor network and miR-122 controls hepatocyte differentiation. *Gastroenterology.* 142(1), 119–129.
- ❖ Lee, R. C., Feinbaum, R. L. y Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75(5), 843-854.
- ❖ Li, H., Li, W. X. y Ding, S. W. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 296(5571), 1319-1321.
- ❖ Li, Z. Y., Xi, Y., Zhu, W. N., Zeng, C., Zhang, Z. Q., Guo, Z. C., ... y Liang, C. C. (2011). Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4 $\alpha$ . *J Hepatol.* 55(3), 602-611.

- ❖ Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 25, 402–408.
- ❖ Li, Y. L., Ye, F., Hu, Y., Lu, W. G. y Xie, X. (2009) Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem*. 394(1), 110-116.
- ❖ Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurements with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-75.
- ❖ Mallona, I., Lischewski, S., Weiss, J., Hause, B. y Egea-Cortines, M. (2010) Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biol*. 10(1), 4.
- ❖ Mangipudy, R. S., Chanda, S. y Mehendale, H. M. (1995a) Hepatocellular regeneration: key to thioacetamide autoprotection. *Pharmacol Toxicol*. 77, 182–8.
- ❖ Mangipudy, R. S., Chanda, S. y Mehendale, H. M. (1995b). Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect*. 103, 260–7.
- ❖ Mangipudy, R. S., Rao, P. S. y Mehendale, H. M. (1996). Effect of antimetabolic agent colchicine on thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect*. 104, 744–9.
- ❖ Manibur Rahman, T. y Hodgson, H. J. F. (2000). Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol*. 81(2), 145-157.
- ❖ Mattick, J. S. (2007) A new paradigm for developmental biology. *J Exp Biol*. 210(9), 1526-1547.
- ❖ Mehendale, H. M. (1995a) Injury and repair as opposing forces in risk assessment. *Toxicol Lett* 82–83, 891–9.
- ❖ Mehendale, H. M. (1995b) Toxicodynamics of lowlevel toxicant interactions of biological significance: inhibition of tissue repair. *Toxicology*. 105, 251–66.
- ❖ Mehendale, H. M. (2005) Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury. *Toxicol Pathol*. 33(1), 41-51.
- ❖ Mehendale, H. M., Roth, R. A., Gandolfi, A. J., Klaunig, J. E., Lemasters, J. J. y Curtis, L. R. (1994). Novel mechanisms in chemically induced hepatotoxicity. *FASEB J*. 8, 1285–95.
- ❖ Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. y Vandesompele, J. (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 10(6), R64.
- ❖ Meyer, S. U., Pfaffl, M. W. y Ulbrich, S. E. (2010) Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a ‘normal’ way to a hidden layer of complexity?. *Biotechnol Lett*. 32(12), 1777-1788.

- ❖ Mischoulon, D., Rana, B., Bucher, N. L. y Farmer, S. R. (1992) Growth-dependent inhibition of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP alpha) gene expression during hepatocyte proliferation in the regenerating liver and in culture. *Mol Cell Biol.* 12(6), 2553-2560.
- ❖ Mullis, K. B., Erlich, H. A., Gelfand, D. H., Horn, G. y Saiki, R. K. (1990) U.S. Patent No. 4,965,188. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- ❖ Napoli, C., Lemieux, C. y Jorgensen, R. A. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 2, 279–289.
- ❖ Navarro, V. J. y Senior, J. R. (2006) Drug-related hepatotoxicity. *New Engl J Med.* 354(7), 731-739.
- ❖ Ning, B. F., Ding, J., Yin, C., Zhong, W., Wu, K., Zeng, X. y Xie, W. F. (2010) Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  suppresses the development of hepatocellular carcinoma. *Cancer res.* 70(19), 7640-7651.
- ❖ Nolan, T., Hands, R. E. y Bustin, S. A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc.* 1(3), 1559-1582.
- ❖ Okamura, K. y Lai, E. C. (2008) Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 9(9), 673-678.
- ❖ Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- ❖ Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. y Neuvians, TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 26, 509–515.
- ❖ Pihur, V., Datta, S. y Datta S (2009) RankAggreg, an R package for weighted rank aggregation. *BMC Bioinformatics* 10(1), 62.
- ❖ Pogribny, I. P., Tryndyak, V. P., Boyko, A., Rodriguez-Juarez, R., Beland, F. A. y Kovalchuk, O. (2007) Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure. *Mutat Res.* 619, 30–37.
- ❖ Pohjanvirta, R., Niittynen, M., Lindén, J., Boutros, P. C., Moffat, I. D. y Okey, A. B. (2006) Evaluation of various housekeeping genes for their applicability for normalization of mRNA expression in dioxin-treated rats. *Chem-Biol Interact.* 160(2), 134-149.
- ❖ Ponton, F., Chapuis, M. P., Pernice, M., Sword, G. A. y Simpson, S. J. (2011) Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol.* 57, 840–850.

- ❖ Rao, P. S., Mangipudy, R. S. y Mehendale, H. M. (1997). Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology*. 118(2), 181-193.
- ❖ Rao, V. C. y Mehendale, H. M. (1991). Colchicine antimitosis abolishes CCl<sub>4</sub> autoprotection. *Toxicol Pathol*. 19(4-2), 597-606.
- ❖ Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E. y Ruvkun, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403(6772), 901-906.
- ❖ Ritchie, W., Rasko, J. E. y Flamant, S. (2013) MicroRNA Target Prediction and Validation. En: *MicroRNA Cancer Regulation* (pp. 39-53). Springer Netherlands.
- ❖ Rozen, S. y Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 132, 365–386
- ❖ Sameshine Y, Shiozaki Y, Mizuno T, Sasahaiva M, Suzuki A. (1974) Clinical statistics on drug-induced liver injuries: drug-induced liver injuries in Japan in the last 30 years. *Jpn J Gastroenterol* 71:799.
- ❖ Schmittgen, T. D. (2008) Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*. 12(5b), 1811-1819.
- ❖ Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 3(6), 1101-1108.
- ❖ Sen, G. L. y Blau, H. M. (2006) A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J*. 20(9), 1293-1299.
- ❖ Sevignani, C., Calin, G. A., Siracusa, L. D. y Croce, C. M. (2006) Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*. 17(3), 189-202.
- ❖ Shier, D., Butler, J. L. y Lewis, R. (2009) Digestive System. En: *Hole's Human Anatomy and Physiology*, 12<sup>o</sup> Ed.; Editor: F.Schreiber; The McGraw-Hill Companies, Inc, New York.
- ❖ Shizu, R., Shindo, S., Yoshida, T. y Numazawa, S. (2012) MicroRNA-122 Down-Regulation Is Involved in Phenobarbital-Mediated Activation of the Constitutive Androstane Receptor. *PloS one*. 7(7), e41291.
- ❖ Shu, J., Kren, B.T., Xia, Z., Wong, P. Y. P., Li, L., Hanse, E. A., Min, M. X., Li, B., Albrecht, J. H., Zeng, Y., Subramanian, S. y Steer, C. J. (2011) Genomewide microRNA down-regulation as a negative feedback mechanism in the early phases of liver regeneration. *Hepatology*. 54 (2), 609–619.
- ❖ Sittig, M. (1985) *Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens*, 2<sup>da</sup> ed., pp 856–879, Noyes Publications, Park Ridge, NJ.

- ❖ Siomi, H. y Siomi, M. C. (2010) Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 38, 323–332.
- ❖ Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. y Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 12(4), 246-258.
- ❖ Smits, K., Goossens, K., Van Soom, A., Govaere, J., Hoogewijs, M., Vanhaesebrouck, E., ... y Peelman, L. (2009) Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in equine in vivo and fresh and frozen-thawed in vitro blastocysts. *BMC research notes*. 2(1), 246.
- ❖ Taub, R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 5(10), 836-847.
- ❖ Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., ... y Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 75(2), 291-295.
- ❖ Tsai, W. C., Hsu, P. W., Lai, T. C., Chau, G.Y., Lin, C.W., Chen, C.M., Lin, C.D., Liao, Y.L., Wang, J.L., Chau, Y.P., Hsu, M.T., Hsiao, M., Huang, H.D., Tsou, A.P. (2009) MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 49, 1571-1582.
- ❖ Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T. y Yokoi, T. (2006). MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res*. 66(18), 9090-9098.
- ❖ Umbach, J. L. y Cullen, B. R. (2009). The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Gene Dev*. 23(10), 1151-1164.
- ❖ Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy N y col. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- ❖ Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. y Remaley, A. T. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 13(4), 423-433.
- ❖ Wang, G. P. y Xu, C. S. (2010) Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Mol Biotechnol*. 46(1), 49-57.
- ❖ Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L. E. y Galas, D. J. (2009) Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106, 4402–4407.
- ❖ Wang, T., Fontenot, R. D., Soni, M. G., Bucci, T. J. y Mehendale, H. M. (2000). Enhanced hepatotoxicity and toxic outcome of thioacetamide in streptozotocin-induced diabetic rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 166(2), 92-100.

- ❖ Wang, T., Shankar, K., Ronis, M. J. y Mehendale, H. M. (2000) Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther.* 294(2),473-479.
- ❖ Weber, L. W., Boll, M. y Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *CRC Cr Rev Toxicol.* 33(2), 105-136.
- ❖ Whitcomb, D. C. y Block, G. D. (1994) Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. *JAMA* 272, 1845.
- ❖ Wong, M. L. y Medrano, J. F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75.
- ❖ Xing, W., Deng, M., Zhang, J., Huang, H., Dirsch, O. y col. (2009) Quantitative evaluation and selection of reference genes in a rat model of extended liver resection. *J Biomol Tech.* 20,109–115.
- ❖ Xu, H., He, J. H., Xiao, Z.D., Zhang, Q. Q., Chen, Y. Q., Zhou, H. y Qu, L. H. (2010) Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology.* 52, 1431–1442.
- ❖ Xu, J., Zhu, X., Wu, L., Yang, R., Yang, Z., Wang, Q. y Wu, F. (2012). MicroRNA-122 suppresses cell proliferation and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma by directly targeting Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Liver Int.* 32(5), 752-760.
- ❖ Xu, L., Hui, L., Wang, S., Gong, J., Jin, Y., Wang, Y. y Hu, G. (2001). Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer res.* 61(7), 3176-3181.
- ❖ Yang, Y., Blomme, E. A. y Waring, J. F. (2004). Toxicogenomics in drug discovery: from preclinical studies to clinical trials. *Chem-Biol Interact.* 150(1), 71-85.
- ❖ Yin, C., Lin, Y., Zhang, X., Chen, Y. X., Zeng, X., Yue, H. Y., Hou, J. L., Deng, X., Zhang, J. P., Han, Z. G. y Xie, W. F. (2008) Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  gene. *Hepatology.* 48(5), 1528-1539.
- ❖ Yokoi, T. y Nakajima, M. (2011). Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs. *Toxicol Sci.* 123(1), 1-14.
- ❖ Yokoi, T. y Nakajima, M. (2013). microRNAs as Mediators of Drug Toxicity. *Annu Rev Pharmacol.* 53, 377-400.
- ❖ Yoshioka, W., Higashiyama, W. y Tohyama, C. (2011) Involvement of microRNAs in dioxin-induced liver damage in the mouse. *Toxicol Sci.* 122(2), 457-465.
- ❖ Zeng, C., Wang, R., Li, D., Lin, X. J., Wei, Q. K., Yuan, Y., Wang, Q., Chen, W. y Zhuang, S. M. (2010) A novel GSK-3 beta-C/EBP alpha-miR-122-insulin-like growth factor 1

receptor regulatory circuitry in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 52, 1702–1712.

- ❖ Zimmerman, H. J. (1999) *Hepatotoxicity*. En: Zimmerman HJ, 2da Ed. *Hepatotoxicity*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- ❖ Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Diagrama del lobulillo hepático	3
<b>Figura 2</b>	Biotransformación de compuestos exógenos	5
<b>Figura 3</b>	Modelo de dos etapas propuesto por Mehendale	7
<b>Figura 4</b>	Metabolismo de la tioacetamida (TA)	9
<b>Figura 5</b>	Metabolismo del tetracloruro de carbono (TC)	10
<b>Figura 6</b>	Metabolismo de la D-galactosamina (GA)	11
<b>Figura 7</b>	Metabolismo del acetaminofeno (AA)	12
<b>Figura 8</b>	Representaciones gráficas de curvas de amplificación y disociación	17
<b>Figura 9</b>	Descripción esquemática de la técnica Stem Loop RT-Qpcr	18
<b>Figura 10</b>	Procesamiento de los miARNs	25
<b>Figura 11</b>	Determinación de niveles de marcadores de daño hepático en suero	44
<b>Figura 12</b>	Estudio anatomopatológico sobre tejido hepático	45
<b>Figura 13</b>	Esquema de trabajo para un estudio de selección de genes de referencia	46
<b>Figura 14</b>	Diagrama de cajas y bigotes de los ciclos de cuantificación (Cq) de RT-qPCR de los genes de referencia (GR) candidatos	48
<b>Figura 15</b>	Efecto de la exposición de hepatotóxicos sobre la expresión hepática de genes de referencia candidatos en la rata	50
<b>Figura 16</b>	Estudio de la eficiencia de la normalización de los genes de referencia candidatos	55
<b>Figura 17</b>	Caracterización del estado de proliferación y diferenciación celular luego del daño inducido por tetracloruro de carbono (TC) y tioacetamida (TA).	59
<b>Figura 18</b>	Alteración de la red regulatoria del miARN-122 durante el daño hepático	61
<b>Figura 19</b>	La disminución del miARN-122 no está asociada a cambios de expresión de enzimas del procesamiento	63

<b>Figura 20</b>	El daño al hígado disminuye la transcripción del pri-miARN-122	64
<b>Figura 21</b>	Expresión reducida de los factores de transcripción de la familia HNF	65
<b>Figura 22</b>	Alteración de la red regulatoria del miARN-122 durante el daño hepático	68
<b>Figura 23</b>	Proliferación aumentada en células hepáticas luego del daño inducido por D-galactosamina (GA) y acetaminofeno (AA)	68
<b>Figura 24</b>	Estudio de correlación del miARN-122 vs. ALT / AST en sangre de rata	71
<b>Figura 25</b>	Esquema representativo del modelo propuesto acerca de la participación del miARN-122 en la hepatotoxicidad aguda	74
<b>Figura adicional 1</b>	Cálculo de eficiencias de amplificación para cada cebador de potenciales genes de referencia	75
<b>Figura adicional 2</b>	Cálculo de eficiencias de amplificación para cada cebador de genes de interés	76
<b>Figura adicional 3</b>	Estudio de la eficiencia de la normalización de los genes de referencia candidatos para la normalización de miARNs y ARNm en modelos de hepatotoxicidad inducidos por tioacetamida, tetracloruro de carbono, D-galactosamina y acetaminofeno	77
<b>Figura adicional 4</b>	Salida de los programas empleados para el establecimiento de un ranking de los genes de referencia candidatos para la normalización de miARNs	78
<b>Figura adicional 5</b>	Salida de los programas empleados para el establecimiento de un ranking de los genes de referencia candidatos para la normalización de ARNm	79

## **Índice de Tablas**

<b>Tabla 1</b>	Dosis administradas y vehículos empleados para cada uno de los hepatotóxicos estudiados	31
<b>Tabla 2</b>	Descripción de los genes de referencia candidatos seleccionados y los genes de interés	34
<b>Tabla 3</b>	Características de los cebadores utilizados para la cuantificación por RT-qPCR de potenciales genes de referencia	35
<b>Tabla 4</b>	Características de los cebadores utilizados para la cuantificación por RT-qPCR de genes de interés	36
<b>Tabla 5</b>	Ranking de los genes de referencia candidatos de acuerdo a sus valores de estabilidad	53