



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**Respuesta del complejo proteico
nucleorredoxina/proteína fosfatasa 2A durante
la hepatocarcinogénesis experimental *in vivo***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA
ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

Alexia Viridiana Montes Aparicio

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Jaime Arellanes
Robledo

COASESOR: Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate
Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A Él porque sin esperar lo me enviaste, tienes proyectadas metas para mí, que yo ni siquiera puedo imaginar.

“Sigue pidiendo y recibirás lo que pides, sigue buscando y encontrarás, sigue llamando y la puerta se te abrirá. Pues todo el que pide, recibe, todo el que busca encuentra, y a todo el que llama se le abrirá “

Mateo 7:7-8

A mis padres por guiarme, por todo el amor y cada lección aprendida juntos, ustedes son parte de este primer paso.

A mis dos valientes médicos Valeria y Ximena por tantas risas, por los logros compartidos, por enseñarme y ser ejemplo de resiliencia.

A mi gran familia Aparicio que siempre me ha apoyado, que en verdad valoró y les agradezco.

A Sergio Fuentes Hernández por ser amigo, maestro, compañero intelectual y de vida. Por llenar de tanto color, por no dejarme rendir, por escuchar y asesorarme cuando más lo necesite.

A mis amigos Silvano, Cheyenne, Luis Alberto, Valerie, Rey, Adriana, Ivan por toda la motivación que me han dado.

A mis grandes amigos científicos Dafne, Brisa, Sergio, Areli, Osiris, Javier, por enseñarme a vencer siempre la frustración con alegría, risas y mucha unión.

A Dr. Ignacio por guiarme desde mi ingreso a la facultad hasta el final de ella, porque sin querer sus materias impartidas me fueron guiando a realizar mi sueño en la biología celular.

A Dr. Jimmy por la confianza que deposito en mí, por ser ejemplo de humildad, por ser un gran padre académico, porque gracias a usted pude cumplir este gran sueño.

Agradecimientos institucionales

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, sobre todo a los profesores con vocación que incentivan a cada generación de MVZ a abordar otras áreas de aplicación a las que comúnmente un veterinario se dedica A el centro de cómputo, biblioteca, laboratorios de prácticas, rancho Almaraz y de la gestión administrativa. A todos los profesores que me inculcaron el razonamiento crítico, analítico y antirreduccionista.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Institución donde se realizó esta tesis. En especial, al Laboratorio de Enfermedades Hepáticas a cargo del Dr. Julio Isael Pérez Carreón.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Institución que a través del Dr. Emérito Saúl Villa Treviño, me permitió el uso de animales de experimentación para desarrollar satisfactoriamente este proyecto.

Esta tesis fue realizada con los financiamientos No: 0114-14, (CINVESTAV-IPN) y 06-2017-I, (INMEGEN). Aprobados al Dr. Jaime Arellanes Robledo.

Agradecimientos

Al Dr. Jaime Arellanes Robledo por brindarme la oportunidad y confianza de trabajar en sus proyectos, por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio. Sobre todo, por su humildad y paciencia.

Al Dr. Julio Isael Pérez, por permitirme realizar mi proyecto de tesis en el Laboratorio de Enfermedades Hepáticas a su cargo.

Al Dr. Emérito Saúl Villa Treviño por darme la confianza de trabajar en su laboratorio en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

A la QFB. Norma Areli López Hernández, técnico del laboratorio de Enfermedades hepáticas, por su asistencia técnica durante el desarrollo de esta tesis.

A los QFB. Sergio Hernández García y Eunice Romo; y a los Técnicos Leobardo Molina García y Alejandro Cruz Hernández, por su gran apoyo y asistencia técnica para la obtención del tejido de los animales de experimentación, realizada en el laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Jorge Fernández, a los MVZ. Rafael Leyva Muñoz, Ricardo Gaxiola Centeno, Benjamín E. Chávez Álvarez, María A. López López y Alberto Rojo García, y a la Srta. María T. Hernández Moreno, por el excelente trato y por su invaluable apoyo en el cuidado de los animales de laboratorio (Bioterio del CINVESTAV-IPN) utilizados en este proyecto de tesis.

Al personal de la Unidad de Histología del INMEGEN conformado por N. Belem Gabiño López y Ricardo Nava Monroy, por su apoyo y asistencia técnica durante el desarrollo de mis experimentos.

A mis compañeros del Laboratorio de Enfermedades Hepáticas del INMEGEN Sergio, Areli, Brisa, Dafne, David, Dulce, Javier, Julia, Osiris, Paullete, Michael, Ema, Guadalupe por sus críticas constructivas realizadas a mi proyecto durante nuestros seminarios.

Abreviaturas

CHC: Carcinoma hepatocelular
HCC: hepatocellular carcinoma
DEN: Dietilnitrosamina
DEN 2.5: Dietilnitrosamina 2.5 mg/kg
DEN 5: Dietilnitrosamina 5 mg/kg
DEN 20: Dietilnitrosamina 20 mg/kg
6s : seis semanas
10s: diez semanas
14s : catorce semanas
18s : dieciocho semanas
EROS: Especies reactivas de Oxígeno
Trx: Tiorredoxinas
VHB: Virus de hepatitis B
VHC : Virus de hepatitis C
IHQ: Inmunihiistoquímica
H&E: Hematoxilina Eosina
IP: Inmunoprecipitación
FPLC: Cromatografía de intercambio iónico
WB: Western blot
LPS: Lipopolisacaridos
RNA: Ácido ribonucleico
DNA: Ácido desoxirribonucleico
V: voltios

GENES

Nxn: Nucleorredoxina
Pp2A: Proteína fosfatasa 2A
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenosa
Lamin B1: Marcador de proteína nuclear
Myd88: Gen de respuesta meloide 88
Flii: flightless-I
NF- κ B: factor transcripcional keppa β
DVL: Dishevelled
Via Wnt: via wintgless
 β -catenina: catenina beta

Lista de figuras

- Figura 1.** Causas de enfermedad hepática global en 2010.
- Figura 2.** Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en la rata
- Figura 3.** Efecto de la DEN en ratones de la cepa C57BL6J
- Figura 4.** Efecto de la DEN sobre la producción de EROS
- Figura 5.** Efecto de la DEN sobre los niveles de 4-HNE en el ratón
- Figura 6.** Efecto de la DEN sobre el complejo Myd88/Nxn/Flii en el hígado de ratón (IP Flii)
- Figura 7.** Efecto de la DEN sobre el complejo Myd88/Nxn/Flii en el hígado de ratón (IP Nxn)
- Figura 8.** Cinética de administración de la DEN a ratones machos C57BL6/J
- Figura 9.** Curva estándar para la cuantificación de proteínas
- Figura 10.** Alteración de la arquitectura hepática de ratones tratados con la DEN
- Figura 11.** Deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático del ratón
- Figura 12.** Expresión de Nxn en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN
- Figura 13.** Nivel proteico de Nxn en ratones administrados con DEN
- Figura 14.** Eficiencia de la extracción de proteínas nucleares
- Figura 15.** Efecto de la DEN en fracción citoplasmática de Nxn
- Figura 16.** Efecto de la DEN en fracción nuclear de la Nxn
- Figura 17.** Localización de Pp2A en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN
- Figura 18.** Niveles proteicos de Pp2A en ratones administrados con DEN
- Figura 19.** Efecto de la DEN en fracción citoplasmática de Pp2A
- Figura 20.** Efecto de la DEN en fracción nuclear de Pp2A
- Figura 21.** Efecto de la DEN sobre el complejo proteico nucleorredoxina – proteína fosfatasa 2A (IP-Nxn)
- Figura 22.** Efecto de la DEN sobre el complejo proteico nucleorredoxina - proteína fosfatasa 2 A (IP-Pp2A)

ÍNDICE

Resumen	10
Abstract	11
1. Introducción	12
2. Marco teórico	12
2.1 Cáncer.....	12
2.2 Carcinoma hepatocelular.....	13
2.3 Modelos animales.....	15
2.4 Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la Dietilnitrosamina en el ratón.....	18
2.5 El papel del estrés oxidativo en el hepatocarcinoma celular.....	23
2.6 La nucleorredoxina en la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón.....	25
2.7 Proteína Fosfatasa 2 A y su interacción con Nucleorredoxina.....	30
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2. Objetivos Particulares.....	32
4. Hipótesis	32
5. Metodología	33
3.1. Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN.....	33
3.1.1 Cinética de administración de la DEN.....	34
3.1.2. Eutanasia.....	35
3.1.3 Obtención y conservación del tejido hepático.....	36
3.1.4. Análisis de la arquitectura hepática mediante las tinciones de tricrómica de Masson y H&E.....	37
3.1.5. Extracción de proteínas.....	38
3.1.6 Cuantificación de proteínas.....	39
3.1.7. Determinación de la expresión proteica por Western blot.....	39
3.1.8. Electroforesis.....	40

3.1.9. Transferencia de proteínas	41
3.1.10. Inmunodetección específica de las proteínas de interés	42
3.1.11 Análisis de complejos proteicos por inmunoprecipitación (IP).....	43
3.1.12. Extracción de proteína nuclear	44
3.1.13 Análisis por inmunohistoquímica.....	45
3.1.14. Análisis estadístico	46
6. Resultados y análisis de resultados	47
4.1 Alteración del parénquima hepático por efecto de la Dietilnitrosamina	47
4.2. Efecto de la DEN en la fibrogénesis	49
4.3. Incremento del nivel de expresión de la Nxn por efecto de la DEN.....	51
4.3.1 Eficiencia de la extracción de proteína nuclear.	52
4.4. Incremento del nivel de expresión de Pp2A bajo el efecto de la DEN	58
4.5 El estrés oxidativo inducido por la Dietilnitrosamina estimula la unión del complejo nucleorredoxina/proteína fosfatasa 2A.	63
7. Discusión.....	66
8. Conclusión	75
9. Perspectivas.....	77
10. Bibliografía	78
11 . Anexos.....	81
12. Equipos utilizados.....	90
13 Lista de Reactivos ocupados en este proyecto de investigación.....	91

Resumen

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el segundo cáncer más letal a nivel mundial. Un común denominador de los factores de riesgo que promueven el desarrollo de esta enfermedad es la producción exacerbada de especies reactivas de oxígeno (EROS) en el microambiente celular hepático. Así, el estrés oxidativo generado produce alteraciones progresivas que eventualmente culminan en CHC. Investigaciones recientes han demostrado que la enzima antioxidante nucleorredoxina (Nxn), regula diferentes vías de señalización en respuesta a las EROS, a través de interacciones redox sensibles; sin embargo, aún se desconoce la respuesta del complejo proteico redox sensible Nxn/Proteína fosfatasa 2A (Pp2A) durante la hepatocarcinogénesis experimental inducida por la dietilnitrosamina (DEN) en el ratón. Por lo tanto, la hipótesis propuesta para esta investigación es que durante la progresión del CHC experimental, el complejo Nxn/Pp2a es alterado y contribuye en el desarrollo de la enfermedad. El objetivo fue determinar la respuesta del complejo Nxn/Pp2A durante la hepatocarcinogénesis experimental in vivo. Mediante una cinética de administración con ratones machos de la cepa C57BL/6J fueron administrados con 0, 2.5, 5 y 20 mg de DEN/kg de peso corporal, dos veces por semana, durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. Posteriormente, mediante análisis histopatológicos y de biología molecular determinamos el efecto de la DEN sobre la interacción del complejo proteico Nxn/Pp2A.

La dosis de DEN de 20 mg/kg de peso corporal indujo una alteración de la arquitectura hepática, la producción de fibras de colágena y el CHC principalmente, a las 18 semanas después de la primera administración de la DEN. Este fenómeno estuvo acompañado del incremento de la expresión, tanto de la Nxn como de la Pp2A de una manera dosis dependiente. Mientras que la Nxn fue translocada al núcleo celular, Pp2A se mantuvo en el citoplasma celular. De manera interesante, el complejo Nxn/Pp2A incrementó su proporción de interacción a las 18 semanas de exposición al carcinógeno. Concluimos con estos resultados que la hepatocarcinogénesis promovida crónicamente por 18 semanas con una dosis de DEN de 20 mg/kg de peso corporal en el ratón, incrementa los niveles proteicos y la proporción de interacción de la Nxn y de Pp2A, y sugieren que estas alteraciones están asociadas al desarrollo del CHC.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second most lethal cancer worldwide. A common denominator of the risk factors that promote the development of this disease is the exacerbated production of reactive oxygen species (EROS) in the hepatic cellular microenvironment. Thus, the oxidative stress generated produces progressive alterations that eventually culminate in HCC. Recent research has shown that the antioxidant enzyme nucleoredoxin (Nxn), regulates different signaling pathways in response to EROS, through sensitive redox interactions; however, the response of the sensitive redox protein complex Nxn / Protein phosphatase 2A (Pp2A) during experimental hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine (DEN) in the mouse is still unknown. Therefore, the hypothesis proposed for this research is that during the progression of experimental CHC, the Nxn / Pp2a complex is altered and contributes to the development of the disease. The objective is to determine the response of the Nxn / Pp2A complex during experimental hepatocarcinogenesis *in vivo*. Using a kinetic administration with male mice of strain C57BL / 6J were administered with 0, 2.5, 5 and 20 mg of DEN / kg of body weight, twice a week, for six, ten, fourteen and eighteen weeks. Subsequently, by histopathological and molecular biology analysis, we determined the effect of DEN on the interaction of the Nxn / Pp2A protein complex. The DEN dose of 20 mg / kg of body weight induced an alteration of the hepatic architecture, the production of collagen fibers and HCC mainly, at 18 weeks after the first administration of the DEN. This phenomenon was accompanied by an increase in the expression of both Nxn and Pp2A in a dose-dependent manner. While Nxn was translocated to the cell nucleus, Pp2A remained in the cell cytoplasm. Interestingly, the Nxn / Pp2A complex increased its interaction rate at 18 weeks of exposure to the carcinogen. We conclude with these results that the hepatocarcinogenesis chronically promoted for 18 weeks with a dose of DEN of 20 mg / kg of body weight in the mouse, increases the protein levels and the interaction ratio of Nxn and Pp2A, and suggest that these alterations they are associated with the development of the CHC.

1. Introducción

El carcinoma hepatocelular es uno de los tipos de cáncer más letales y ocupa el segundo lugar a nivel mundial. Éste suele ser originado por la exposición constante a estímulos oxidantes que inducen una acumulación exacerbada de EROS dentro de las células. Así, cuando las EROS exceden la capacidad de defensa antioxidante pueden afectar el microambiente celular y promover la mutagénesis y aberraciones cromosomales¹. Debido a que la Nxn responde a las fluctuaciones del estrés oxidativo y a que interactúa con la Pp2A, una proteína que juega un papel central como supresor tumoral, resulta interesante entender el comportamiento de este complejo en el desarrollo del CHC. Con base en estas evidencias es relevante determinar si el complejo formado entre la Nxn y Pp2A son alterados durante la hepatocarcinogénesis experimental in vivo.

2. Marco teórico

2.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad promovida por alteraciones genéticas, el cual se presenta como un crecimiento anormal de tejido o tumor maligno. Éste se caracteriza principalmente por mantener una alta proliferación celular, una pérdida de diferenciación de las células afectadas (anaplasia), por invasión del tejido adyacente y otros órganos o tejidos (metástasis); generando así, nuevos focos tumorales que eventualmente pueden ocasionar la muerte. También, se han descrito otros tipos de tumores conocidos como benignos, que por lo general se caracterizan por una alta proliferación, pero a diferencia de los malignos, no son anaplásicos, no invaden tejidos adyacentes, ni son metastásicos².

El cáncer es un problema de salud mundial y en el 2015 se reportó como la segunda causa de muerte; ocasionó 8,8 millones de defunciones y para el 2018 se registraron un total de 18.1 millones de casos. Así, alrededor de una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. Además, la incidencia del cáncer está en constante incremento debido al envejecimiento de la población³. La Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2040 se presenten 29.5 millones de casos por esta enfermedad. Paralelamente, se considera que la población mundial envejecerá de un 10 a 20% para el 2050, lo que sugiere una tendencia de incremento de la enfermedad². Otro factor que puede contribuir en este incremento es el estilo de vida; es decir, los hábitos de algunas poblaciones favorecen el desarrollo del cáncer, por mencionar algunos, el tabaquismo, el sedentarismo y las dietas no equilibradas.

2.2 Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el cuarto tipo de tumor más mortal y uno de los más frecuentes en todo el mundo. Además, es el quinto cáncer más común en hombres y el noveno en mujeres, con aproximadamente 500,000 y 200,000 nuevos casos por año⁴. Algunos de los principales factores de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad son la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC), el consumo crónico de alcohol, la obesidad, el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas y síndromes metabólicos como la enfermedad hepática no alcohólica (**véase figura 1**).

Los factores de riesgo del CHC inicialmente ocasionan alteraciones crónicas que conducen al desarrollo de la cirrosis; una importante etapa precancerosa que puede promover el desarrollo del cáncer. El CHC se desarrolla en el 90% de los casos en pacientes cirróticos y su incidencia aumenta con la gravedad de la cirrosis. Sin

embargo, en el 10% de los casos restantes el CHC se ha observado en pacientes no cirróticos relacionado principalmente con el síndrome metabólico, infección por VHB o con alguna etiología conocida. En general, los factores de riesgo en conjunto pueden también influir de manera sinérgica y jugar un papel importante en el desarrollo del CHC.⁵

Además, el CHC se caracteriza por ser una enfermedad altamente heterogénea por distintos factores, como los virus con genoma de RNA o DNA, agentes químicos (como alcohol y aflatoxinas), enfermedades metabólicas innatas y adquiridas los cuales incrementan la heterogeneidad de la enfermedad. Otro factor relevante es que el CHC puede originarse tanto a partir de hepatocitos maduros como de células progenitoras y así, dependiendo de su origen, el fenotipo de la enfermedad puede ser diferente. Además, como en otros tipos de cáncer, durante el desarrollo del CHC se puede llevar a cabo un proceso genético dinámico que puede influir y cambiar la morfología y las características moleculares en la medida que avanza la enfermedad, lo que puede resultar en un genotipo único en una población celular determinada.

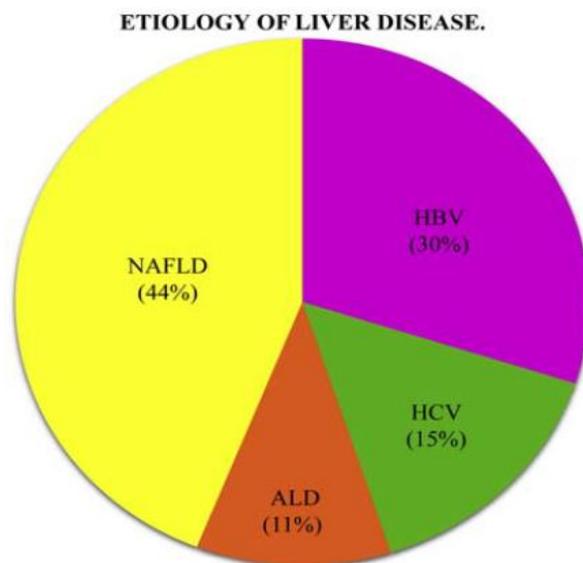


Figura 1. Causas de la enfermedad hepática global en 2010. NAFLD, enfermedad del hígado graso no alcohólico, ALD, enfermedad hepática alcohólica; VHB, virus de hepatitis B VHC, virus de hepatitis C; por sus siglas en inglés. Imagen obtenida de Lozano, et al. 2012.

2.3 Modelos animales

Para comprender los mecanismos bioquímicos y moleculares que ocurren en el desarrollo del CHC en el ser humano, los modelos experimentales en roedores han jugado un papel relevante. Éstos son considerados una herramienta crucial debido a las similitudes genéticas y fisiológicas con los seres humanos. Además, debido a que su ciclo de vida y su capacidad reproductiva son cortos, y la factibilidad de realizar una variedad de métodos de manipulación tanto genética como de respuesta a la exposición a diferentes sustancias; el ratón es a menudo uno de los modelos experimentales más utilizados⁶. Por lo tanto, son considerados herramientas esenciales para entender el desarrollo del cáncer en el ser humano.

Para la generación de modelos experimentales de CHC en roedores, éstos se exponen a sustancias cancerígenas y/o hepatotóxicas como aminas aromáticas, colorantes azoicos, nitrosaminas y aflatoxinas⁷. Su finalidad es reproducir progresivamente el ciclo de lesión-fibrosis-malignidad como ocurre en el ser humano. Unos de los compuestos más utilizados para inducir el CHC son; dietilnitrosamina (DEN), dimetilnitrosamina, etilnitrosurea, el 2-acetilaminofluoreno, el tetracloruro de carbono, el 1,2-dicloroetano, entre otros; sin embargo, también se han utilizado sustancias naturales como las aflatoxinas⁸. Además, se ha demostrado que la DEN puede inducir la formación de lesiones preneoplásicas, que eventualmente pueden culminar en CHC, en tiempos muy cortos (pocas semanas). Ésta es una de las razones por la cual la DEN ha sido uno de los agentes hepatocarcinogénicos más empleados experimentalmente. De igual manera, se ha reportado que los seres humanos pueden estar expuestos de manera constante a la DEN. Al respecto, se sabe que esta sustancia se encuentra en el aire de

algunas ciudades en cantidades de 200 mg/m³; también, se han encontrado hasta 8.3 ng de DEN por cigarro de tabaco comercial; en algunos tipos de quesos, se ha encontrado hasta 1 µg/kg; en diferentes tipos de pescados ahumados se ha observado que pueden encontrarse hasta 4 µg/kg de DEN; hasta 1 µg/kg en el tocino frito; y hasta 0.1 µg/kg en varias bebidas alcohólicas (brandy, coñac, ron, whisky y sidra)⁹

En la actualidad existen diversos modelos animales para inducir el CHC mediante el uso de la DEN. Uno de los más eficientes desarrollado en la rata es el propuesto por Schiffer y colaboradores. Este modelo consiste en administrar 50 mg/kg de DEN en ratas Wistar macho una vez por semana, vía intraperitoneal¹⁰. Este modelo reproduce eventos moleculares asociados con el proceso de cirrosis durante las 12 y 14 semanas de tratamiento y a la semana 16 se observan lesiones características del CHC (véase figura 2). De esta manera, con este modelo se pueden analizar los cambios que ocurren desde las etapas tempranas hasta la aparición del CHC.

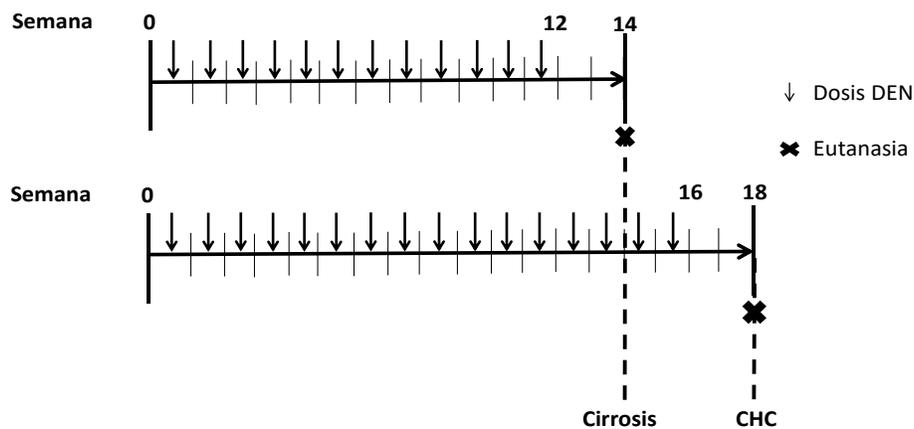


Figura 2. Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en la rata. Se muestra el esquema de administración en el modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en la rata. Bajo este esquema de administración se reporta que en la semana catorce (doce semanas de exposición a la DEN más dos de descanso) se desarrolla la cirrosis hepática y a las dieciocho semanas (dieciséis semanas de exposición al carcinógeno más dos de descanso) se observa el CHC en el 100% de los animales. La DEN es administrada a 50 mg/kg/semana. Figura modificada de Schiffer, *et al*; 2005.

2.4 Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón

En nuestro equipo de trabajo hemos desarrollado un modelo experimental de dosis-respuesta con la DEN en el ratón por 6 semanas. Esto con la finalidad de tener un primer acercamiento de la respuesta a diferentes dosis de este carcinógeno y así, seleccionar las dosis más adecuadas para utilizarlas por periodos prolongados como previamente ha sido reportado en un modelo de CHC en la rata. Así, ratones machos de la cepa C57BL/6 de siete semanas de edad fueron administrados dos veces por semana vía intraperitoneal por seis semanas; las dosis administradas de la DEN fueron las siguientes: 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/kg. Al analizar el efecto de la DEN sobre el peso corporal; la dosis de 40 mg/kg fue demasiado tóxica ya que provocó el deceso del 66 % de los ratones; sin embargo; con la dosis de 2.5, 5 y 20 mg/kg el peso corporal de los ratones no cambió (véase figura 3); adicionalmente, los análisis histopatológicos revelaron una alteración de la arquitectura hepática, dosis dependiente¹¹.

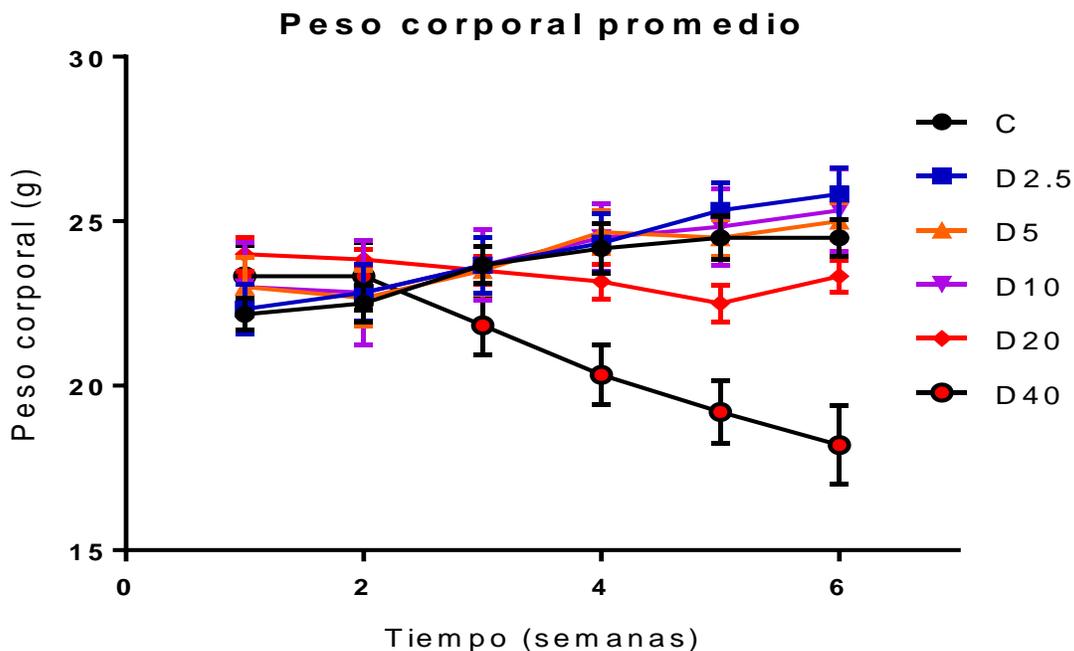


Figura 3. Efecto de la DEN en ratones de la cepa C57BL/6. En la gráfica se muestra la variación del peso corporal a través de seis semanas de administración de la DEN, cada línea representa una dosis diferente. C: animales no administrados, D2.5: animales administrados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con la DEN 5 mg/kg, D10: animales administrados con la DEN 10 mg/kg, D20: animales administrados con la DEN 20 mg/kg, D40: animales administrados con la DEN 40 mg/kg. Imagen modificada de Alarcón-Sánchez, 2017.

Estos resultados nos permitieron extender el periodo de exposición a la DEN con un análisis posterior donde se incluyeron las dosis de 2.5, 5 y 20 mg/kg de DEN, las cuales fueron administradas dos veces por semana durante 6, 10, 14 y 18 semanas. Mientras que la dosis de 20 mg/kg fue seleccionada como la más alta tolerada que no cambió el peso corporal de los ratones, las de 2,5 y 5 mg/kg se seleccionaron por ser las dosis candidatas más bajas, útiles para en un futuro evaluar su efecto sinérgico junto con otros agentes hepatotóxicos. Las dosis seleccionadas incrementaron claramente las EROS, las cuales fueron determinadas mediante un ensayo de espectrofluorimetría (*Oxiselect TM In Vitro ROS/RNS*). El incremento en los niveles de EROS los observamos en todas las dosis y tiempos evaluados ($p < 0.005$ para todos los casos), como se observa en la **figura 4**. Cabe resaltar que la administración durante seis semanas con la dosis de 2.5 mg/kg provocó el mayor incremento de EROS, así como la dosis de 20 mg/kg administrada por dieciocho semanas.

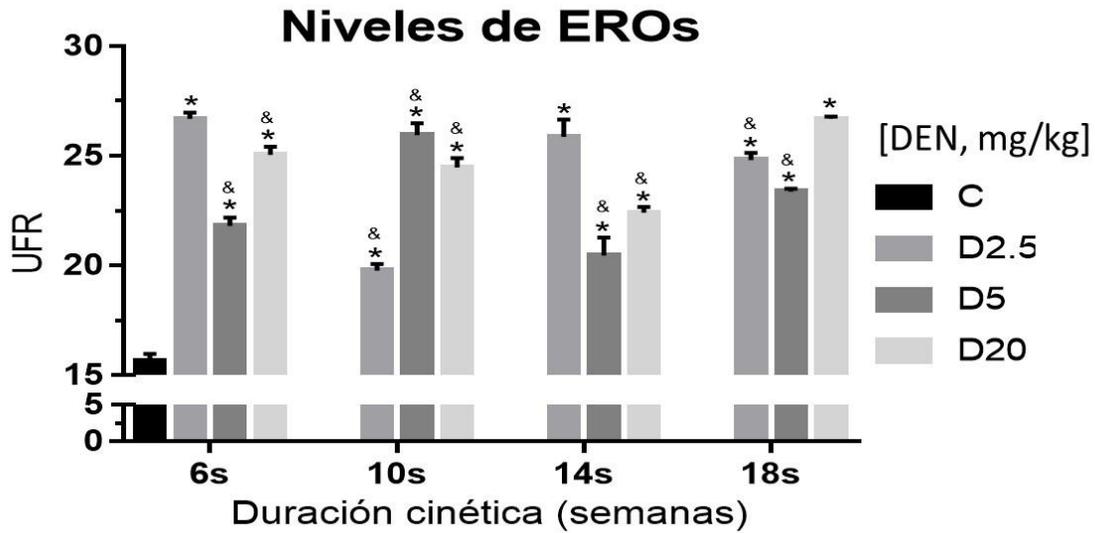


Figura 4. Efecto de la DEN sobre la producción de EROS. Mediante un ensayo de espectrofluorimetría determinaron los niveles de EROS en el hígado de los animales administrados con la DEN. Las unidades de fluorescencia relativas (UFR) son directamente proporcionales a la cantidad de EROS. Las barras en la gráfica representan el promedio de las UFRs llevadas a 1; con la finalidad de analizar las veces de cambio, \pm el error estándar. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). &: Diferencia estadísticamente significativa respecto a D20 de 18s ($p < 0.05$). Se realizó un pool por grupo. $n=3$ mediciones por pool. Imagen tomada de Fuentes Hernández, 2018.

Además, en este modelo se evaluaron el aducto 4-hidroxinonenal con el kit *Oxiselect HNE Adduct Competitive ELISA*, el cual es un potente agente alquilante producto de la lipoperoxidación que juega un papel central en la señalización inducida por el estrés oxidativo y toxicidad oxidante. Observaron que la dosis de 20 mg/kg incrementó los niveles de 4-HNE a las diez y dieciocho semanas de administración ($p < 0.05$). También, observaron una tendencia de incremento de los niveles de 4-HNE en el resto de los tratamientos, excepto por la dosis de 2.5 mg/kg a las 14 semanas de exposición al carcinógeno (**véase figura 5**)¹².

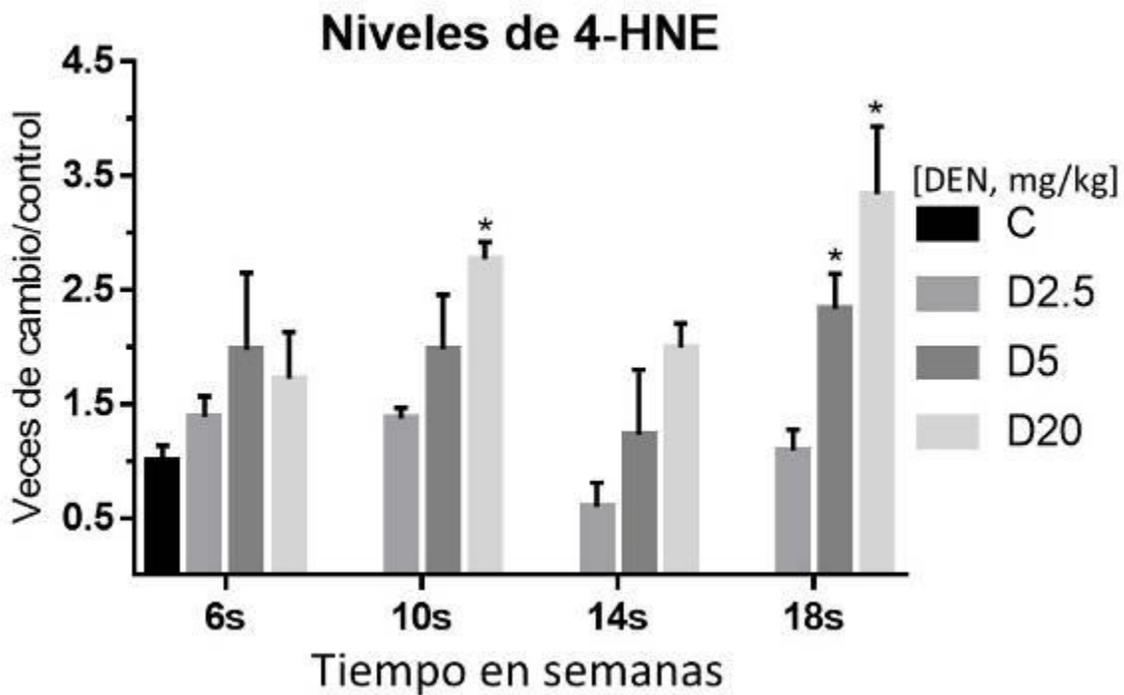


Figura 5. Efecto de la DEN sobre los niveles de 4-HNE en el ratón. Se realizó un análisis de ELISA para medir los niveles de 4-HNE. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de la absorbancia de la ELISA igualada a 1 respecto al grupo control; con la finalidad de analizar las veces de cambio de los niveles de 4-HNE entre los diferentes tratamientos. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta del tratamiento con la DEN. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). Se realizó un pool por grupo. $n=3$ mediciones por pozo. Imagen tomada de Fuentes Hernández, 2018.

Con estos antecedentes se demostró que la DEN contribuye en la progresión de la hepatocarcinogénesis por medio de la inducción del estrés oxidativo, debido a que indujo una producción exacerbada de las EROS, un fenómeno asociado muy probablemente a su metabolismo a través del sistema enzimático dependiente de citocromo P450. Esto debido a que se ha reportado que el Cyp2e1, una de las enzimas de esta familia, entre otras, metabolizan la DEN y este proceso genera estrés oxidativo el cual se presenta en forma de peróxido de hidrógeno y de anión superóxido. Las EROS a su vez, pueden causar daño al ADN, proteínas y lípidos; además, el estrés oxidativo también tiene un rol importante en el proceso de carcinogénico tal es el caso de CHC⁸.

2.5 El papel del estrés oxidativo en el hepatocarcinoma celular

El estrés oxidativo es una perturbación en el equilibrio oxidante-antioxidante que conduce a un daño celular potencial. La mayoría de las células pueden tolerar cierto grado de estrés oxidativo, ya que tienen suficiente capacidad de defensa antioxidante y sistemas de reparación las cuales reconocen y eliminan las moléculas dañadas por la oxidación. El desequilibrio puede deberse a una falta de la capacidad antioxidante causada por alteraciones en la producción o por un exceso de EROS. Las EROS son consideradas moléculas con un alto potencial carcinogénico debido a su papel en la mutagénesis, la promoción de tumores y la progresión¹. También se les relaciona con procesos de inflamación crónica producida por la exposición a diferentes factores que estimulan la activación de los neutrófilos y las células macrofagocíticas estrelladas durante la inflamación; de esta manera, se producen EROS que se vierten en el parénquima hepático e inducen un daño en la membrana de los hepatocitos. Por ejemplo, el superóxido normalmente está bloqueado por la membrana celular (plasmalema); sin embargo, la superóxido dismutasa de las membranas puede convertir los aniones superóxido en H₂O₂ después de la

internalización en hepatocitos y por lo tanto, inducir daño a las células¹³. El estrés oxidativo y el aumento del nivel de EROS intracelular también pueden inducir la acumulación de varias alteraciones genéticas y epigenéticas y desempeñar un papel central en la regulación de una variedad de genes proinflamatorios, onco-supresores y onco-promotores relacionados con el desarrollo del CHC¹⁴. Las células pueden tolerar un período corto o bajos niveles de estrés oxidativo, pero en un estado crónico caracterizado por un constante aumento del nivel de estrés, esto no sucede¹⁵. Así, la capacidad y los sistemas de reparación celular son insuficientes y conducen a una acumulación progresiva de EROS y otros radicales. Este exceso de EROS puede dañar los lípidos, proteínas o ADN y en consecuencia, alterar diferentes vías celulares y modificar la expresión génica, adhesión celular, metabolismo celular, ciclo celular y muerte celular¹⁶. De manera específica, en las células hepáticas las EROS se han relacionado con la activación de las vías de señalización celular por ejemplo, la vía de β -catenina/Wnt y la de la angiogénesis¹. Debido a las funciones de estas vías en la mutagénesis, la promoción de tumores y la progresión, las EROS se consideran elementos centrales en el proceso hepatocarcinogénico¹⁷. Sin embargo, también existen moléculas que regulan las fluctuaciones redox del microambiente celular, denominado sistema de defensa antioxidante.

2.6 La nucleorredoxina en la hepatocarcinogénesis experimental en el ratón

La nucleorredoxina (Nxn), una enzima de la gran familia de las tiorredoxinas, ha adquirido cada vez un papel más relevante debido a que participa tanto en el mantenimiento de la homeostasis redox celular como en la regulación de diversas vías de señalización celular^{18 19}. Ésta fue descubierta por primera vez por Kurooka y colaboradores en una línea celular de ratón^{20 21}.

Inicialmente se demostró que la Nxn se encontraba localizada en el núcleo celular, razón por la cual tomó este nombre. Más tarde se determinó que se localiza principalmente en el citoplasma y que es translocada al núcleo en respuesta al estrés oxidativo, esto se debe a que responde a los cambios redox que ocurren en las células.

Se ha demostrado que la Nxn participa en la regulación de una gran variedad de fenómenos biológicos, por ejemplo, las vías de señalización relacionadas con la morfogénesis primaria como la vía Wnt y el mantenimiento de las células madre, donde regula las reacciones redox ²² mediante la degradación de EROS principalmente reduciendo la enzima peroxiredoxina que extingue el H₂O₂²³.

Como primer acercamiento al papel de esta proteína en el CHC inducido por la DEN, su comportamiento ha sido analizado después de 6 semanas de administración vía intraperitoneal con dosis de 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg. Mediante ensayos de Western Blot, se observó que la Nxn mantuvo una tendencia al incremento con la dosis de 20 mg/kg. A través de análisis inmunohistoquímicos se observó que la localización estructural de esta proteína fue positiva especialmente dentro del núcleo celular de los tejidos hepáticos de los animales sometidos a 20 mg/kg de DEN ¹¹. Asimismo, este fenómeno estuvo asociado con la aparición de

fibras de colágena en el parénquima celular, evidenciando así el inicio de un proceso de cirrosis hepática. ¹¹.

Adicionalmente, Nxn se ha visto involucrada en la regulación de diferentes vías de señalización a través de su interacción con otras proteínas, por ejemplo; con la proteína Sec63, la cual se localiza en la membrana del retículo endoplásmico y cuya actividad está relacionada con el transporte de proteínas al interior del retículo. Un dato interesante es que la mutación del gen de codificación de proteínas (Sec 63) y Sustrato de proteína quinasa C (PRKCSH) se han observado en patologías como la enfermedad poliquística del hígado²⁴. Además, Nxn interactúa con la enzima fosfofructoquinasa – 1 (PFK-1) enzima glucolítica y cuya alteración se ha visto implicada en la reprogramación metabólica del cáncer²². Nxn, también forma complejos proteicos con MyD88 y Fli-1. Una investigación reciente demostró que los niveles de la Nxn se incrementan durante la hepatocarcinogénesis inducida con DEN, esto sugirió que el complejo Myd88/Nxn/Flii fue también alterado como consecuencia del efecto de las EROS producidas por la DEN. Posteriormente, mediante ensayo de inmunoprecipitación (IP) se determinó la respuesta de este complejo a los efectos de diferentes dosis de DEN en el hígado del ratón.

Los análisis de IP de Nxn confirmaron los resultados obtenidos en la IP de Fli-1 y revelaron que la dosis de 20 mg/kg de la DEN alteró significativamente ($p \leq 0.05$) la formación de este complejo (**véase figura 6**). Se observó que en el grupo de 20 mg/kg de DEN la proporción de unión de Myd88 disminuyó significativamente comparado con el control. Asimismo, la proporción de Fli-1 no fue alterada, estos resultados indicaron que mientras la interacción de Myd88 fue separada del complejo, Fli-1 se mantuvo unida a Nxn. Esto reflejó que en comparación con Myd88, la interacción entre Fli-1 y Nxn es más resistente a los insultos oxidantes inducidos por la DEN (**véase figura 7**)²⁵.

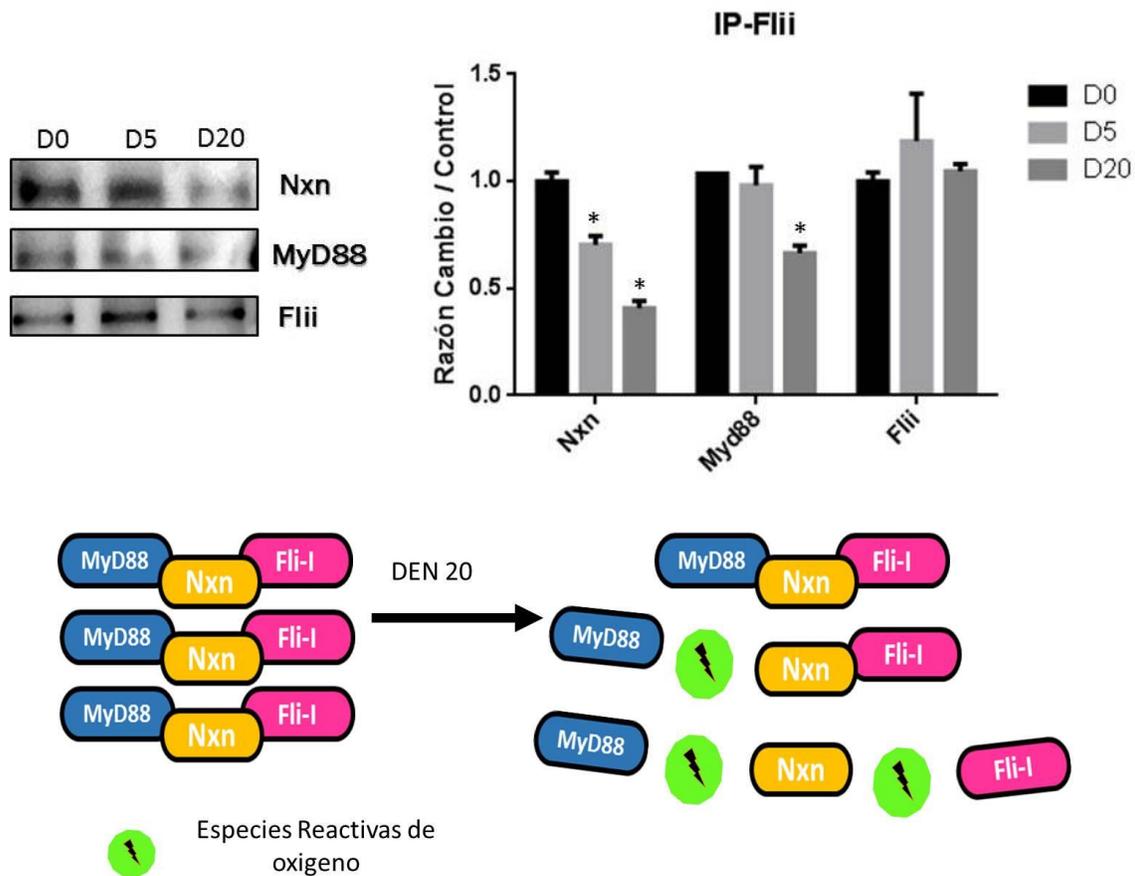


Figura 6. Efecto de la DEN sobre el complejo Myd88/Nxn/Flii en el hígado del ratón. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica realizada por análisis de WB correspondiente a los niveles de la proteína inmunoprecipitada Flii y de las co-precipitadas Myd88 y Nxn. El panel inferior muestra la representación gráfica del efecto de la DEN entre las interacciones moleculares del complejo. Los asteriscos (*) sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Las barras representan el promedio \pm el EE de los niveles de las proteínas reveladas después de la realización del ensayo de IP respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 3 pozos de proteínas de 2 animales cada uno, y los valores fueron obtenido con la prueba estadística t-test considerando una $p < 0.05$. D0: Control sin tratamiento, D5: DEN 5mg/kg y D20: DEN 20mg/kg. Imagen tomada de Martínez Aguilar, 2017.

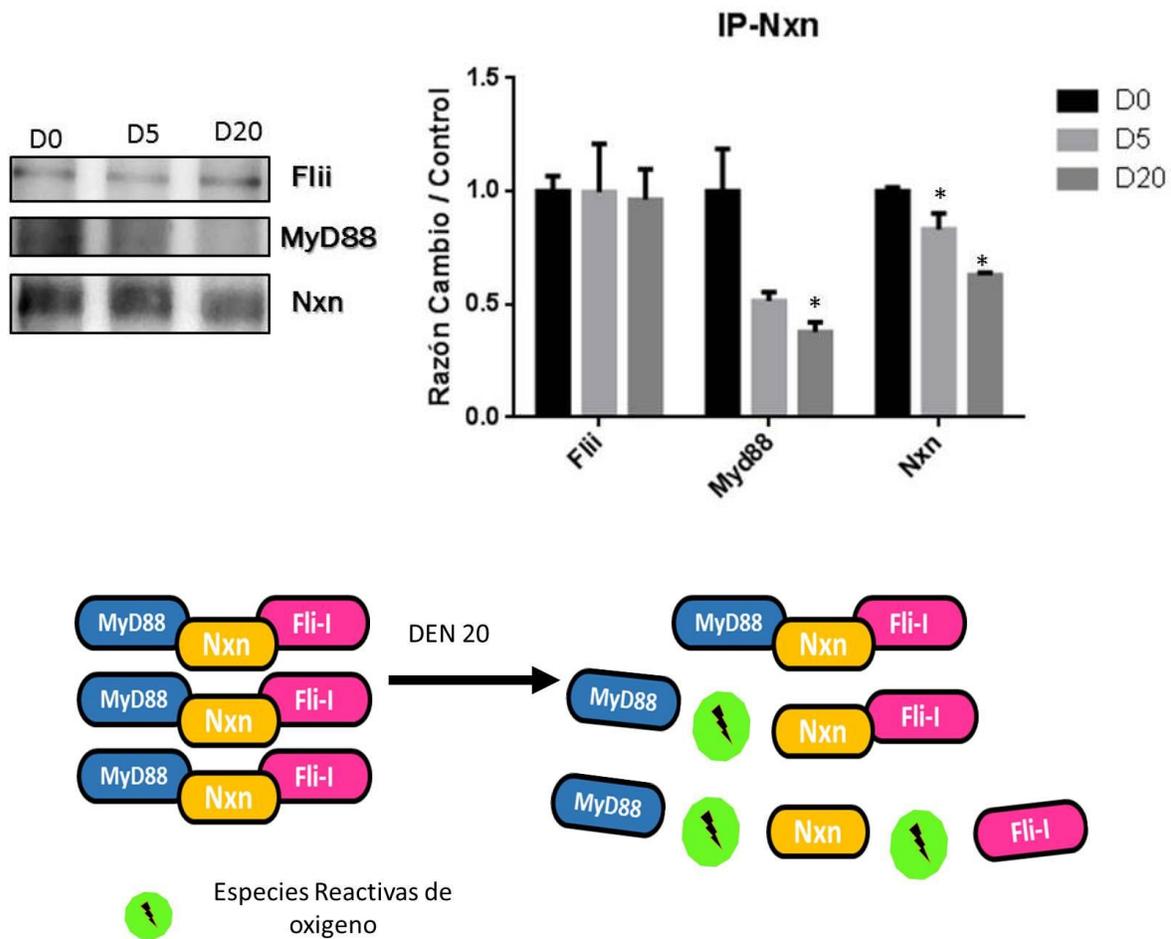


Figura 7. Efecto de la DEN sobre el complejo Myd88/Nxn/Fli-I en el hígado del ratón. La gráfica muestra la cuantificación densitométrica realizada por análisis de WB correspondiente a los niveles de la proteína inmunoprecipitada Nxn y de las co-precipitadas Myd88 y Fli-I. El panel inferior muestra la representación gráfica del efecto de la DEN entre las interacciones moleculares del complejo. Los asteriscos (*) sobre las barras indica significancia estadística comparado con el grupo C. Las barras representan el promedio \pm el EE de los niveles de las proteínas reveladas después de la realización del ensayo de IP respecto del grupo control el cual se igualó a un valor de 1 (uno) con la finalidad de mostrar las veces de cambio de los grupos tratados. Por cada grupo fueron incluidos 3 pozos de proteínas de 2 animales cada uno, y los valores fueron obtenidos con la prueba estadística t-test considerando una $p < 0.05$. D0: Control sin tratamiento, D5: DEN 5mg/kg y D20: DEN 20mg/kg. Imagen tomada de Martínez Aguilar, 2017.

2.7 Proteína Fosfatasa 2 A y su interacción con Nxn

La Proteína Fosfatasa 2 A (Pp2A) remueve los grupos fosfato de los aminoácidos serina y treonina, la metilación del residuo de leucina. Son dos modificaciones importantes que se ha demostrado que modulan las asociaciones de las subunidades de PP2A y la eficiencia catalítica²⁶. Además de estar implicada en los procesos de replicación del ADN, transcripción, traducción y tumorigenesis^{27 26}. Para realizar estas funciones diversas, holoenzimas triméricas Pp2A consisten en la subunidad catalítica (Pp2Ac) y la subunidad estructural (PR65/A) que contiene una de las subunidades reguladoras (PR55/B, PR61/B0, PR72/B00), fosforila sustratos específicos²⁸. Pp2A parece desempeñar un rol importante, en tumores malignos, en los que se incluyen cáncer de pulmón, mama, piel, colon, destacando su papel como "supresor de tumores",^{29 30} y además en el carcinoma hepatocelular³¹. Cabe señalar el sello distintivo principal de Pp2A es su ensamblaje proteico o formación de complejo estable, a través de la cual interactúa con moléculas de señalización intermedias vitales que están presentes en el citoplasma. También modula su función al interactuar y transformar el estado de fosforilación de la proteína con la que interactúa³².

Es importante señalar que el complejo proteico que realiza Nxn con la Proteína fosfatasa 2A (Pp2A), se documentó mediante la modificación de protocolos de purificación existentes y cromatografía de intercambio iónico FPLC, como purificación final. Esto condujo a la disociación de una aparente reparación de la holoenzima Pp2A homogénea de su forma trimétrica a la forma dimérica, así como la subunidad PR55/B libre y dos nuevas proteínas de 54 y 55 kDa, respectivamente. Donde el polipéptido de 54 kDa se identificó como factor de liberación eucariótico 1 (eRF1) y se demostró que interactuaba con Pp2A dimérico el cual se dirige a polisomas de las células COS-7. Ese grupo de investigación identificó a la proteína

de 55 kDa como un homólogo de la Nxn, una proteína que fue previamente descubierta como el producto genético del gen murino red-1²⁷.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la respuesta del complejo nucleorredoxina/proteína fosfatasa-2A durante la hepatocarcinogénesis experimental *in vivo*.

3.2. Objetivos Particulares:

1. Evaluar los niveles proteicos y localización estructural de la nucleorredoxina y de proteína fosfatasa 2A en el hígado de ratones sometidos a un modelo de hepatocarcinogénesis.
2. Determinar el estatus de interacción entre la nucleorredoxina y proteína fosfatasa-2A en el hígado del ratón sometido a diferentes dosis de dietilnitrosamina.

4. Hipótesis

La interacción entre la nucleorredoxina y la proteína fosfatasa 2A, es alterada durante la hepatocarcinogénesis inducida por la dietilnitrosamina en el ratón.

5. Metodología

Para determinar la respuesta del complejo proteico entre la Nucleorredoxina y la Proteína fosfatasa 2-A, utilizamos ratones macho *Mus musculus* de la cepa C57BL6 de siete semanas de edad. Los animales fueron aclimatados y alimentados ad libitum en ambiente controlado con fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad y mantenidos a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. La DEN fue administrada a distintas dosis (2.5, 5 y 20 mg/kg) durante 6, 10, 14 y 18 semanas. Los experimentos fueron realizados de acuerdo con los reglamentos propuestos por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, tomando en cuenta lo establecido en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

3.1. Modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN

El presente modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón fue resultado de modificación al protocolo planteado por Schiffer y colaboradores (2005). Éste reside en administrar semanalmente 50 mg de DEN por kg de peso corporal, vía intraperitoneal (i.p.), ratas de la cepa *Winstar* durante catorce y dieciséis semanas. Para el presente trabajo, la DEN fue administrada dos veces por semana, incluyendo las siguientes dosis: 2.5, 5 y 20 mg de DEN/kg de peso corporal, durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. **(Véase figura 8).**

3.1.1 Cinética de administración de la DEN

Realizamos la cinética de administración de la DEN con 80 ratones macho de siete semanas de edad con un peso corporal aproximado de 20 g. Éstos se dividieron en 4 grupos de 20 animales correspondientes a las distintas duraciones de la administración; a su vez, estos grupos se subdividieron en 4 grupos de 5 animales cada uno correspondientes a las tres diferentes dosis de DEN seleccionadas. Adicionalmente, se incluyó un grupo control el cual no recibió ningún tratamiento. Concluido el tratamiento, los ratones fueron sometidos al procedimiento de eutanasia una semana después y entonces el tejido hepático recuperado para su posterior análisis. **(Véase figura 8).**

Cinética de administración de la DEN a ratones C57BL/6

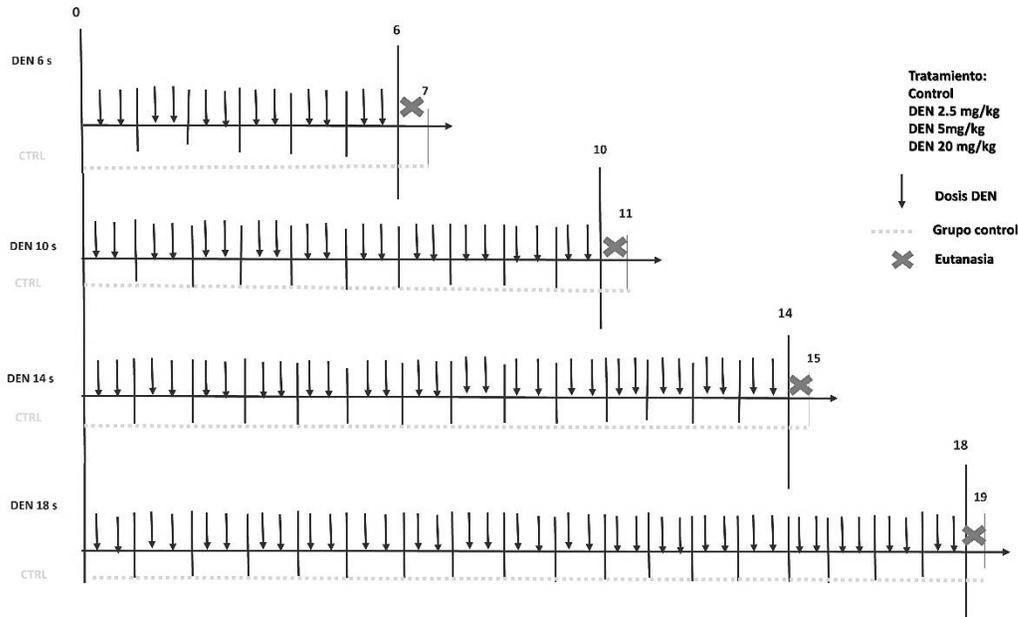


Figura 8. Cinética de administración de la DEN a ratones C57BL/6. Muestra esquemática de la DEN con diferentes dosis de 2.5, 5, y 20 mg/kg vía i.p., dos dosis por semana (días lunes y jueves), durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. Una semana posterior a la última administración de la DEN los animales fueron sometidos a la eutanasia. Los grupos controles sin tratamiento fueron sometidos al proceso de eutanasia al mismo tiempo que los grupos tratados.

3.1.2. Eutanasia

Los ratones fueron sacrificados bajo anestesia con isoflurano utilizando un sistema de anestesia inhalada, a una dosis de 2 a 3% para la inducción en cámara, y de 0.25-2% para su mantenimiento con mascarilla de inhalación. La eutanasia se realizó mediante exanguinación. La sangre fue recuperada en tubos eppendorf con heparina y el plasma se separó para su posterior análisis. La exanguinación se llevó a cabo con una aguja de insulina estéril de media pulgada de longitud, de acuerdo a un protocolo establecido en el laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN.

3.1.3 Obtención y conservación del tejido hepático

Después de disecar el tejido hepático, éste se conservó en formaldehído al 4% para realizar las tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), tricrómica de Masson y pruebas de inmunohistoquímica (IHQ). Seccionamos el resto del tejido hepático para su congelación en nitrógeno líquido el cual fue almacenado a -70 C para posteriores análisis de proteínas mediante western blot (WB).

3.1.4. Análisis de la arquitectura hepática mediante las tinciones de tricrómica de Masson y H&E

Para conocer las alteraciones estructurales inducidas por la administración de la DEN en el hígado del ratón se realizó la tinción de H&E. Para determinar la inducción del proceso de fibrogénesis se utilizó la tinción de tricrómica de *Masson*. Para ambas tinciones se utilizaron cortes histológicos de 2 μm de espesor, los cuales fueron desparafinados, rehidratados y teñidos. Ambas tinciones fueron realizadas en el laboratorio de Histología y Microscopía Confocal del INMEGEN. Posteriormente, fotos representativas del efecto de la DEN sobre el tejido hepático de los diferentes grupos fueron tomadas con una cámara *Canon EOS-1000D* acoplada a un microscopio *ZEISS Axio-A1*. El objetivo utilizado fue el 20x para obtener una magnificación final de 200x. Brevemente, para realizar la tinción de H&E, las laminillas fueron desparafinadas a 57 °C durante una hora y rehidratadas mediante el siguiente procedimiento: las laminillas fueron sumergidas y mantenidas en agitación por 3 min en cada punto de un tren de rehidratación, el cual estaba conformado por 2 veces xilol, xilol-etanol al 100%, 2 veces etanol al 100%, etanol al 70% y finalmente agua destilada. Una vez rehidratadas, las laminillas fueron teñidas con hematoxilina durante 7 min, lavadas con agua destilada, incubadas en etanol ácido, rápidamente lavadas y sumergidas en agua amoniacal al 1% hasta que se observó un color morado. Después de lavarlas con agua destilada, las laminillas fueron sumergidas en etanol al 70% por 10 segundos para posteriormente teñirlas con eosina por 10 segundos más. Finalmente, las laminillas fueron sumergidas en etanol al 100% y después de dejarlas secar a temperatura ambiente, éstas fueron montadas con resina EcoMount (BIOCARE MEDICAL, No. De Cat. EM897L) para su posterior análisis microscópico.

Brevemente, para la tinción de tricrómica de Masson se utilizó un kit comercial (Dako, No. De Cat. AR173). Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados de la misma manera que en la H&E; posteriormente, a las laminillas se les colocó solución de Bouin por una hora a 57°C después, las laminillas fueron lavadas con agua destilada y luego fueron teñidas con Hematoxilina de Weigert por 10 min; posteriormente, se lavaron con agua destilada y se les agregó Fucsina ácida escarlata de Biebrich, después de 15 min las laminillas fueron nuevamente lavadas. Posteriormente, se les colocó ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico y después de 10 min, se lavaron e inmediatamente se les colocó azul de anilina. Finalmente, las laminillas fueron deshidratadas y montadas para su posterior análisis.

3.1.5. Extracción de proteínas

Este procedimiento se realizó con la finalidad de romper las membranas celulares y liberar el contenido celular del tejido hepático mediante condiciones específicas en un homogeneizador (GLAS-COL, No. De Cat. 099C K54). Fueron utilizados cien miligramos de tejido los cuales se homogeneizaron en 1 ml de buffer de lisis no desnaturizante (**véase anexo 10**). El homogeneizado permaneció en agitación constante por 20 minutos a 4°C en una plataforma oscilante (Labnet, No. De Cat, S0500); posteriormente, las muestras fueron centrifugadas una primera vez a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga (ThermoFisher Scientific, No. De Cat, 75002401). Tomamos el sobrenadante para centrifugar por segunda vez durante 10 min bajo las mismas condiciones, y su contenido proteico fue cuantificado de acuerdo con el protocolo ácido bicinonínico (ABC).

3.1.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la proteína se llevó a cabo con el protocolo del ABC, (véase anexo 17). La concentración de cada muestra se determinó con base en la ecuación (véase figura 9). Obtenida en la curva estándar realizada con BSA

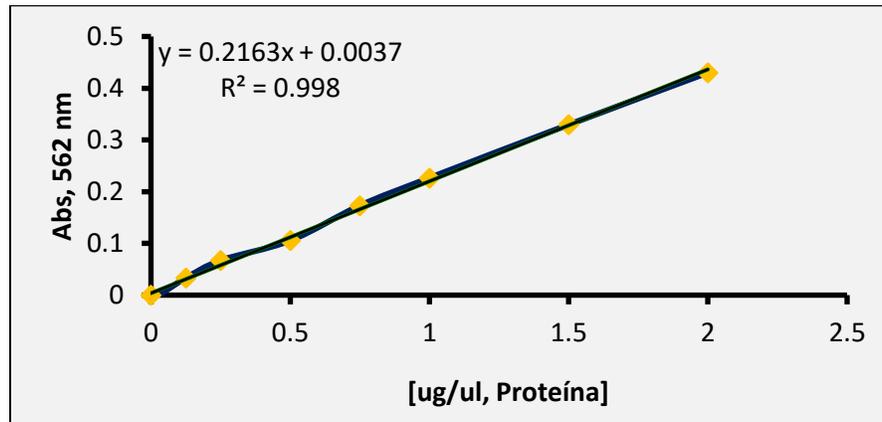


Figura 9. Curva estándar para la cuantificación de proteínas. La gráfica representa la regresión lineal de las absorbancias (Abs) de la curva estándar para determinar la concentración proteica del tejido hepático de los animales administrados con la DEN realizada con BSA.

3.1.7. Determinación de la expresión proteica por Western blot

Para analizar la respuesta del complejo proteico de la Nxn con la Pp2A, ambas fueron evaluadas mediante Western blot. La normalización de la expresión de la proteína de interés se realizó con la proteína gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh) y la proteína lamina B1, un marcador de la envoltura nuclear, fueron utilizadas como control de carga citoplásmica y nuclear, respectivamente.

3.1.8. Electroforesis

Brevemente, la electroforesis se basa en la transferencia eléctrica de energía de la cámara electroforética sobre el gel de acrilamida para que las proteínas que se encuentren en éste pasen de acuerdo a su tamaño y su carga del polo negativo a un polo positivo.

Para esto, a las proteínas se les desnaturalizo en un buffer de carga 5X específico (**véase anexo 12**). Por cada 100 µg de proteína total, 25 µl de Buffer de carga 5X fueron agregados y homogeneizados. Seguidamente, las muestras fueron calentadas por 10 minutos a 95°C en un termoblock ThermoStat Plus (Eppendorf, No. De Cat. 5352 000.010); inmediatamente después, estas muestras fueron colocadas en hielo por 10 min y almacenadas a -70°C para su posterior análisis. Para todos los casos, la electroforesis se realizó utilizando geles desnaturalizantes de 1.5 mm/10 pozos al 10% o 12% de poliacrilamida (**véase anexo 14**) en un sistema *MiniProtean Tetracell* (BioRad, No. De Cat. 1658003EDU). Los geles fueron cargados con el volumen correspondiente a 30 µg de proteína de acuerdo con los valores obtenidos en su respectiva cuantificación (**véase anexo 3**); paralelamente, 5 µl del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Xtra Standards* (Bio-Rad, No. De Cat. 161-0377) fueron cargados para identificar los pesos moleculares de las proteínas de interés. La corrida electroforética se realizó en una cámara *Mini Protean Tetracell* (Bio-Rad, No. De Cat. 16558005EDU) con una fuente de poder *PowerPac HC* (Bio-Rad, No. De Cat.1645050), en primera instancia a 70 V, y una vez que el frente de corrida de las proteínas había alcanzado el gel separador, la corriente fue incrementada a 120 V. La electroforesis se efectuó en un buffer de corrida 1x (**véase anexo 5**) y tuvo una duración aproximada de dos horas.

3.1.9. Transferencia de proteínas

Al término de la electroforesis las proteínas fueron transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (Merck Millipore, No. de Cat. IPVH00010), las cuales previamente fueron activadas en metanol durante 2 min; posteriormente, los casetes de transferencia fueron ensamblados de acuerdo al siguiente orden: lado del ánodo – esponja – filtro – membrana – gel con proteínas – filtro – esponja – lado del cátodo). Para obtener mayor eficiencia de los geles, todos los componentes indicados fueron sumergidos en buffer de transferencia 1x (BT1x), (**véase anexo 6**). El sistema utilizado fue el sistema de electrotransferencia húmeda *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad, No. De Cat. 1703930) con la fuente de poder *PowerPac HC*, a 300 mA durante 3 horas. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con 5% de leche libre de grasa disuelta en *Solucion amortiguadora, tris salino al tween 20 0.1%* (TBST 1x), (**véase anexo 7**).

3.1.10. Inmunodetección específica de las proteínas de interés

Posterior al proceso de transferencia, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo primario en agitación constante durante una noche a 4°C. Éste se diluyó en TBST 1x al 5% de leche libre de grasa y la dilución fue dependiente de la especificidad de cada anticuerpo (**véase tabla 1**). Al término de la incubación, el anticuerpo fue retirado y las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 min con TBST 1x. Posteriormente, el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) correspondiente al isotipo del anticuerpo primario fue incubado durante una hora a temperatura ambiente, el cual fue diluido en TBST 1x al 5% de leche libre de grasa (**tabla 1**). Luego de la incubación, el anticuerpo fue retirado y las membranas fueron lavadas tres veces por 5 min con TBST 1x. Para determinar la expresión de la proteína de interés de acuerdo a su peso molecular reportado, se utilizó un kit de quimioluminiscencia (Merck Millipore, No. De Cat. WBKLS0500). Las membranas fueron reveladas en un fotodocumentador mini HG9 (Uvitec Cambridge). Finalmente, las imágenes se obtuvieron de manera serial a tiempos de exposición entre 5 segundos y 5 min. Posteriormente, las bandas proteicas obtenidas después de revelar las membranas fueron cuantificadas mediante un análisis densitométrico, éste se realizó mediante el software para procesamiento de imágenes *Image J* desarrollado por el *National Institutes of Health (NIH)*, versión 1.5.

Anticuerpos primarios						
Nombre	Especie	Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo	isotipo
NxN (N3C3)	Conejo	1:1000	TBST1X/5%leche	Gene Tex	GTX107039	IgG
NxN	Cabra	1:200	TBST1X/1%BSA	RyD Systems	AF-5719	IgG
Pp2A	Conejo	1:1000	TBST1X/5%leche	Millipore	06-288	IgG
Pp2A	Conejo	1:1000	TBST1X/5%leche	Cell signalig	2038	IgG
Pp2A	Ratón	1:5000	TBST 1X 3%BSA	BD	610556	IgG
Gapdh	Ratón	1:5000	TBST1X/3%leche	Millipore	MAB374	
Lamin B1	Ratón	1:1000	TBST1X/5%leche	Abcam	Ab 16048	IgG

Anticuerpos secundarios					
Nombre	Especie	Dilución	Diluyente	Casa comercial	#catálogo
Anti-conejo-HRP	Conejo	1:10000	TBST1X/1%leche	Jackson	111-035-003
Anti-ratón-HRP	Ratón	1:10000	TBST1X/1%BSA	Jackson	315-035-003
Anti-cabra-HRP	Cabra	1:15000	TBST1X/5%leche	RyD Systems r	HAF109

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el análisis por western blot e inmunohistoquímica. En la tabla se muestran las condiciones de dilución de cada uno de los anticuerpos utilizados, así como su información comercial.

3.1.11 Análisis de complejos proteicos por inmunoprecipitación (IP)

Siguiendo el protocolo de western blot para el análisis de proteínas, la detección de complejos proteicos mediante inmunoprecipitación se realizó a partir de 3 mg de proteína total disuelta en 1 ml de PBS 1x. Primeramente, las inmunoglobulinas endógenas fueron eliminadas incubándolas con 30 µl de perlas A/G agarosa (Santa Cruz Biotechnology No.De Cat. SC-2003) durante 4 horas a 4°C en una plataforma oscilante. Posteriormente, las perlas fueron precipitadas por centrifugación a 14000 rpm por 1 minuto; después, 300 µl de Buffer de dilución (**véase anexo 20**) fueron

agregados al pellet restante al cual se le realizaron lavados en el orden siguiente (se colocó en la plataforma oscilante durante 10 minutos a 4°C; se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 14 000 rpm y se desechó el sobrenadante). Para asegurar la inmunoprecipitación de la proteína de interés; el anticuerpo se dejó interactuar durante una noche en agitación a 4°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 7000 rpm por un minuto y el sobrenadante fue separado y almacenado. Las perlas fueron lavadas con Buffer de dilución como se explicó anteriormente. Después, con 300 µl de la solución stock (**véase anexo 24**) se incubó en la plataforma oscilante durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavado a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las perlas fueron lavadas con 300 µl de buffer de lavado (**véase anexo 21**) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El complejo formado (proteína/anticuerpo/perlas A/G agarosa) fue lavado con 1 ml de buffer de lisis en agitación a 4°C por 10 minutos y los tubos fueron centrifugados nuevamente a 14 000 rpm por 1 minuto. Los complejos fueron lavados dos veces más con buffer de lisis y una con PBS 1x. Finalmente, éstos fueron separados con buffer de carga, como se describe en la sección de la técnica de WB, las perlas fueron precipitadas a 12,000 rpm, y el sobrenadante fue almacenado a -20°C para analizar los complejos proteicos precipitados los cuales se realizaron mediante WB, como previamente fue descrito.

3.1.12. Extracción de proteína nuclear

Se utilizaron cien miligramos de tejido para homogeneizar con 800 µl de buffer A (**véase anexo 24**), se filtró el contenido para colocarse en un tubo nuevo. El contenido fue agitado fuertemente en un vortex (Barnstead Thermolyne No. de Cat. MaxiMix II 37600) durante 15 segundos; posteriormente; se incubó a 4°C durante 15 minutos. Pasado el tiempo las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga por 1 minuto a 14 000 rpm a 4°C (ThermoFisher Scientific, No. De Cat, 75002401); al sobrenadante

se le agregaron 32 μ l de NP40 al 10% y posteriormente fue agitado durante 10 segundos. Después, las muestras fueron centrifugas por 30 segundos a 14 000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a -80°C; se lavó la pastilla restante con 800 μ l de PBS 1 x y se agito manualmente; posteriormente, se procedió a analizar la extracción nuclear por medio de WB como se mencionó anteriormente.

3.1.13 Análisis por inmunohistoquímica

Con la finalidad de observar la localización estructural de las proteínas a nivel histológico se empleó la técnica de IHQ. Los tejidos fueron desparafinados y rehidratados; posteriormente, se sumergieron en Buffer *rodent decloaker* (BIOCARE MEDICAL, No. De Cat. 071417) durante 30 min en baño maría en una olla de presión. Después, se colocaron las laminillas en un soporte para portaobjetos; los tejidos fueron lavados con 1 ml de agua destilada y posteriormente con 1 ml de TBST 1x. Consecutivamente, las laminillas fueron incubadas con un bloqueador de peroxidasa endógena del Kit Mouse/Rabbit InmunoDetector HRP/DAB (Bio SB, No. De Cat. BSB 0005) durante 30 min, seguido de tres lavados con 1 ml de TBST 1x. Los tejidos fueron bloqueados con albumina al 1% en TBST 1x por 30 min, y posteriormente se agregó 100 μ l de anticuerpo primario fueron agregados (**véase tabla 1**) e incubados toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, los tejidos fueron lavados con TBST 1x en tres ocasiones; posteriormente, el anticuerpo secundario anti-conejo (DACO, No. De Cat. K4003) fue agregado, e incubado durante 30 min a temperatura ambiente y lavado con TBST 1x. La inmunodetección se realizó con 100 μ l de *DAB-Chromogen* por cada mililitro de *DAB-Substrate* del kit Mouse/Rabbit InmunoDetector HRP/DAB de Bio SB. Posteriormente, los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina para después ser montados con resina Eco Mount de BIOCARE MEDICAL. Por último, fotografías representativas de cada grupo de animales tratados con la DEN fueron tomadas con una cámara (*Canon*

EOS-1000D) acoplada al microscopio *ZEISS Axio-A1*; el objetivo utilizado fue el 20x para obtener una magnificación final de 200x.

3.1.14. Análisis estadístico

El *software Graphpad Prism V 7.0* fue utilizado tanto para el análisis estadístico como para realizar las gráficas comparativas. La prueba paramétrica *t* de *Student* fue utilizada cuando sólo dos grupos experimentales fueron comparados, mientras que la ANOVA (análisis unidireccional de la varianza) fue utilizada para comparaciones múltiples con una prueba *post-hoc* de Sidak. Para ambos casos, se consideró que las comparaciones fueron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

6. Resultados y análisis de resultados

4.1 Alteración del parénquima hepático por efecto de la Dietilnitrosamina

La revisión histopatológica del hígado se centró principalmente en las alteraciones hepáticas generadas con el modelo de hepatocarcinogénesis experimental ya descrito. El grado de las lesiones hepáticas estuvo relacionado con el incremento de la dosis y el tiempo de exposición al carcinógeno, es decir, las lesiones aumentaron de manera dosis y tiempo dependiente. Las lesiones hepáticas se observaron marcadamente en los animales administrados con la DEN a 20 mg/kg. Después de seis semanas de tratamiento con la DEN observamos una pérdida de la alineación de los cordones de hepatocitos y presencia de células gigantes; a las diez semanas de tratamiento, se apreció de manera evidente la pérdida total de los cordones de hepatocitos, así como una presencia abundante de infiltrado inflamatorio, linfocitos maduros, células gigantes, algunas células con citoplasma mal definido, anisonucleosis y proliferación anormal de células de tipo colangiolar. Algo semejante ocurrió con la semana catorce de administración de la DEN, se observó mayor proliferación colangiolar aunado a una pérdida en la integridad de los vasos sanguíneos. Por último, a las dieciocho semanas de tratamiento con DEN a 20 mg/kg se observó claramente la pérdida total de la arquitectura hepática, la cual estuvo acompañada de proliferación colangiolar exacerbada, asociada a una inflamación crónica perivascular e intraparenquimatosa, formada por linfocitos maduros, nucleomegalia y necrosis, también observamos células gigantes con citoplasma amplio eosinofílico, dilatación sinusoidal y apariencia de tumores bien definidos **(véase figura 10)**.

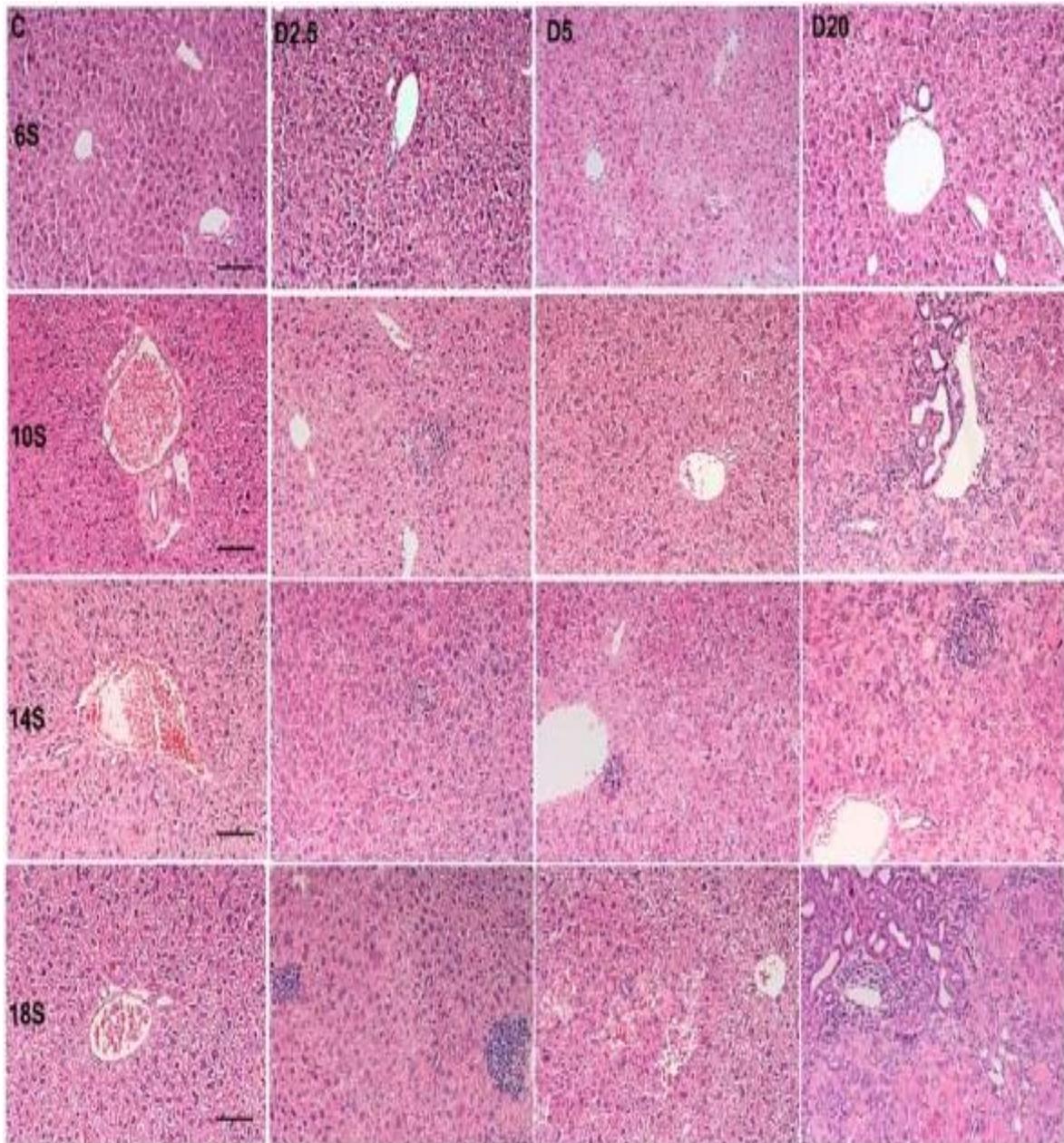


Figura 10. Alteración de la arquitectura hepática de ratones tratados con la DEN. La integridad del tejido hepático se evaluó mediante la tinción de H&E. Las fotos son imágenes representativas de cortes histológicos de 2 μ m de espesor. Se observan los núcleos teñidos de púrpura y el citoplasma de rosa. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μ m. n=5.

4.2. Efecto de la DEN en la fibrogénesis

Para evaluar si la DEN activó el proceso de fibrogénesis, un fenómeno recurrente en alteraciones hepáticas, se realizó la tinción tricrómica de Masson para observar la deposición de fibras de colágeno en el hígado de los ratones tratados. Como se puede apreciar en la **figura 11**, en los animales control observamos que la presencia de fibras de colágeno se limitó a conductos biliares, venas, arterias hepáticas y ausencia de éstas en el parénquima hepático, tal y como se espera en una condición normal. De la misma forma, en el hígado de los ratones tratados con DEN a 2.5 y 5 mg/kg no se observaron cambios. Sin embargo, la dosis de DEN a 20 mg/kg indujo levemente la deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático desde las 10 semanas de administración, la cual incrementó conforme aumentó el tiempo de exposición al carcinógeno.

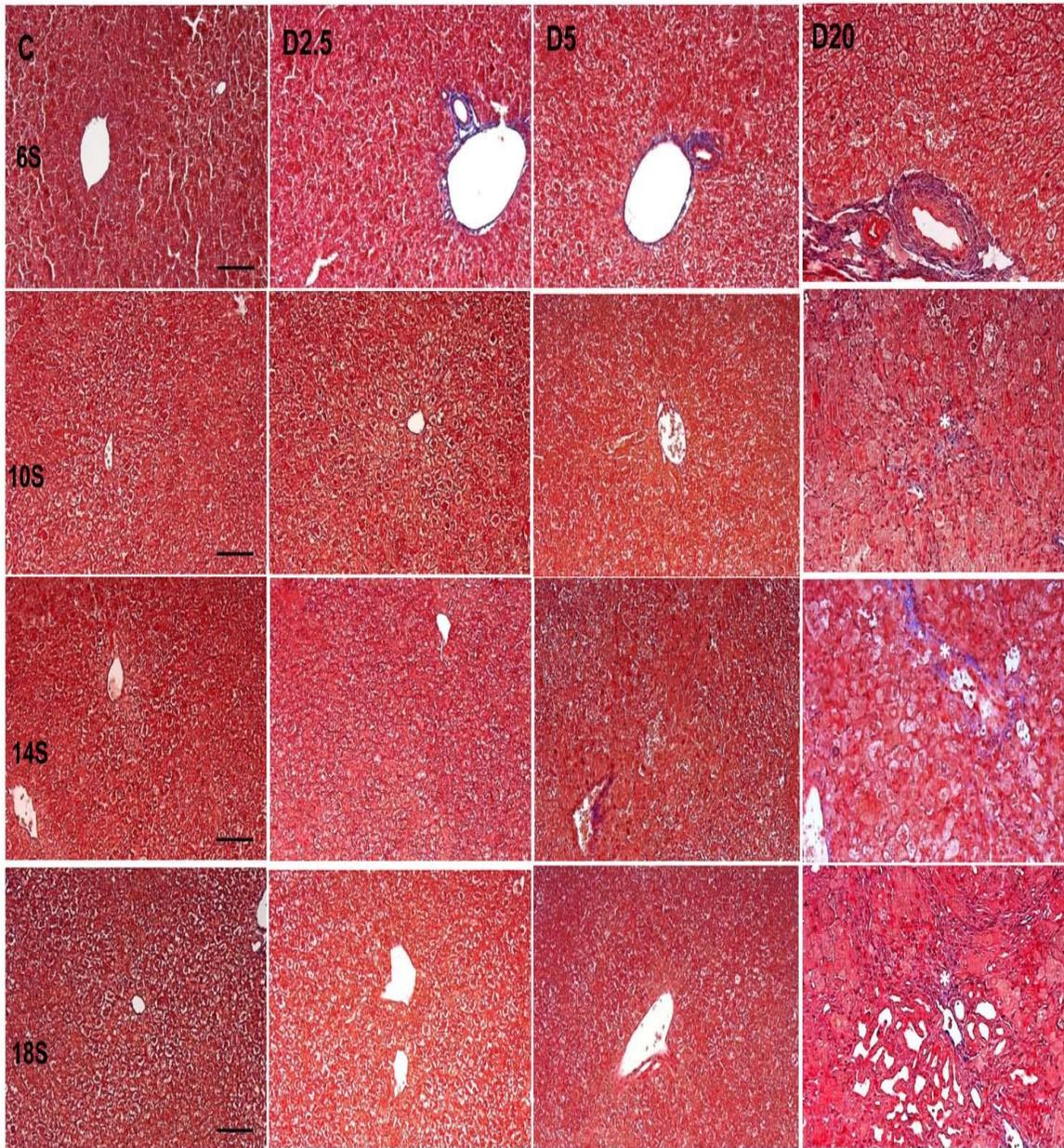


Figura 11. Deposición de fibras de colágeno en el parénquima hepático del ratón. Se realizó una tinción tricrómica de Masson para determinar la presencia de fibras de colágeno en el parénquima hepático de ratones tratados con DEN. Las fotos son imágenes representativas de cortes histológicos de 2 μ m de espesor. Se observan las fibras de colágeno teñidas en color azul. C: control, DEN 2.5 mg/kg, D5: animales tratados con DEN 5 mg/kg, D20: animales tratados con DEN 20 mg/kg. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μ m. n=5.

4.3. Incremento del nivel de la Nxn por efecto de la DEN

Durante el desarrollo de la hepatocarcinogénesis algunos blancos moleculares sensibles al estrés oxidativo son activados, dentro de estos se encuentran las tioredoxinas proteínas encargadas de mantener el equilibrio en las fluctuaciones de EROS; dentro de esta familia se encuentra Nxn³³. En esta investigación determinamos la respuesta de la Nxn a las diferentes dosis de la administración de DEN mediante análisis de inmunohistoquímica y nivel proteico. En cuanto a la localización tisular de la Nxn, se apreció que la marca positiva incrementó en el hígado de manera dosis dependiente; así, a las 18 semanas de administrar la DEN a 20 mg/kg la localización de la marca para Nxn fue preferencialmente intranodular. Además, se apreció que la marca positiva para Nxn fue tanto citoplasmática como nuclear. También, observamos un incremento de la marca nuclear de Nxn el cual fue dosis dependiente (**véase figura 12**).

Al analizar los niveles proteicos de Nxn mediante WB, observamos que la DEN incrementó de manera gradual la expresión proteica de Nxn y este incremento fue dosis dependiente; es decir, la dosis más alta (20 mg/kg) aumentó significativamente el nivel de la Nxn ($p < 0.0001$) (**véase figura 13**). Adicionalmente, el incremento del nivel de la Nxn inducido por la dosis de 20 mg/kg a partir de las diez semanas del tratamiento también fue significativo respecto de los grupos administrados con las dosis de 2.5 y 5 mg/kg ($p < 0.0001$). Este hallazgo coincide con otros autores que señalan a la Nxn como una proteína que responde a estímulos oxidantes y se transloca al núcleo celular como un mecanismo de protección ^{20 33 21 34}.

4.3.1 Eficiencia de la extracción de proteína nuclear.

Para determinar la presencia en el núcleo celular de las proteínas involucradas en el complejo proteico Pp2A/Nxn se analizó la compartimentalización citoplasmática y nuclear tanto de Nxn como de Pp2A. Primeramente, se evaluó y comprobó la eficiencia de extracción de proteína nuclear con una proteína la cual se encuentra sólo en el núcleo celular, la Lamin B1, y así, determinar la eficiencia del fraccionamiento subcelular (**véase figura 14**). La eficiencia de separación de la proteína nuclear de la citoplásmica fue del 89%. Con estos resultados pudimos determinar que las evaluaciones subsecuentes sobre la cantidad de las proteínas de interés translocadas al núcleo se debía al estímulo de la DEN y no al procedimiento de fraccionamiento subcelular.

Posteriormente, determinamos la compartimentalización de las proteínas de interés. Para el caso de Nxn, encontramos que las dosis de 2.5 y 5 mg/kg provocaron una tendencia de disminución de la expresión en la fracción citosólica a partir de las catorce semanas de administración de la DEN; sin embargo, la dosis de la DEN 20 mg/kg provocó una disminución significativa ($p < 0.0108$) (**véase figura 15**). En contraste, se observó que en la fracción nuclear el tratamiento de 20 mg/kg de DEN indujo la translocación de Nxn al núcleo a partir de las catorce semanas ($p = 0.0001$) (**véase figura 16**). Con estos resultados confirmamos que la DEN aumentó los niveles de la Nxn y este efecto fue dosis dependiente, congruente con lo que se observó mediante el análisis de IHQ; además, confirmamos que la Nxn es translocada al núcleo celular principalmente por la mayor dosis de DEN administrada.

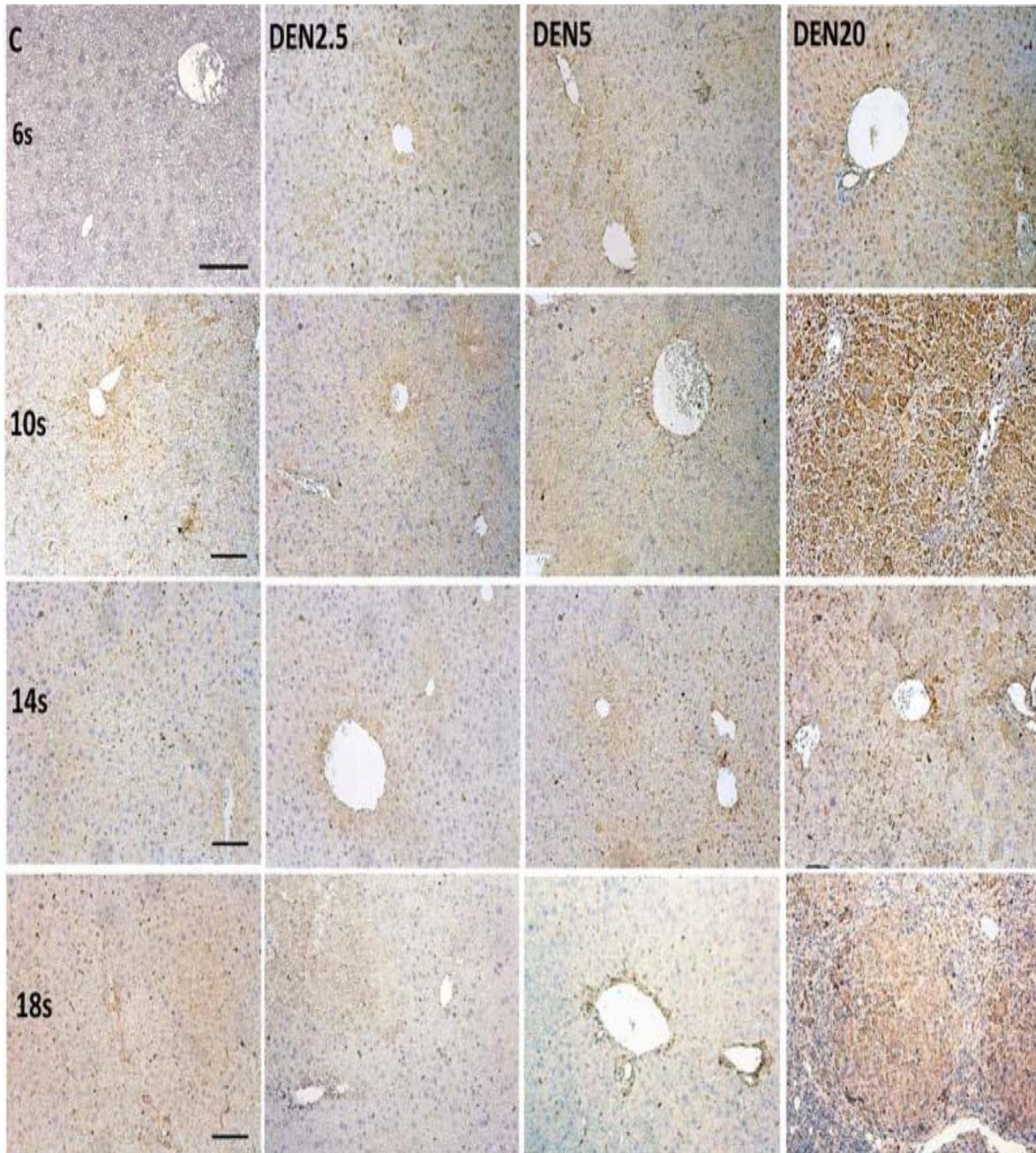


Figura 12. Expresión de Nxn en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN. La expresión de Nxn fue determinada mediante análisis inmunohistoquímicos. Se utilizaron cortes histológicos de 2 μm de espesor. La marca positiva a Nxn se puede apreciar en áreas o estructuras celulares teñidas en diferentes gradientes de color café. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con la DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con la DEN 20 mg/kg. $n= 5$ animales. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μm .

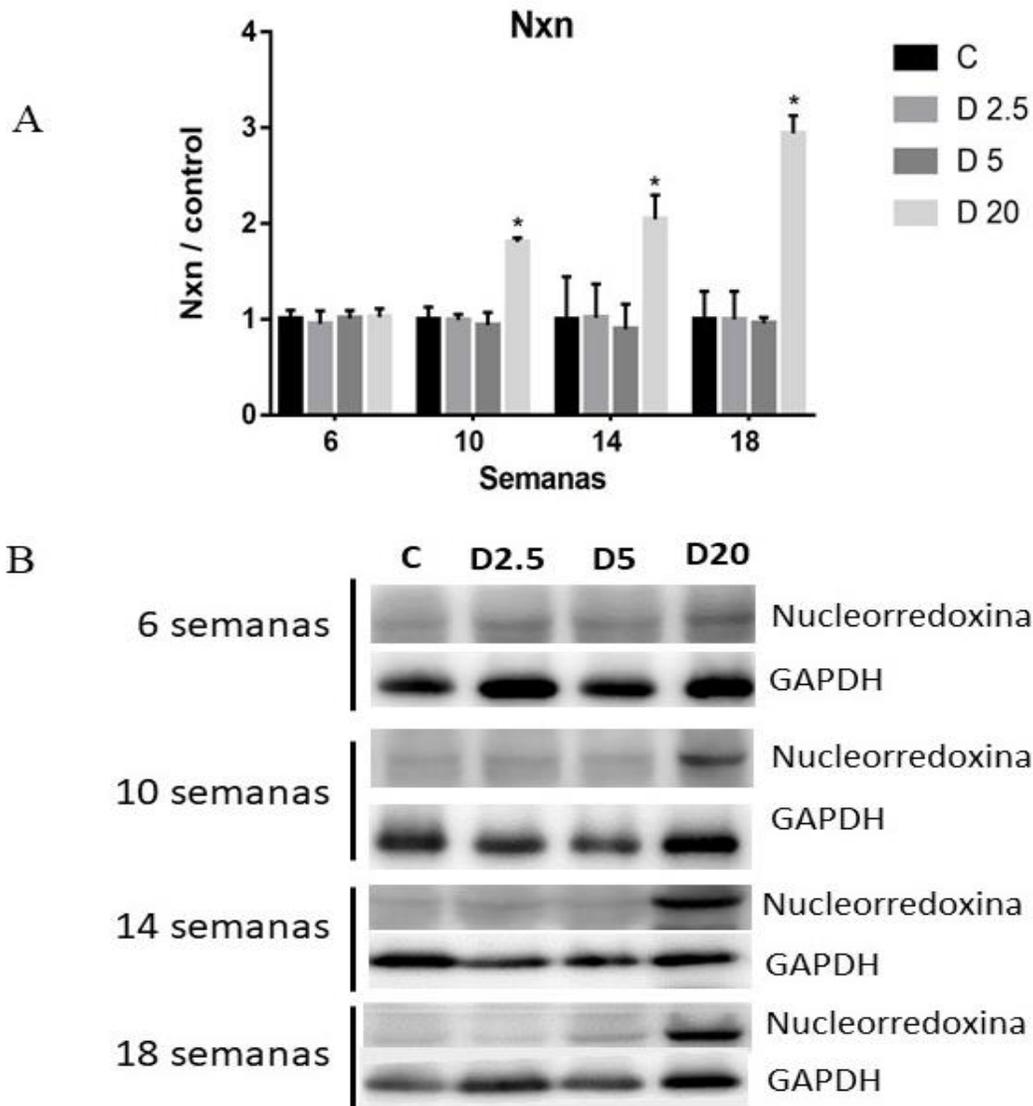


Figura 13. _Expresión proteica de Nxn en ratones administrados con DEN. A: La gráfica simboliza el análisis densitométrico de la expresión de Nxn, esta expresión fue normalizada con la proteína constitutiva Gapdh. Cada barra representa el promedio de la expresión de Nxn igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la expresión entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de DEN. **B:** Las imágenes representan la expresión de Nxn mediante la detección inmuno-específica por WB, se utilizó Gapdh como control de carga. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n=4$.

Compartimentalización

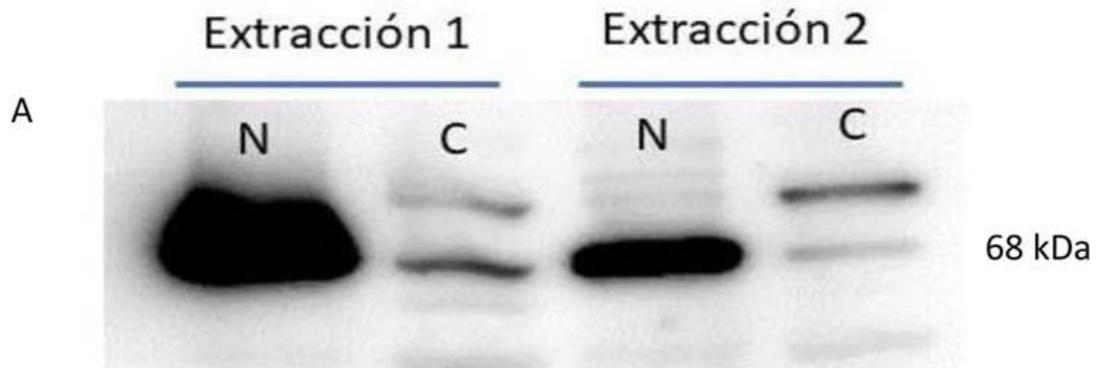


Figura 14. A Eficiencia de la extracción de proteínas nucleares.: La imagen representa los niveles de la proteína nuclear mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó Lamina B1 como control de eficiencia de la extracción de proteína nuclear. Extracción 1, N: proteína nuclear, C: proteína citoplasmática, Extracción 2, N: proteína nuclear, C: proteína citoplasmática.

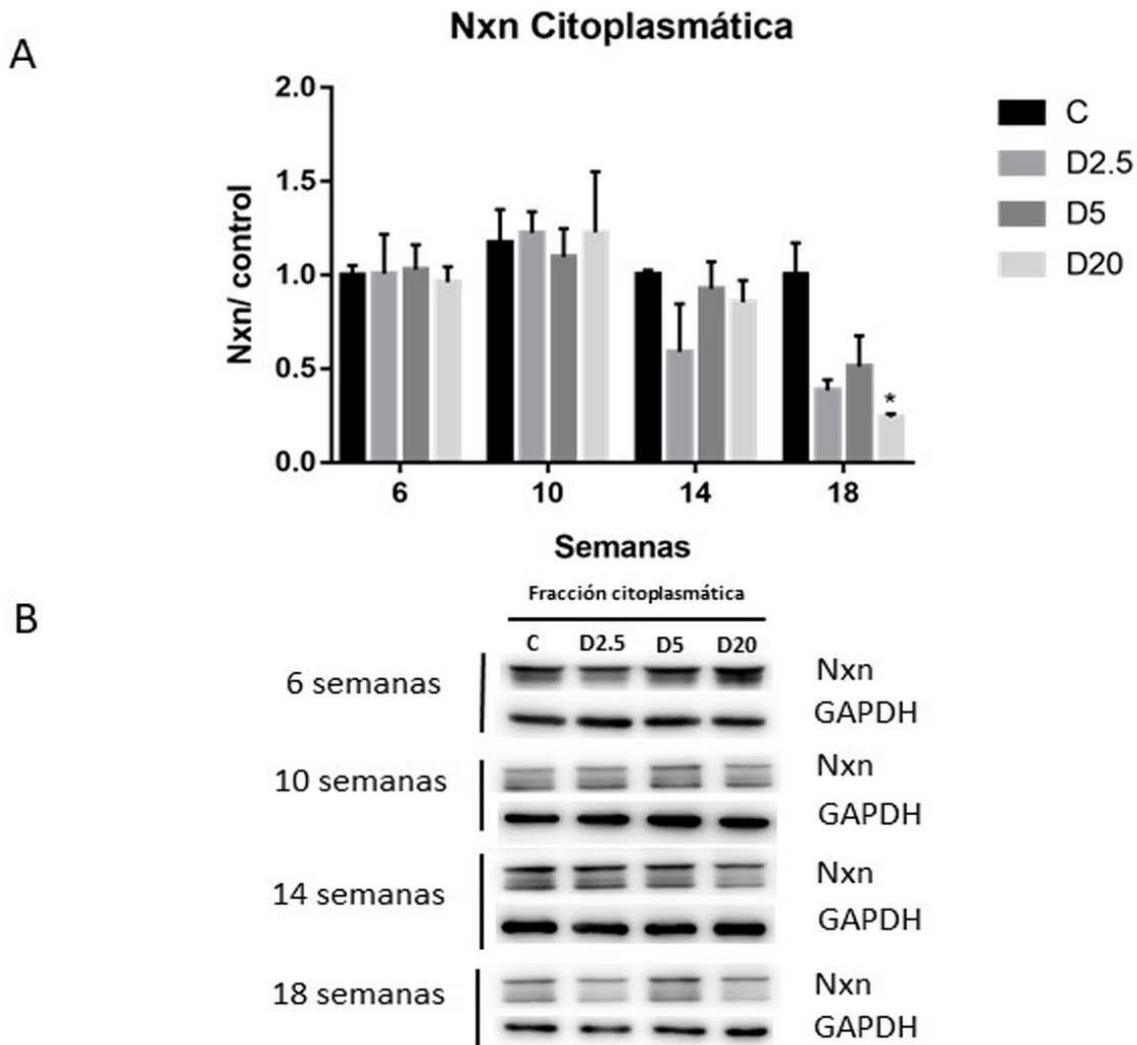


Figura 15. Efecto de la DEN en fracción citoplasmática de Nxn. **A:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico de la expresión de Nxn en proteína citoplasmática. Cada barra representa el promedio de la localización de Nxn igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la expresión entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de DEN. **B:** Las imágenes representan la localización de Nxn citoplasmática mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó GAPDH como control de carga. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n=4$

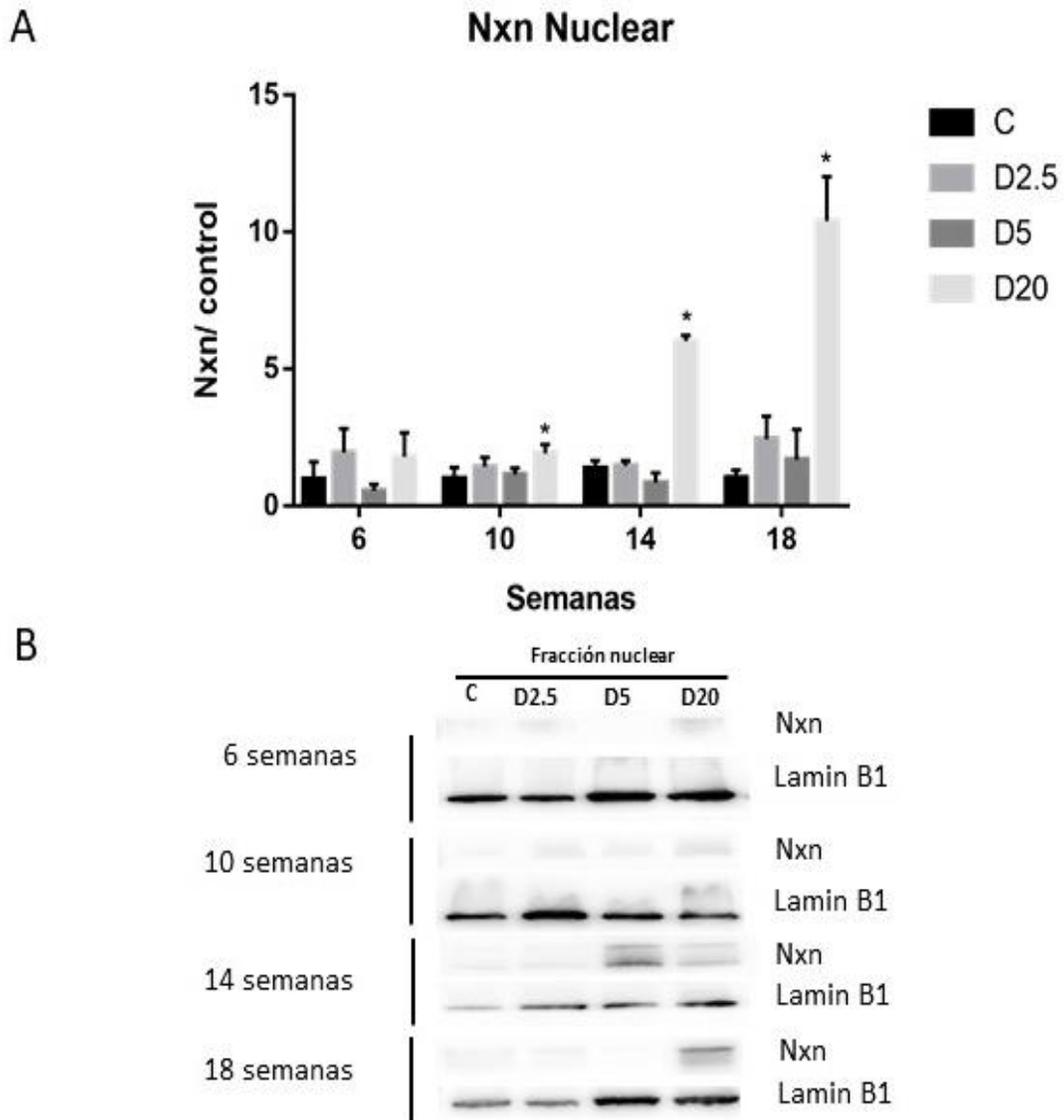


Figura 16. Efecto de la DEN en fracción nuclear de Nxn. **A:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico de la expresión de Nxn en proteína nuclear. Cada barra representa el promedio de la expresión de Nxn nuclear igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la expresión entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de la DEN. **B:** Las imágenes representan la translocación de Nxn nuclear mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó Lamin B1 como control de carga. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n=4$

4.4. Incremento del nivel de expresión de Pp2A bajo el efecto de la DEN

Pp2A regula diferentes vías de señalización³⁵; además, se ha descrito como un importante supresor de tumores.³⁵ Observamos que la localización tisular de Pp2A se encuentra dispersa en el tejido hepático, aunque se aprecia un ligero incremento en la marca positiva para Pp2A en el citoplasma celular desde las 6 semanas del tratamiento con la dosis 2.5 mg/kg de la DEN. Este incremento fue más evidente al administrar 20 mg/kg de DEN. Asimismo, después de 18 semanas de administración de la DEN, la localización estructural de esta proteína fue preferencialmente intranodular y la marca positiva se observó principalmente citoplasmática (**véase figura 17**). En cuanto al nivel proteico de Pp2A mediante WB, aunque no se observó un incremento con el tratamiento de las dosis menores 2.5 y 5 mg/kg, al administrar durante dieciocho semanas la dosis de 20 mg/kg de la DEN hubo un incremento en la expresión proteica de Pp2A ($p < 0.0134$) (**véase figura 18**). Al respecto, se ha reportado que esta proteína se encuentra elevada en tumores de pacientes con CHC.³⁶ Además, Pp2A se ha encontrado incrementada en ratones transgénicos VHC³¹, administrado con DEN. También, para esta proteína evaluamos su localización estructural mediante la extracción de la proteína nuclear y citoplasmática. En la fracción citoplasmática encontramos un incremento en su localización al administrar 20 mg/kg de DEN durante dieciocho semanas ($p = 0.0013$) (**véase figura 19**). Sin embargo, la translocación de esta proteína a núcleo no fue estadísticamente significativa. (**véase figura 20**). Con estos resultados concluimos que la DEN aumentó la expresión de Pp2A de una manera dosis dependiente; además, observamos que Pp2A fue localizado principalmente dentro del citoplasma celular y en lesiones tumorales. Estos resultados concuerdan con lo encontrado en muestras de tumores de pacientes con CHC³⁶.

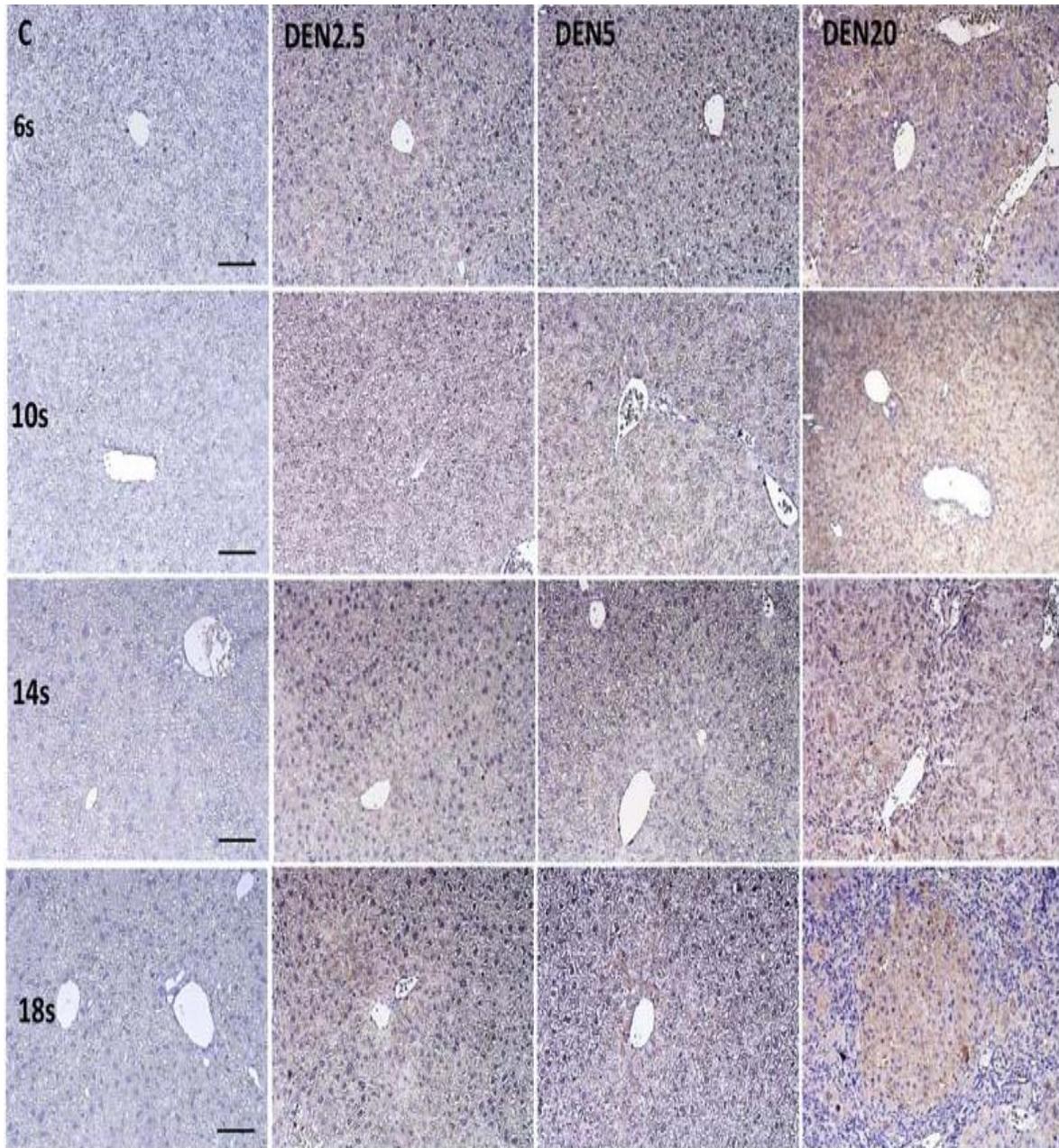


Figura 17. Localización de Pp2A en el tejido hepático de ratones administrados con diferentes dosis de DEN. La expresión de Pp2A fue determinada mediante análisis inmunohistoquímicos. Se utilizaron cortes histológicos de 2 μ m de espesor. La marca positiva a Pp2A se puede apreciar en áreas o estructuras celulares teñidas en diferentes gradientes de color café. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con la DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con la DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con la DEN 20 mg/kg. $n= 5$ animales. Magnificación de las imágenes 200x. La barra indica 100 μ m

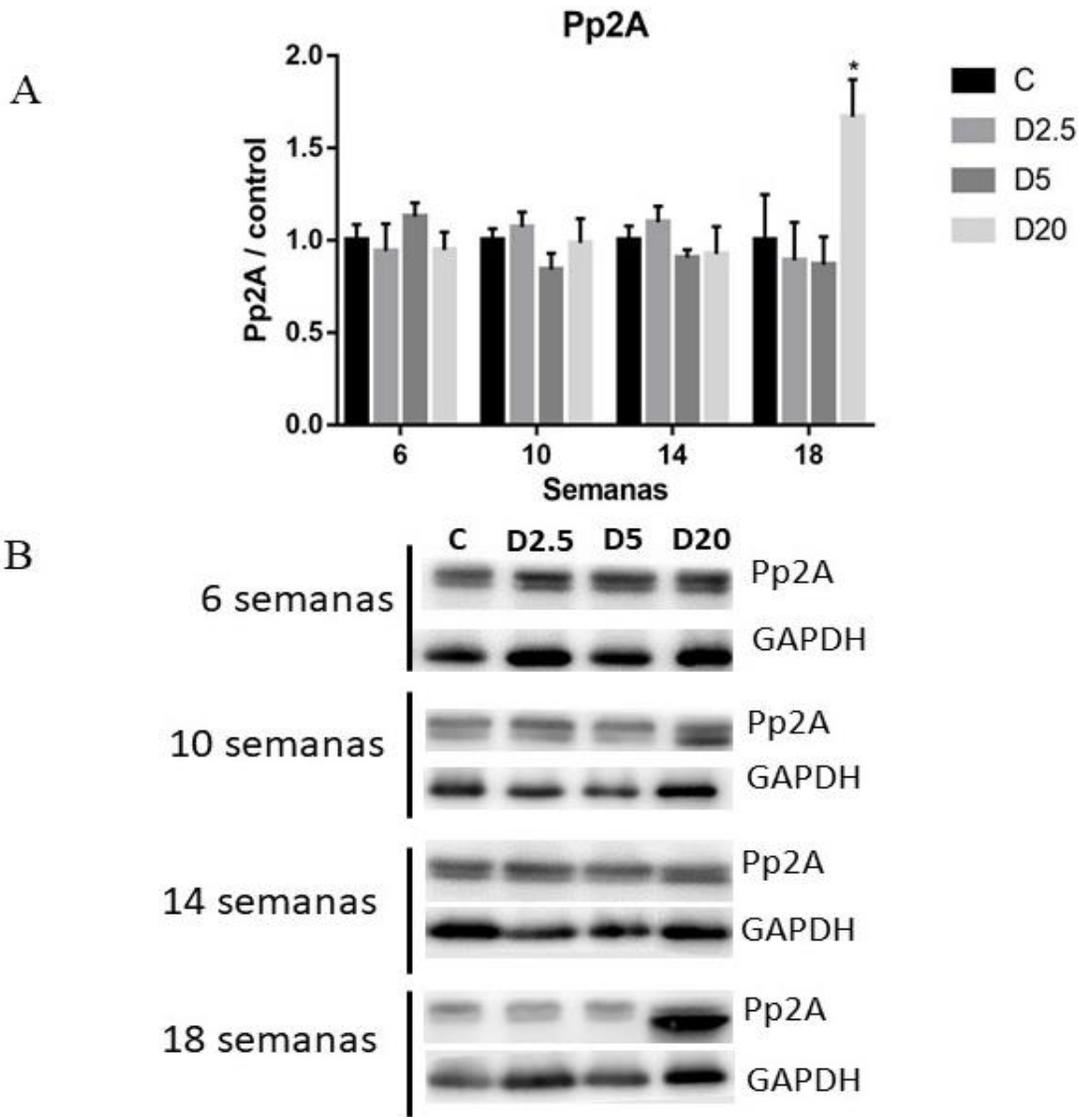


Figura 18. Expresión proteica de Pp2A en ratones administrados con DEN. **A:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico del nivel de Pp2A, esta expresión fue normalizada con la proteína constitutiva GAPDH. Cada barra representa el promedio del nivel de Pp2A igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio del nivel proteico entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de la DEN. **B:** Las imágenes representan el nivel proteico de Pp2A mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó GAPDH como control de carga. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n=4$.

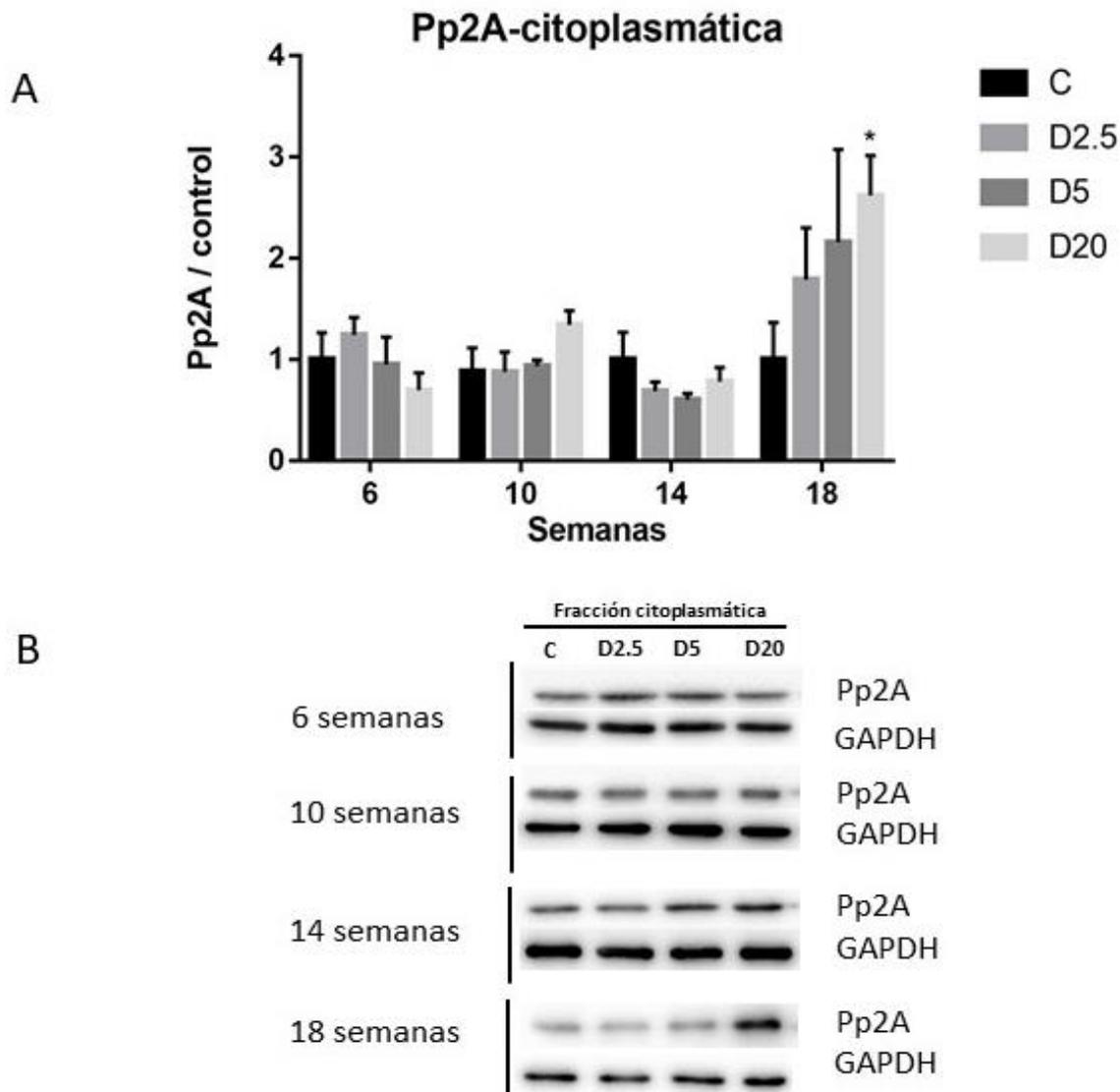


Figura 19. Efecto de la DEN en fracción citoplasmática de Pp2A **A:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico de la expresión de Pp2A en proteína citoplasmática. Cada barra representa el promedio de la localización de Pp2A igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la localización entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de la DEN. **B:** Las imágenes representan la localización de Pp2A citoplasmática mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó GAPDH como control de carga. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. *Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($p < 0.05$). $n=4$.

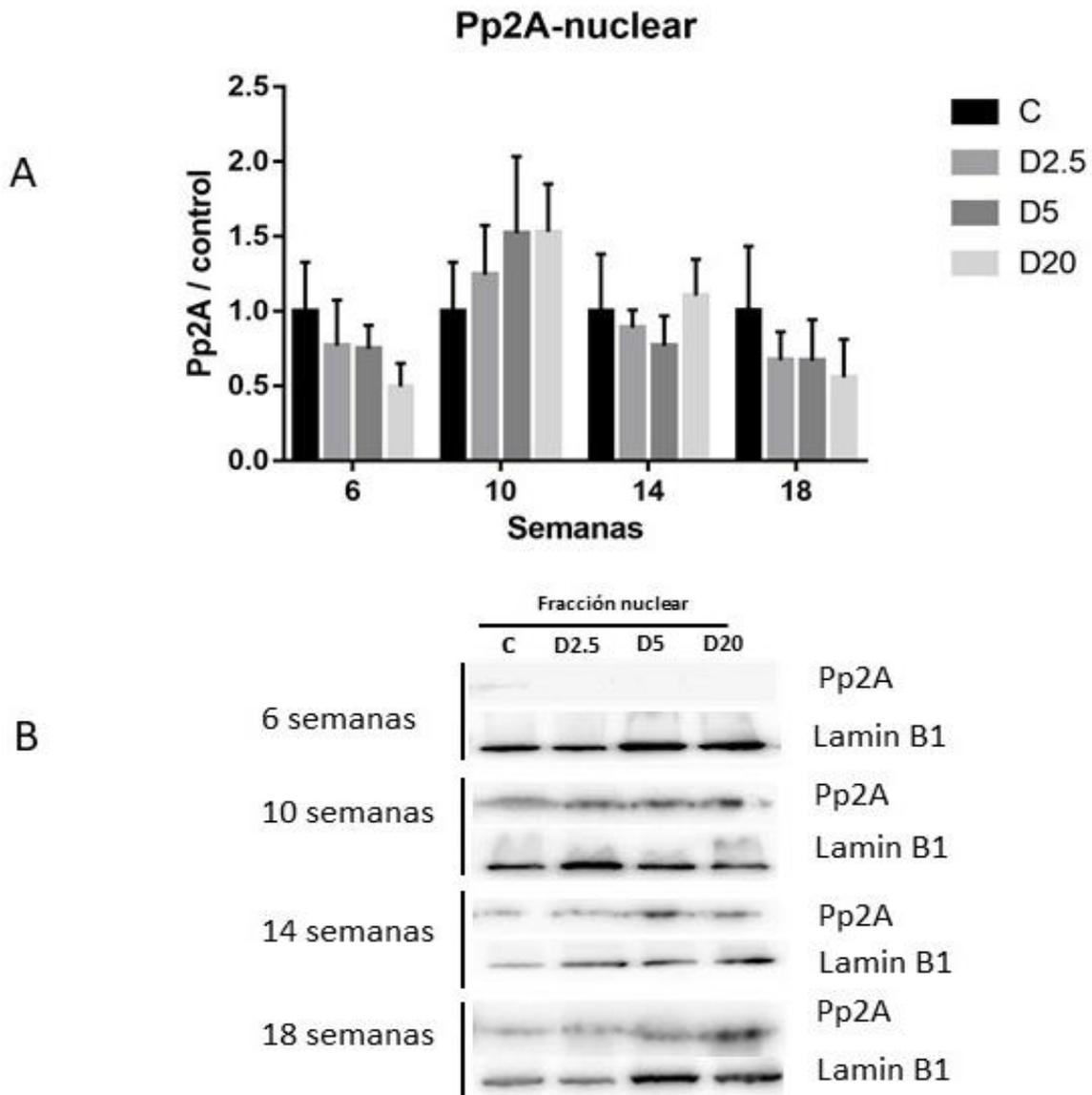


Figura 20. Efecto de la DEN en fracción nuclear de Pp2A. **A:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico de la translocación de Pp2A en proteína nuclear. Cada barra representa el promedio de la translocación de Pp2A nuclear igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la expresión entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. Los grupos de barras corresponden a una duración distinta de la administración de la DEN. **B:** Las imágenes representan la translocación de Pp2A nuclear mediante la detección inmunoespecífica por WB, se utilizó Lamin B1 como control de carga. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. 6s: 6 semanas de tratamiento, 10s: 10 semanas de tratamiento, 14s: 14 semanas de tratamiento, 18s: 18 semanas de tratamiento. $n=4$

4.5 El estrés oxidativo inducido por la Dietilnitrosamina estimula la unión del complejo nucleorredoxina/proteína fosfatasa 2A.

Con base en lo encontrado a nivel de la Nxn durante la hepatocarcinogénesis inducida por la DEN, los resultados sugieren que el complejo Nxn/Pp2A podría ser alterado como consecuencia del efecto de las EROS producidas por efecto del carcinógeno. Estas consideraciones nos llevaron a explorar la respuesta de este complejo a los efectos de las diferentes dosis de la DEN en el hígado del ratón mediante ensayos de inmunoprecipitación (IP). Con la finalidad de optimizar la utilización de anticuerpos para dichos análisis seleccionamos los grupos de animales control sin tratamiento, 2.5, 5 y 20 mg/kg de DEN. De acuerdo con el análisis de IP de la Nxn, encontramos que la DEN alteró significativamente ($p \leq 0.05$) la formación del complejo Nxn/Pp2A, especialmente la dosis de 20 mg/kg (**véase figura 21**). Asimismo, se demostró que esta dosis aumenta la proporción de interacción de este complejo comparado con el control. Posteriormente, el análisis de IP de Pp2A (**véase figura 22**) confirmó los resultados obtenidos mediante la IP de Nxn donde demostramos que la proporción del complejo aumenta en comparación con los controles ($p \leq 0.05$). Estos hallazgos concuerdan con lo que se ha reportado acerca de la afinidad proteica entre las oxidorreductasas y las fosfatasa³⁷.

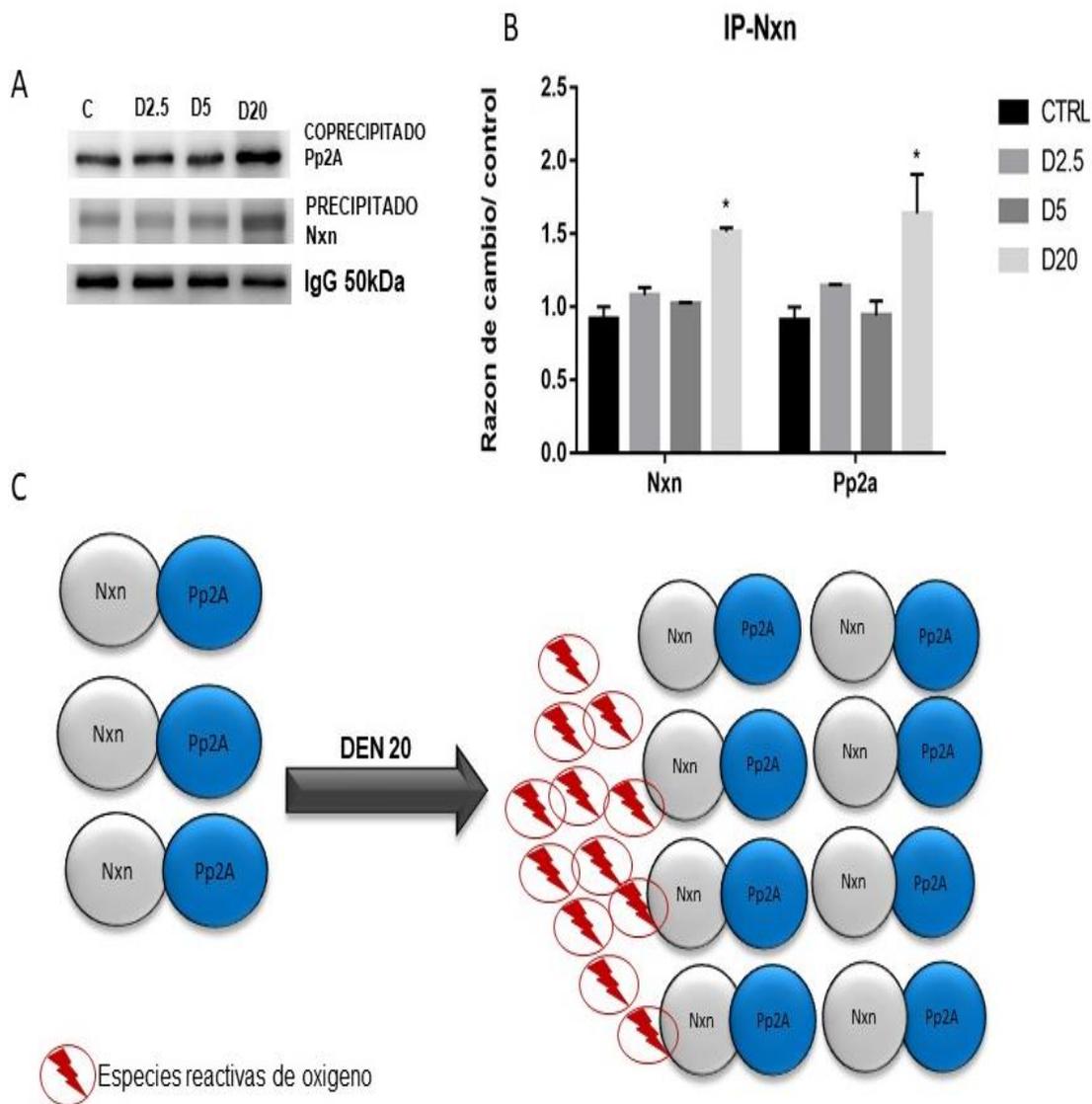


Figura 21 Efecto de la DEN sobre el complejo proteico nucleorredoxina – proteína fosfatasa 2A
A: Las imágenes representan la expresión de Nxn inmunoprecipitada mediante la detección inmunoespecífica por WB. C: control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg. Con 18 semanas de tratamiento. $n=4$. **B:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico de la expresión de Nxn inmunoprecipitada. Cada barra representa el promedio del nivel de Nxn inmunoprecipitada igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en el nivel entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. **C:** El esquema representa como la proporción de unión del complejo se mantiene unida y además aumenta ante el estímulo de las EROS.

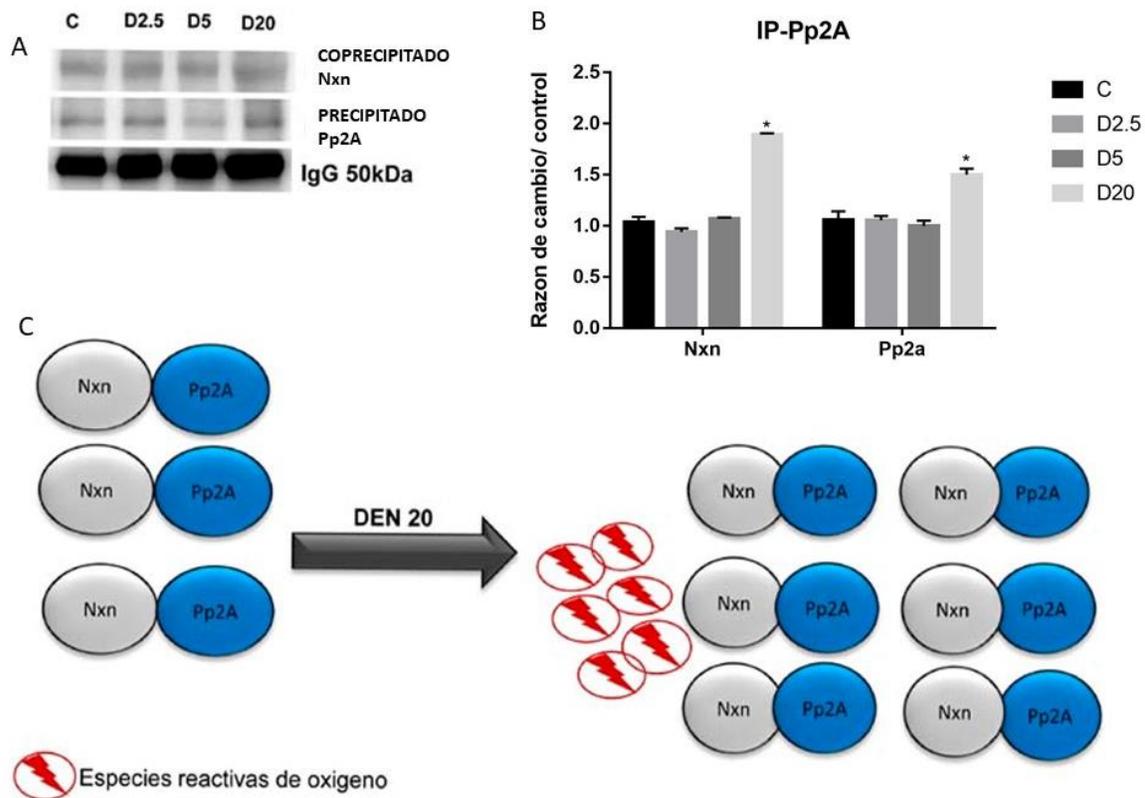


Figura 22 Efecto de la DEN sobre el complejo proteico nucleorredoxina – proteína fosfatasa 2A
A: Las imágenes representan la expresión de Pp2A inmunoprecipitada mediante la detección inmunoespecífica por WB. **C:** control de animales no administrados, D2.5: animales administrados con DEN 2.5 mg/kg, D5: animales administrados con DEN 5 mg/kg, D20: animales administrados con DEN 20 mg/kg con 18 semanas de tratamiento. $n=4$ **B:** La gráfica simboliza el análisis densitométrico del nivel de Pp2A inmunoprecipitada. Cada barra representa el promedio del nivel de Pp2A inmunoprecipitada igualada a 1 respecto de cada grupo control para analizar las veces de cambio en la expresión entre los diferentes tratamientos, \pm error estándar. **C:** El esquema representa como la proporción de unión del complejo se mantiene unida y además aumenta ante el estímulo de las EROS.

7. Discusión

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el cuarto tipo de tumor más mortal y uno de los más frecuentes en todo el mundo. Además, es el quinto cáncer más común en hombres y el noveno en mujeres, con aproximadamente 500,000 y 200,000 casos nuevos por año ⁴. En el ser humano, esta enfermedad se desarrolla después de un largo periodo de exposición a pequeñas y repetidas cantidades de distintos agentes etiológicos. Para estudiarlo, se han desarrollado diferentes modelos experimentales en roedores donde cada modelo utilizado depende principalmente del objetivo que se quiere investigar. Existen modelos bien establecidos que reproducen su progresión en periodos muy cortos, estos permiten estudiar y entender su comportamiento en roedores³⁸. Sin embargo, los modelos más utilizados para la hepatocarcinogénesis experimental hasta ahora descritos; por un lado, utilizan dosis carcinogénicas muy elevadas, a las cuales el ser humano no está expuesto normalmente; y por otro, el roedor más utilizado en estos modelos es la rata³⁹. Es así que decidimos desarrollar un modelo de hepatocarcinogénesis experimental en el ratón como medio de aproximación para reproducir los eventos asociados a su desarrollo en el ser humano. Este modelo consiste en administrar crónicamente repetidas dosis de DEN, un hepatocarcinogénico ampliamente utilizado. Así, en este trabajo realizamos la caracterización a nivel histopatológico y molecular de un modelo de hepatocarcinogénesis inducida por la DEN en el ratón; que paralelamente, nos permite determinar su efecto sobre interacciones moleculares redox sensibles que parecen contribuir al desarrollo del CHC.

Uno de los agentes químicos más comunes para reproducir y comprender la fisiopatología del CHC en seres humanos es la DEN. Esta se encuentra regularmente, en el aire de algunas ciudades en cantidades de 200 mg/m³; también, se han encontrado hasta 8.3 ng de DEN por cigarro de tabaco comercial; en algunos tipos de quesos se ha encontrado hasta 1 µg/kg; en diferentes tipos de pescados ahumados se ha observado que pueden encontrarse hasta 4µg/kg de DEN; hasta 1µg/kg en el tocino frito; y hasta 0.1 µg/kg en varias bebidas alcohólicas (brandy, coñac, ron, whisky y sidra) ⁹. Además este carcinógeno es empleado en modelos de investigación por su utilidad en animales para reproducir mecanismos moleculares que operan de manera similar en seres humanos, es así que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasifica a la DEN en el grupo 2A, como carcinogénicos confirmados experimentalmente en modelos animales, pero en humanos aún no se ha descrito como un carcinógeno directo, pero el humano se encuentra fuertemente expuesto a la Dietilnitrosamina ⁴⁰. Teniendo en cuenta esta información, realizamos una investigación en un modelo de CHC en el ratón inducido por la DEN ya que estos roedores comparten características filogenéticas más cercanas con los seres humanos. Nos enfocamos en realizar una evaluación del daño generado por la DEN, mediante el registro y comparación de su peso. Previamente, como se sugirió en el siguiente trabajo el efecto dosis-respuesta de la DEN a 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg de DEN/kg de peso corporal durante seis semanas. Encontramos que mientras la dosis de 40 mg/kg disminuyó significativamente el peso corporal de los ratones e incluso, sólo el 30% de los animales sobrevivieron al tratamiento, la de 20 mg/kg impidió la ganancia del peso corporal, es decir, el peso corporal se mantuvo a lo largo del tratamiento. De manera interesante, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg, no modificaron la ganancia del peso corporal; es decir, ésta fue similar a los animales no tratados ¹¹. Acorde con los anteriores resultados, en este trabajo

utilizamos ratones machos de la cepa C57BL/6 los cuales fueron administrados dos veces por semana vía i.p. con 2.5, 5 y 20 mg de DEN/kg de peso corporal, durante seis, diez, catorce y dieciocho semanas. Observamos que, aunque las dosis bajas (2.5 y 5 mg/kg) disminuyeron el peso corporal de los animales comparado con los controles a las dieciocho semanas, no hubo variación en la tendencia de su incremento a lo largo del tiempo; mientras que, la dosis de 20 mg/kg impidió este incremento e indujo una tendencia a la disminución del peso corporal principalmente a las dieciocho semanas de su administración. Con esto podemos concluir que las dosis de 2.5 y 5 mg/kg de DEN no fueron lo suficientemente perjudiciales para provocar una disminución importante del peso corporal de los animales y que la dosis 20 mg/kg, aunque no permitió el incremento del peso corporal, ya que éste se mantuvo hasta el término del tratamiento comparado con su peso inicial. Esto indica que la DEN afecta su peso corporal durante el tiempo de exposición a este agente, ^{10 41}. La desnutrición o la sobrealimentación pueden perjudicar el equilibrio entre los agentes anti-oxidantes y pro-oxidantes, incluso llevando a una lesión hepática.

El desarrollo del CHC se lleva a cabo a través de un largo periodo (10 años o más), cursa por un proceso de inflamación crónica el cual conduce primeramente a la fibrosis y a la cirrosis, esto promueve eventualmente el establecimiento de esta enfermedad ⁴². Con el esquema de administración de DEN a diferentes dosis (2.5, 5, 10 y 20 mg/kg, dos veces por semana) podemos encontrar alteraciones hepáticas similares a las encontradas en un tumor temprano ya establecido, en un periodo de sólo 6 semanas. De esta manera, mediante análisis de H&E observamos que conforme se aumenta la dosis de la DEN, como se encuentra documentado, provoca alteraciones en la arquitectura hepática así como desarrollo de tumores ⁴¹.

Es así que la conformación histológica hepática de ratones tratados con las dosis de 2.5 y 5 mg/kg durante seis, catorce y dieciocho semanas, se ve alterada con la pérdida en la definición de los cordones de hepatocitos, de espacios sinusoidales y presencia de células inflamatorias, lo cual se hizo más evidente conforme se incrementó el tiempo de exposición a la DEN. Además, en los ratones tratados con DEN a 20 mg/kg, a partir de las diez semanas de tratamiento, observamos hepatocitos de gran tamaño, anisonucleosis, proliferación de células tipo colangiolar y la formación de lesiones pre-tumorales bien definidas a las dieciocho semanas, con estos resultados podemos concluir que el modelo de hepatocarcinogénesis experimental aquí propuesto, indujo alteraciones en la arquitectura hepática las cuales incrementaron conforme al aumento de la dosis y tiempo de exposición a la DEN. Los resultados indican de manera contundente que la administración durante dieciocho semanas con la dosis 20 mg/kg ocasionó la pérdida de la arquitectura del tejido hepático y la formación de lesiones pre-tumorales.

Al mismo tiempo, una acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular, da como resultado desequilibrio entre la deposición y la eliminación de proteínas como colágeno, laminina, elastina y fibronectina. Generando fibrosis hepática, esta es una respuesta ubicua de curación de heridas a una lesión aguda o crónica.⁴³ Las células hepáticas estrelladas, que están inactivas en ausencia de estímulos inflamatorios, se activan en respuesta a una lesión menor, que puede conducir a cicatrización fibrótica y eventualmente a cirrosis ⁴⁴. El daño a los hepatocitos ocasionado por la DEN desencadena la liberación de especies reactivas de oxígeno (EROS) y mediadores de la fibrosis que induce la activación de células estrelladas hepáticas, macrofagocitos estrellados y células endoteliales sinusoidales del hígado que son agentes centrales en el desarrollo de la fibrosis.⁴⁵ Para determinar el grado de lesión dentro de las células utilizamos la tinción Tricrómica de Masson, la cual

detecta en tonalidad azul la presencia de fibras de colágena en el parénquima celular⁴². Bajo el esquema de administración propuesto en el presente modelo de hepatocarcinogénesis experimental observamos que; las dosis de 2.5 y 5 mg/kg de DEN no alteraron la deposición de fibras de colágeno. Los septos de fibra se observaron en el parénquima hepático de los animales tratados con DEN 20 mg/kg a las dieciocho semanas. Estos resultados sugieren que, nuestro modelo de hepatocarcinogénesis experimental reproduce etapas tempranas del proceso de fibrosis, principalmente con la dosis de 20 mg/kg durante el tiempo de catorce y dieciocho semanas. Esta lesión hepática inicial da como resultado la apoptosis de las células del hepatocito con la generación de cuerpos apoptóticos, especies reactivas de oxígeno y la estimulación paracrina de las células estrelladas hepáticas⁴⁵.

Esta exposición constante a estímulos oxidantes ocasiona la pronta acumulación de EROS provocando el fenómeno de estrés oxidativo. Produciendo así alteraciones genéticas y epigenéticas con un papel central en la regulación de genes proinflamatorios, supresores de tumores y oncogenes involucrados en el desarrollo del CHC,⁴⁶ con la administración de la DEN a ratones de la cepa C57BL/6 se provoca el incremento de EROS lo cual culmina en hepatocarcinogénesis.

Para nosotros es importante entender el mecanismo de respuesta de la Nxn durante la hepatocarcinogénesis y asimismo dilucidar la respuesta del complejo proteico que forma con Pp2A durante la hepatocarcinogénesis. Y eventualmente tener contribuir al conocimiento de los mecanismos celulares de carcinogénesis en el hígado.

La Nxn es una proteína sensible al daño oxidativo,³³ fue encontrada en el núcleo celular y más tarde se demostró que existe también en el citoplasma celular, su translocación se debe al aumento exponencial de EROS, señalando de esta forma que su nivel proteico puede ser inducido por EROS²². Esta proteína se ha reportado

regulando vías moleculares tal es el caso de la vía Wnt en su estado reducido, bloqueando a Dvl en la señal de Wnt/ B catenina. Sin embargo, en ambientes ricos en EROS la Nxn se libera de Dvl, dando como resultado la activación de B-catenina, quedando libre de traducir los factores de transcripción TCF/LEF²². El aumento de las EROS y la respuesta de Nxn frente a la DEN se reportó en este trabajo. Mediante el análisis de WB encontramos una tendencia al incremento dosis-tiempo en la semana diez catorce y dieciocho con la dosis de 20 mg/kg respecto a las dosis más bajas y el grupo control. Adicionalmente, evaluamos la localización estructural mediante el análisis de IHQ y encontramos que la marca positiva se incrementó en el hígado de manera dosis dependiente y a las 18 semanas de administrar la DEN a 20 mg/kg, la localización de la marca para Nxn fue preferencialmente intranodular. Además, se apreció que la marca de Nxn fue tanto citoplasmática como nuclear; también, se observó un incremento de la marca nuclear a Nxn dependiente de la dosis de DEN. Esto llamó nuestra atención, por lo que decidimos determinar la compartimentalización de esta proteína en el citoplasma y en el núcleo a través de la separación del contenido proteico en esas fracciones celulares. Encontramos que para el caso de Nxn, las dosis 2.5 y 5 mg/kg provocaron una tendencia de disminución de la localización en la fracción citosólica a partir de las catorce semanas de administración de la DEN; sin embargo, la dosis de 20 mg/kg provocó una disminución significativa. En contraste, se observó que en la fracción nuclear el tratamiento de 20 mg/kg de DEN a partir de las catorce semanas indujo la translocación de Nxn al núcleo. Estos resultados coinciden con lo reportado en trabajos donde la DEN se utilizó como un poderoso agente carcinogénico. En esa investigación utilizaron dosis de 10 y 20 mg/kg de DEN y observaron una respuesta similar en la línea celular E47 tratadas con 500 μ M de DEN. De igual manera, nuestro análisis de IHQ demostró que la marca positiva para la Nxn incrementó a partir del

tratamiento de 5, 10 y 20 mg/kg de la DEN ²⁵. Además estos resultados son congruentes con un estudio realizado en un co-cultivo celular que incluye células estelares y células VL17A tratados con etanol y lipopolisacáridos (LPS) donde se observaron que estos hepatotóxicos inducen los niveles proteicos de la Nxn en comparación con sus respectivos controles ³⁴. Adicionalmente, este estudio extrajo proteína nuclear y citoplasmática para determinar la compartimentalización de la Nxn. Los resultados demostraron que los hepatotóxicos utilizados incrementaron significativamente la translocación nuclear de esta proteína comparada con el grupo control. Además, cuando transfectaron co-cultivos celulares con un vector para sobreexpresar la Nxn encontraron que la sobreexpresión de esta enzima, revirtió parcialmente el daño ocasionado por los hepatotóxicos, indicando que la Nxn, una enzima antioxidante, juega un papel central en la regulación del estrés oxidativo producido por el etanol y por los LPS. Así, nosotros proponemos que estos hepatotóxicos tienen un papel similar al de la DEN, ya que la naturaleza oxidante de este carcinógeno es ampliamente conocida. En nuestro modelo, la inducción de la Nxn por efecto de la DEN muy probablemente sea en respuesta a la necesidad del sistema biológico de contrarrestar los altos niveles de EROS producidos durante el metabolismo de DEN, especialmente en la dosis de 20 mg/kg de DEN.

Otra proteína relacionada con el proceso de carcinogénesis es la Pp2A. Debido a que interactúa con Nxn decidimos evaluar sus niveles proteicos en nuestro modelo. Encontramos un aumento en sus niveles proteicos y observamos que se encuentra dispersa en el tejido hepático principalmente en el citoplasma. Se ha reportado que esta proteína se encuentra incrementada en ratones VHC transgénicos administrados con DEN ³¹. Para confirmar nuestros hallazgos, evaluamos su localización mediante la extracción de la proteína nuclear y citoplasmática. En la fracción citoplasmática hubo un incremento en su localización inducida por la dosis

de 20 mg/kg de DEN a las dieciocho semanas. Sin embargo, en la fracción nuclear no se observó ningún cambio. Estos hallazgos son congruentes con lo reportado en muestras de pacientes con CHC donde señalan que la expresión de Pp2A fue consistentemente más elevada en el CHC que en el tejido no tumoral adyacente. Para validar los niveles proteicos y relevancia clínica de esta enzima, evaluaron su localización en muestras incluidas en parafina mediante la técnica de IHQ. El 62,6% de un total de 336 muestras mostraron alta inmunoreactividad citoplásmica/membrana para Pp2A ³⁶. De esta manera, el nivel elevado de Pp2A en nuestro modelo, correlaciona con los hallazgos reportados en muestras de pacientes con CHC ³⁶, lo que sugiere que nuestro modelo reproduce lo que ocurre en el ser humano y puede ser de utilidad para estudiar la cronología de la expresión de Pp2A durante el desarrollo del CHC inducido por la DEN con la finalidad de definir los mecanismos asociados a su alteración. Para esto, futuras investigaciones serán necesarias.

Como señalamos anteriormente la Nxn tiene la capacidad de realizar interacciones con otras proteínas ²². La variabilidad de las interacciones producidas por esta proteína es amplia y se ha descrito poca información acerca del tema, cabe mencionar que la Nxn se une a otras proteínas debido a su capacidad redox sensible ²². En este trabajo nos planteamos conocer la interacción del complejo proteico formado entre Nxn y Pp2A durante la hepatocarcinogénesis inducida por la DEN. Observamos con base en nuestros resultados que la DEN indujo un incremento significativo en la unión del complejo Nxn/Pp2A especialmente la dosis de 20 mg/kg, comparado con el control. Contrario a lo esperado, nuestros resultados demostraron que la proporción de unión del complejo incrementa. Esto se puede explicar debido a que la expresión de ambas proteínas fue inducida por la DEN, como resultado, el incremento de la expresión de ambas proteínas no sólo fue

suficiente para contrarrestar las EROS sino también, para incrementar su interacción. Con estos hallazgos podemos sugerir que determinados niveles de EROS también pueden incrementar la interacción de la Nxn, un fenómeno aún no reportado.

8. Conclusión

En conclusión, con el uso de un modelo de hepatocarcinogénesis experimental inducido por la DEN, hemos demostrado y confirmado el comportamiento de la Nxn, y hemos determinado la respuesta del complejo Nxn/ Pp2A ante los efectos hepatotóxicos de la DEN, por lo que concluimos lo siguiente: Las dosis seleccionadas y utilizadas de DEN para este proyecto (2.5, 5 y 20 mg/kg) provocaron distintas alteraciones en el tejido hepático, las cuales afectaron su arquitectura. Asimismo, demostramos que la DEN alteró la organización del parénquima hepático de una manera dosis dependiente; esas alteraciones fueron claramente visibles en los tejidos a partir de las seis, diez y catorce semanas de tratamiento con las dosis de 2.5, 5 mg/kg de DEN donde observamos una pérdida de la definición de los cordones hepáticos, pérdida de los espacios sinusoidales, y la presencia de células inflamatorias. Resaltando que a las dieciocho semanas de tratamiento con la dosis de 20mg/kg, se observa una mayor presencia de hepatocitos de gran tamaño, anisonucleosis y proliferación de tipo colangiolar, además de la formación de tumores y/o nódulos preneoplásicos. Determinamos el desarrollo de etapas tempranas de fibrosis. De igual forma, observamos el incremento dosis dependiente del nivel proteico de Nxn y Pp2A. Este incremento fue observado preferencialmente y con mayor intensidad en todos los tiempos administrados con la dosis de 20 mg/kg. La localización de Nxn como de Pp2A se observaron principalmente dentro de los tumores o nódulos preneoplásicos. Además, observamos que la DEN indujo la translocación de la Nxn al núcleo celular, a partir de la semana catorce y dieciocho de tratamiento en la dosis de 20 mg/kg. Para la proteína Pp2A se observó preferencialmente en el citoplasma celular a partir de las seis semanas de tratamiento. Asimismo, evaluamos el estatus del complejo proteico entre la Nxn y Pp2A y encontramos que su interacción es inducida e incrementada por la dosis de

20 mg/kg de la DEN en la semana dieciocho de tratamiento. Esto sugiere que el incremento en su interacción podría ser considerado una condición patológica durante la progresión del CHC.

9. Perspectivas

Con base en nuestros resultados, nuestras perspectivas son las siguientes:

El incremento de la interacción entre Nxn y Pp2A inducido por la DEN durante la hepatocarcinogénesis experimental: ¿es indicativo de una condición patológica irreversible en el CHC o del esfuerzo por contrarrestar el daño oxidativo en el microambiente celular hepático?

¿En etapas posteriores a las 18 semanas del desarrollo del CHC promovido por la DEN, el estatus de interacción entre Nxn y Pp2A cambia con la progresión de la enfermedad?

10. Bibliografía

1. Ha, H. L., Shin, H. J., Feitelson, M. A. & Yu, D. Y. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* **16**, 6035–6043 (2010).
2. Dalgleish, T. *et al.* [No Title]. *J. Exp. Psychol. Gen.* **136**, 23–42 (2007).
3. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics , 2018. **00**, (2018).
4. Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E. & Ferlay, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* **132**, 1133–1145 (2013).
5. Carr, B. *Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis B Virus. Hepatocellular Carcinoma* (2016). doi:DOI 10.1007/978-3-319-34214-6
6. He, L., Tian, D., Li, P. & He, X. <Mouse models of liver cancer Progress and recommendations.pdf>. **6**, (2015).
7. Glauert, H. P., Calfee-Mason, K., Stemm, D. N., Tharappel, J. C. & Spear, B. T. Dietary antioxidants in the prevention of hepatocarcinogenesis: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 875–896 (2010).
8. Santos, N. P. *et al.* Histology, bioenergetics and oxidative stress in mouse liver exposed to N-diethylnitrosamine. *In Vivo (Brooklyn)*. **26**, 921–930 (2012).
9. IARC. Xylene. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Humans, Re-Evaluation Some Org. Chem. Hydrazine Hydrog. Peroxide I* 1189–1208 (1999).
10. Schiffer, E. *et al.* Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* **41**, 307–314 (2005).
11. Alarcón Sanchez Brisa Rodope. Respuesta de la nucleorredoxina, una enzima redox sensible, a estímulos oxidantes patológicos y no patológicos en el hígado del ratón. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2017).
12. Sergio, F. H. Caracterización de un modelo de hepatocarcinogénesis en el ratón. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2018).
13. Fisher, A. B. Redox Signaling Across Cell Membranes. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1349–1356 (2009).
14. El-Serag, H. B. & Rudolph, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557–2576 (2007).
15. Erry, G. E. P., Aina, A. R. U. N. K. R., Unomura, A. K. N., Ataya, T. A. W. & Ayre, L. A. M. S. Hypothesis Paper HOW IMPORTANT IS OXIDATIVE DAMAGE ? LESSONS FROM ALZHEIMER ' S DISEASE. **28**, 831–834 (2000).
16. Choi, J. Mechanisms of Liver Injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* **290**, G847–G851 (2005).

17. Scott, T. L., Rangaswamy, S., Wicker, C. A. & Izumi, T. Repair of Oxidative DNA Damage and Cancer: Recent Progress in DNA Base Excision Repair. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 708–726 (2014).
18. Perez, C. F., Mukherjee, S. & Allen, P. D. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the HMG-CoA reductase gene. **185**, 179–185 (2003).
19. Zhang, J., Li, X., Han, X., Liu, R. & Fang, J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 794–808 (2017).
20. Hayashi, T. *et al.* Nucleoredoxin negatively regulates toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J. Biol. Chem.* **285**, 18586–18593 (2010).
21. Kurooka, H. *et al.* Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* **39**, 331–339 (1997).
22. Funato, Y. & Miki, H. Nucleoredoxin, a Novel Thioredoxin Family Member Involved in Cell Growth and Differentiation. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 1035–1058 (2007).
23. Fujino, G., Noguchi, T., Takeda, K. & Ichijo, H. Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 427–435 (2006).
24. Müller, L., Funato, Y., Miki, H. & Zimmermann, R. An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease. *FEBS Lett.* **585**, 596–600 (2011).
25. Martínez Aguilar Karla Esveidy. Respuesta de la Nucleorredoxina y del complejo que forma con Myd88 y Flii durante la hepatocarcinogénesis inducida con dietilnitrosamina. (Universidad Politécnica del Estado de Morelos, 2017).
26. Seshacharyulu, P., Pandey, P., Datta, K. & Batra, S. K. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* **335**, 9–18 (2013).
27. Lechward, K. *et al.* Interaction of nucleoredoxin with protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* **580**, 3631–3637 (2006).
28. Veerle, J. & Jozef, G. Protein phosphatase 2A: a high regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**, 417–439 (2001).
29. Chien, W. *et al.* Activation of protein phosphatase 2A tumor suppressor as potential treatment of pancreatic cancer. *Mol Oncol* **9**, 889–905 (2015).
30. Rincón, R. *et al.* PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget* **6**, (2015).

31. Duong, F. H. T. *et al.* Protein phosphatase 2A promotes hepatocellular carcinogenesis in the diethylnitrosamine mouse model through inhibition of p53. *Carcinogenesis* **35**, 114–122 (2014).
32. Kauko, O. & Westermarck, J. Non-genomic mechanisms of protein phosphatase 2A (PP2A) regulation in cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **96**, 157–164 (2018).
33. Funato, Y. & Miki, H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. *Free Radic. Res.* **44**, 379–388 (2010).
34. Arellanes-Robledo, J. *et al.* Ethanol targets nucleoredoxin/dishevelled interactions and stimulates phosphatidylinositol 4-phosphate production in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **156**, 135–146 (2018).
35. Mumby, M. PP2A: Unveiling a Reluctant Tumor Suppressor. *Cell* **130**, 21–24 (2007).
36. Gong, S. J. *et al.* Upregulation of PP2Ac predicts poor prognosis and contributes to aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **17**, 151–162 (2016).
37. Wang, X., Culotta, V. C. & Klee, C. B. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* **383**, 434–437 (1996).
38. L., B. & E.F., W. Mouse models for liver cancer. *Mol. Oncol.* **7**, 206–223 (2013).
39. M., C. & K., R. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. *Drug Des. Devel. Ther.* **8**, 1911–1922 (2014).
40. Goodman, J. & Lynch, H. Improving the International Agency for Research on Cancer's consideration of mechanistic evidence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **319**, 39–46 (2017).
41. Verna, L., Whysner, J. & Williams, G. M. N-Nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* **71**, 57–81 (1996).
42. Dhanasekaran, R., Bando, S. & Roberts, L. R. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research* **5**, 879 (2016).
43. Petitclerc, L., Sebastiani, G., Gilbert, G., Cloutier, G. & Tang, A. Liver fibrosis: Review of current imaging and MRI quantification techniques. *J. Magn. Reson. Imaging* **45**, 1276–1295 (2017).
44. Lee, U. E. & Friedman, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **25**, 195–206 (2011).
45. Sebastiani, G., Gkouvatsos, K. & Pantopoulos, K. Chronic hepatitis C and liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.* **20**, 11033–11053 (2014).

46. Neuzil, P. [*No Title*]. *Nucleic Acids Research* **34**, (2006).

11 . Anexos

Anexo 1.

Tris 1M, pH 6.8

Pesar 24.22g del reactivo Tris en 100ml de agua desionizada aproximadamente, ajustar el pH a 6.8 y aforar a 200ml, filtrar y esterilizar.

Anexo 2

Tris 1.5M, pH 8.8

Pesar 91g del reactivo Tris en 300ml de agua desionizada aproximadamente y ajustar el pH a 8.8 aforar a 200ml, filtrar y esterilizar.

Anexo 3

APS 10%, Amonuim persulfate (persulfato de amonio)

Pesar 0.1g de persulfato de amonio en 1ml de agua milliQ, Esta solución dura 2 semanas aproximadamente.

Anexo 4

Acrilamida

Pesar 54g del reactivo acrilamida más 2g del reactivo Bis-acrilamida en 100ml de agua para disolver los reactivos aforar a 200ml y filtrar por 0.45µm (Esta solución puede durar dos meses aproximadamente).

Anexo 5

Buffer de corrida 10x

Pesar los siguientes reactivos: 30g de Tris base, 144g de Glicina, 10g de SDS, todo esto disolverlos 300ml de agua desionizada, aforar a 1000ml homogenizar y guardarlo en un recipiente.

Nota: Para preparar buffer de corrida 1X y poder utilizarlo para correr el gel tienes que tomar 100ml del buffer de corrida 10x más 900ml de agua desionizada y tener un volumen final de 1L el cual se utilizará para correr tu gel de electroforesis.

Buffer de corrida 10x (BC 10x)	
Reactivo	Para 1L
Tris base	30 g
Glicina	144g
SDS*	10g

Tabla 1. Reactivos necesarios para preparar un litro de BC 10x

Anexo 6

Buffer de Transferencia 10x

Pesar los siguientes reactivos: 30.2g de Tris, 144.2g de Glicina, todo esto disolverlos 300ml de agua desionizada, aforar a 1000ml homogenizar y guardarlo en un recipiente.

Nota: Para preparar buffer de transferencia 1X y poder utilizarlo para transferir la electroforesis tienes que tomar 100ml del buffer de transferencia 10x más 900ml de agua desionizada y tener un volumen final de 1L el cual se utilizara para transferir tu gel de electroforesis.

Buffer de transferencia 10x (BT 10x)	
Reactivo	Para 1L
Tris-base	30.2 g
Glicina	144.2 g

Tabla 2. Reactivos necesarios para preparar un litro de BT 10x

Anexo 7

TBST 10x

Pesar los siguientes reactivos: 24.23 g de Trizma Base, 80.06g NaCl, disolver en 600ml de agua desionizada, y ajustar el pH a 7.6 con HCL, ya disuelto y ajustado el pH aforar a 1000ml.

Buffer-tris salino 10x (TBS 10x)	
Reactivo	Para 1L
Tris-HCl	24.23 g
NaCl	80.06 g

Tabla 3. Reactivos necesarios para preparar un litro de TBS 10x, todos los reactivos fueron disueltos en agua destilada.

Anexo 8

TBST 1x

Toma 100ml del TBST 10x con ayuda de una probeta y 900ml de agua desionizada, añadir 1000µl del reactivo Tween homogenizá bien para disolver y agregar a un frasco.

Anexo 9

PBS 10x

Pesar los siguientes reactivos: 80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂HPO₄, 2.4g KH₂PO₄, 1.33g CaCl₂·2H₂O, 1.0g MgCl₂·6H₂O, disolver en 600ml de agua desionizada y ajustar pH a 7.4, después aforar a 1000ml.

Nota: para la preparación de PBS 1x, toma 100ml de PBS10x y 900ml de agua desionizada homogeniza y agrégalo a un frasco.

Buffer-fosfato salino 10x (PBS 10x)	
Reactivo	Para 1L
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g

Tabla 4. Reactivos necesarios para preparar un litro de PBS 10x, todos los reactivos fueron disueltos en agua destilada.

Anexo 10

Buffer de lisis (IP-Buffer)

Preparación para 1L, pesar 15.76g de Tris-HCl pH 8 aforarlo a 100ml de agua destilada tomar 5ml de la solución, 100ml de NaCl 3M (solución líquida), 25ml de Glicerol al 10%, 2.5 ml de Nonidet P40 al 1% y 1ml de EDTA a 2mM, todo esto disolverlo en 100ml de agua destilada llevarlo a aforo con 900ml de agua destilada. Los inhibidores se le agregan en la preparación de extracción de proteína, que se menciona en el anexo 11.

Buffer de lisis no desnaturizante		
Reactivo	Concentración	Para 50 ml
Tris HCl pH 8 1M	20 mM	1 ml
NaCl 4M	120 mM	1.5 ml
EDTA 500mM	2 mM	0.2 ml
Substituto de nonidet-P40	10%	5 ml
Glicerol	1%	0.5 ml
Inhibidores		
PMSF (Fenil metil sulfonil) 100 mM	1 mM	0.5 ml
Na ₃ VO ₄ 200mM	2 mM	0.5 ml
PhosStop 20X	1X	2.5 ml
Complete Protease Inhibitor Cocktail 25X	1X	2 ml

Tabla 5. Reactivos necesarios para preparar buffer de lisis no desnaturizante.

Anexo 11

Inhibidores de Proteasas

- Complet (11697498001)
- Phostop (04906837001)
- Na₃VO₄ (S6508)
- PMSF (#329-98-6)

Anexo 12

5x laemmli's Sample Buffer – 10ml (Buffer de Carga)

3.0ml 1M Tris pH 6.8 a una concentración final de 60Mm, 0.5ml al 1% bromophenol blue a una concentración final de 0.01%, 5.0 ml al 100% de glicerol a una concentración final de 10%, 1.0g de SDS a una concentración final de 2%.

El β -Mercaptoethanol se agrega al momento de preparar el buffer para las proteínas en una relación como la siguiente:

85 μ l de Buffer de Carga + 15 μ l de β -Mercaptoethanol

Anexo 13

TP-Buffer (Buffer de Lisis)

Preparación de Soluciones como TRIS- HCl 10Mm con un pH de 7.4, tomar 200µl, tomar 500µl de NaCl a 150mM, tomar 100µl de Triton-X100 y aforarlo a 8200µl de agua destilada.

Anexo 14

Geles de acrilamida al 10%

Preparación del Primer gel como concentrado para un volumen de 10ml, 4ml de agua destilada o agua inyectable, 3.3 ml de Acrilamida, 2.5ml de Tris (pH 8.8), 100µl de SDS, 100µl de Persulfato-Amonio y 3µl de TEMED.

Preparación para el segundo gel como separador para un volumen de 10ml, 6.8 ml de agua destilada o agua inyectable, 1.7ml de acrilamida, 1.25ml de Tris (6.8), 1ml de SDS, 1 ml de Persulfato de Amonio y 10µl de TEMED

Gel desnaturalizante de poliacrilamida		
Reactivo	Para 20 ml	
Gel separador	10%	12%
Agua mili-Q	7.9 ml	6.6 ml
Acrilamida/bis-acrilamida mix 30%	6.7 ml	8 ml
Tris base pH 8.8 1.5 M	5 ml	5 ml
SDS (Sulfato duodecil de sodio)	0.2 ml	0.4 ml
APS (Persulfato de amonio)	0.2 ml	0.4 ml
TEMED (tetrametiletildiamina)	0.008 ml	0.016 ml
Gel concentrador		
Reactivo	Para 5 ml	
Agua mili-Q	4.1 ml	
Acrilamida/bis-acrilamida mix 30%	1 ml	
Tris base pH 6.8 1 M	0.75 ml	
SDS (Sulfato duodecil de sodio)	0.06 ml	
APS (Persulfato de amonio)	0.06 ml	
TEMED (tetrametiletildiamina)	0.006 ml	

Tabla 6 Lista de reactivos para realizar geles de poliacrilamida

Anexo 15

Solución de Bloqueo

1g de leche Svelty 0% grasa en 20ml de TBSt 1x

Anexo 16

Tris EDTA pH 9

Tris 1.21g, EDTA 0.37g, disolver en 1 litro de agua destilada, Ajustar pH 9.0 y agregar 0.5ml de tween 20.

Anexo 17

Protocolo de ABC

Se realizó la cuantificación para determinar cuanta proteína en μg se cargaría en cada pozo de la electroforesis, para esto se tomaron 20 μl de las proteínas obtenidas en la extracción de proteína total, tratadas con DEN a diferentes concentraciones.

Se realizó una dilución 1:10 para cada concentración. Los volúmenes de las diferentes diluciones se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Diluciones de las muestras con tratamiento DEN

Diluciones	μl de Proteina	μl de IP-Buffer
1:5	8 μl	32 μl
1:10	4 μl	36 μl
1:20	2 μl	38 μl
1:30	1 μl	39 μl

Para esta cuantificación se necesita las soluciones estándar que abarca de la A-I que se muestra en la tabla 3, estos contienen albumina a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, este servirá para evaluar cuanta concentración de proteína tiene cada dilución y el cambio de color que este mismo presenta.

La solución stock contiene albumina a diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Preparación de la curva estándar a partir de Albumina, (BSA, 2 µg/µl)

Vial	Volumen de Agua(µl)	Volumen de la solución Stock (BSA, 2µg/µl)	Concentración Final (µg/µl)
A	0	300 del stock	2
B	125	375 del stock	1.5
C	325	325 del stock	1
D	175	175 de la solución B	0.75
E	325	325 de la dilución C	0.5
F	325	325 de la dilución E	0.25
G	325	325 de la dilución F	0.125
H	400	100 de la dilución G	0.025
I	400	0	0=Blanco

Para la curva estándar se agregaron los siguientes valores que se muestran en la tabla volúmenes en µl para la curva estándar utilizando las soluciones Stock y el buffer.

Tubos marcados	Agua milli Q	Buffer	Solución Estándar
Tubo A	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo B	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo C	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo D	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo E	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo F	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo G	30 µl	10 µl	10 µl
Tubo H	30 µl	10 µl	10 µl

Tubo I	30 μ l	10 μ l	10 μ l
--------	------------	------------	------------

Nota: El buffer es el mismo buffer que se ocupó en la extracción de proteínas el IP-Buffer más inhibidor de proteasas

Y para las muestras se agregaron: 40 μ l de agua milliQ más 10 μ l de la muestra ya diluida.

Tabla 8. Preparación de muestras para la curva estándar.

Reactivos	Volumen (μ l)	Volumen x Duplicado (μ l)
Agua	20	40
Muestra	5	10

Cuando los tubos ya estaban listos con las concentraciones establecidas se agregaron 200 μ l de la solución preparada que se menciona más adelante:

Solución preparada: 3.4ml de ácido bicinónico, mas 68 μ l de sulfato de cobre, esta solución tiene que tomar un color verde pastel, después de la agregación de la solución preparada, se incubo por 30 minutos en la incubadora a 37°C, después de los 30 minutos se colocó en una placa de 96 pozos agregando 110 μ l a cada pozo de la muestra preparada, esto se hizo por duplicado, leyendo en un lector de placas Epsom a 562nm..

Anexo 18

Grupos	Abs1	Abs 2	Prom	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Factor dil	ug en alicota de 40 ul	más buffer carga 5X, ul	[ug/ul] en 50 ul	para 30ug tomar:ul	pra 40ug tomar:ul	para 100ug tomar:ul
D0E47-1	0.07	0.09	0.08	0.42	4.19	167.43	10.00	3.35	8.96	11.95	29.86
D0E47-2	0.06	0.07	0.06	0.33	3.25	130.06	10.00	2.60	11.53	15.38	38.44
D0E47-3	0.09	0.10	0.10	0.49	4.91	196.26	10.00	3.93	7.64	10.19	25.48
D50E47-1	0.08	0.09	0.09	0.44	4.37	174.91	10.00	3.50	8.58	11.43	28.59
D50E47-2	0.09	0.10	0.09	0.49	4.88	195.19	10.00	3.90	7.68	10.25	25.62
D50E47-3	0.08	0.10	0.09	0.48	4.80	191.99	10.00	3.84	7.81	10.42	26.04
D250E47-1	0.08	0.10	0.09	0.46	4.61	184.52	10.00	3.69	8.13	10.84	27.10
D250E47-2	0.07	0.05	0.06	0.30	3.04	121.52	10.00	2.43	12.34	16.46	41.15
D250E47-3	0.09	0.11	0.10	0.52	5.23	209.08	10.00	4.18	7.17	9.57	23.91
D500E47-1	0.07	0.09	0.08	0.41	4.11	164.23	10.00	3.28	9.13	12.18	30.45
D500E47-2	0.07	0.09	0.08	0.42	4.21	168.50	10.00	3.37	8.90	11.87	29.67
D500E47-3	0.11	0.12	0.12	0.60	6.00	240.04	10.00	4.80	6.25	8.33	20.83

Cuantificación de proteína total de la línea celular E47

Anexo 19

Se cortaron 100 g de hígado de ratón, este se conservó en hielo seco mientras se preparaba el IP-Buffer más los inhibidores, se tomó 5ml de IP-Buffer más 200 μl de Complete, más 250 μl de phostop, más 50 μl de PMSF y 50 μl de Na_3VO_4 , después de la preparación se agregó 1 ml por cada 100g de tejido y se homogenizó con ayuda de un homogeneizador GKH-GT

Anexo 20

Buffer de dilución (10ml)

Disolver 0.01g de BSA en 10 ml de PBS 1X

Anexo 21

Buffer de lavado(10ml)

En 9.696ml de PBS 1X agregar 304 μ l de triethanolamine

Anexo 22

Cross linking reagent (10ml)

Agregar 0.13gr de DMP en 8 ml de PBS1 X se ajusto el pH a 8.6 y se aforó a 10ml.

Anexo 23

Quenching buffer (50 ml) 50 mM ethanolamina

Disolver 155.85 μ l de etanolamina en 49.8442 de PBS 1X

Anexo 24

Solución stock

Tomar 1ml de cross linking y 1 ml de buffer de lavado

Anexo 25

Buffer A

Para preparar 250 ml de buffer A, agrego HEPES pH7.9 a una concentración final de 10 mM, KCL a una concentración de 10Mm ,EDTA a 0.1mM, EGTA a 0.1mM, se agregaron 200 μ l de Complete, más 250 μ l de phostop, más 50 μ l de PMSF , más 50 μ l de Na₃VO₄. y DTT 1mM

Anexo 25

Buffer B

Para preparar 250ml de buffer B agregar HEPES Ph 7.9 a una concentración final de 20mM, NaCl a una concentración de 0.4mM, EGTA 1mM, se agregó 200 μ l de Complete, más 250 μ l de phostop, más 50 μ l de PMSF más 50 μ l de Na₃VO₄ y DTT 1Mm.

12.Equipos utilizados

Lista de los equipos utilizados para la experimentación e investigación del proyecto, todos estos equipos se encuentran mencionados en la metodología.

Número	Equipo	Modelo	Empresa que lo fabrica
1	Agitador	MaxQ 2508	Barnstead Lab Line
2	Termoblock	Thermostat plus	Eppendorf MTP
3	Mini centrifuga	MiniSpin plus	Eppendorf
4	Agitador horizontal	Rocker 25.	Labnet International Inc.
5	Vortex	MaxiMix II 37600	Barnstead Thermolyne
6	Fotodocumentador	Mini HD6	Uvitec Cambridge
7	Homogeneizador	GKH-GT	Glas-col
8	Balanza analítica	AB204-S/FACT	Mettler Toledo S.A. de C.V.
9	Balanza analítica	PB1502-S/FACT	Mettler Toledo S.A. de C.V.
10	Agitador/parrilla	PC-420	Corning
11	Potenciómetro	pH 213 microprocesador	HANNA Instruments
12	Incubadora	CO2	Thermo electron
13	Centrifuga	Legend	Sorvall legend RT
14	Microscopio	T5100	Nikon
15	Campana de extracción	54192700	Fisher Hamilton
16	Cámara de electroforesis	Mini-protein tetra system	BIO-RAD

13 Lista de Reactivos ocupados en este proyecto de investigación

Nombre del Reactivo	Num. Catalogo	Num. Lote	Empresa
---------------------	---------------	-----------	---------

1	Agua Destilada Ultra Pura Libre de RNAsa, DNAasa	10977-015	463592	GIBCO
2	Buffer Carga Gel (RNAasa, no detectable)	G2526-5ML	SLBM3551V	sigma
3	Clarity Western ECL substrato Luminol/enhancer sol	T102030248	P10026378	BIO-RAD
4	Clarity Western ECL substrato Peroxide Solution	T102030246	P10026379	BIO-RAD
5	Hematoxilina de Mayer	MHS16-500ML	SLBM917V	SIGMA-ALDRICH
6	Medio de Montaje Cristal	C0612-30ML	095K1273	SIGMA
7	Nonident P40 BioXtra, mixture of 15 homologues	74385-1L	BCBH7751V	SIGMA
8	Triton X-100	A4975,0100	5W007433	Appli-Chem
9	Immobilon™ Western	WBKLS0500	1623502	Millipore
10	EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit	K4003	10093005	Dako
11	Liquid DAB+Substrate Chromogen System	K3468	10081849	Dako
12	2-Mercaptoetanol	63689	1177965	Fluka / SIGMA
13	Acetona Ultra Pura	300001	M5068	MP Biomedicals
14	Acido bicinconínico	B9643-1L	SHBD7101V	SIGMA
15	Alcohol Etilico 96% Desnaturalizado	5405-20L	TB0416163	MEYER
16	Glicerol Anhidro	A2926,1000	5Y007071	Appli-Chem
17	Hidróxido de Sodio Solución Ultra; 10M en agua	72068	1110645	Fluka / SIGMA
18	Metanol	32213-2,5L	SZBE3150V	SIGMA-ALDRICH
19	TEMED (N,N,'N'-tetrametil-etilendiamina)	161-0800	1019438	BIO-RAD
20	Tripan Azul, Solución	T8154-20ML	RNBF1569	SIGMA
21	Tween 20	M147-1L	1312C231	AMRESCO
22	N-Nitrosodiethylamine	N0756-250ML	049K1613V	SIGMA
23	Neomycin Solution	N1142-20ML	064M4797V	SIGMA
24	Trizma Base	T1503-1KG	041M5435V	SIGMA
25	Trizma Hidrocloridico mínimo 99%	T5941-1KG	015K5410	SIGMA
26	Acetato de Sodio			

27	Collagenase D	11088882001	15731425	Roche SIGMA
28	Thiazol Blue Tetrazolium Bromide	M2128-1G	MKBH7489 V	SIGMA
29	Trichloroacetic acid	T6399-250G	080M0057V	SIGMA
30	DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)	62247	OC1675284	Thermo Scientific
31	Acrilamida -BIS	IB70102	s/n	IBI SCIENTIFIC
32	Acrilamida -BIS Ultra Puro	0172-250G	1135B35	AMRESCO / VWR
33	Bromofenol Xileno Cianol, azul	B3269-5ML	052K9001	SIGMA
34	Bromofenol, azul	B0126-25G	34296HJ	SIGMA- ALDRICH
35	Fosfato de Amonio dihidrogenado 99,999%	204005-25G	13102EE	SIGMA- ALDRICH
36	Glicina	0167-1KG	1666C428	AMRESCO
37	Persulfato de Amonio	A3678-25G	MKBG3223 V	SIGMA
38	Sulfato de Cobre II Pentahidratado	209198-100G	MKBQ3212 V	SIGMA
39	Sulfato de Neomicina	N6386-25G	071M0117V	SIGMA
40	EDTA Sal Disódica (dihidratada)	H5032	226225	Promega
41	Xilol	2720-18L	1330-20-7	Meyer
42	Eosina	HT110132-1L	MO63103	SIGMA