



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Posgrado en Biología Experimental

**“Caracterización de los mecanismos de protección
inducidos por el HGF en un modelo murino de
colestasis experimental”**

T E S I S

para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Maricruz García Barrera

Matrícula: 2223803087

Correo: bioexpmaricruz@gmail.com

COMITÉ TUTORAL

Directora: **Dra. Leticia Bucio Ortiz**
Asesora: **Dra. Natalia Nuño Lámbarri**
Asesor: **Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

JURADO

Presidenta: **Dra. Verónica Souza Arroyo**
Secretaria: **Dra. Natalia Nuño Lámbarri**
Vocal: **Dr. Benjamín Pérez Aguilar**
Vocal: **Dr. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga**

Ciudad de México, 13 de noviembre del 2024

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: **840143**

Este trabajo estuvo apoyado por el proyecto CONACyT 166042 cuyo reponsable es la Doctora María Concepción Gutiérrez Ruíz y por el proyecto CONACyT 252942 a cargo del Doctor Luis Enrique Gómez Quiroz.

Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la tesis titulada “Caracterización de los mecanismos de protección inducidos por el HGF en un modelo murino de colestasis experimental”, que presentó **Maricruz García Barrera** con fecha de examen 13 de noviembre del 2024.



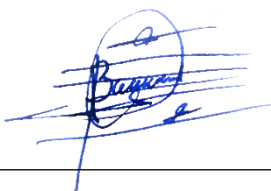
Presidenta: Dra. Verónica Souza Arroyo

Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX.



Secretaria: Dra. Natalia Nuño Lámbarri

Unidad de Investigación Traslacional, Fundación Clínica Médica Sur, CDMX.



Vocal: Dr. Benjamin Pérez Aguilar

Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX.



Vocal: Dr. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga

Depto. Ciencias de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa, CDMX.

Miembros del comité tutorial

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Leticia Bucio Ortiz

Investigador Nacional Nivel II

Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

lebo@xanum.uam.mx

ASESOR:

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Investigador Nacional Nivel III

Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana.

legq@xanum.uam.mx

ASESORA:

Dra. Natalia Nuño Lámbarri

Investigador Nacional Nivel II

Unidad de Investigación Traslacional,

Fundación Clínica Médica Sur

Ciudad de México, México

nnunol@medicasur.org.mx

DEDICATORIAS

A mi familia, al amor de mi vida y a mis amigos que nunca me dejan caer. **GRACIAS ETERNAS POR SER MI RAZÓN DE SEGUIR ♥.**

Dedicatoria especial a mi Princesa[†], Daniela[†], Carlitos[†], Luna y Tori.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todo el grupo del laboratorio en Medicina Experimental y Traslacional, y a los amigos que encontré en él. A todos, gracias por enseñarme no solo sobre ciencia, sino también sobre la vida misma.

Quisiera expresar también un profundo agradecimiento a la Mtra. Brenda, a la Dra. Lorena y al Dr. Lazzarini, por su apoyo incondicional, sus sabios consejos y por haber compartido generosamente su conocimiento conmigo. Su guía ha dejado en mí una huella invaluable.

RESUMEN

La colestasis es una patología hepática caracterizada por la acumulación de sales biliares, lo que provoca daño celular y respuestas inflamatorias. Este estudio investiga los mecanismos de protección hepática en un modelo murino de colestasis experimental, con el objetivo de identificar rutas de señalización que mitiguen el daño hepático. Los resultados indican que el HGF activa de manera significativa la vía MAPK/ERK 1/2. Este efecto hepatoprotector se validó mediante análisis histológicos que revelaron una notable reducción en el porcentaje de núcleos picnóticos y una disminución en la expansión del área sinusoidal, ambos indicadores de daño hepático. Además, se observó una mejora en el contenido de proteínas involucrados en la detoxificación, contribuyendo a un entorno redox más equilibrado en el hígado al disminuir las ROS. El estudio también evaluó el sistema de glutatión, donde se encontró un aumento en las enzimas antioxidantes, reforzando su papel en la protección contra el estrés colestásico. Finalmente, se sugiere que el HGF podría actuar como modulador del sistema inmune, al disminuir el reclutamiento de neutrófilos y favorecer la llegada de macrófagos antiinflamatorios M2 durante episodios de colestasis. En conclusión, HGF utiliza la vía de señalización de ERK 1/2 para favorecer la transcripción de proteínas involucradas en respuestas celulares como proliferación, respuesta antioxidante e inmunomodulación como mecanismo de protección a nivel hepático en una colestasis experimental, lo que abre la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades hepáticas colestásicas.

ABSTRACT

Cholestasis is a liver pathology characterized by the accumulation of bile salts, leading to cellular damage and inflammatory responses. This study investigates the mechanisms of liver protection in a murine model of experimental cholestasis, aiming to identify signaling pathways that mitigate hepatic injury. The results indicate that Hepatocyte Growth Factor (HGF) significantly activates the MAPK/ERK 1/2 pathway. This hepatoprotective effect was validated through histological analyses, revealing a notable reduction in the percentage of pyknotic nuclei and a decrease in sinusoidal area expansion, both markers of liver damage. Additionally, an improvement in the content of proteins involved in detoxification was observed, contributing to a more balanced hepatic redox environment by reducing reactive oxygen species. The study also evaluated the glutathione system, finding an increase in antioxidant enzymes, which reinforces its role in protection against cholestatic stress. Finally, it is suggested that HGF may act as an immune system modulator by decreasing neutrophil recruitment and promoting the presence of anti-inflammatory M2 macrophages during cholestasis episodes. In conclusion, HGF utilizes the ERK 1/2 signaling pathway to promote the transcription of proteins involved in cellular responses such as proliferation, antioxidant response, and immunomodulation as a protective mechanism at the hepatic level in experimental cholestasis. These findings open the possibility of developing therapeutic strategies for the treatment of cholestatic liver diseases.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Organización hepática	1
1.3 El canalículo biliar	2
1.4 Transportadores ABC	4
1.5 Enfermedad colestásica	5
1.6 α-Naftil-Isotiocianato y su mecanismo de daño	6
1.7 El Factor de Crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met (Vía HGF/c-Met)	7
2. Antecedentes	8
3. Pregunta de investigación	10
4. Justificación	10
5. Hipótesis	11
6. Objetivo General	11
7. Objetivos específicos	12
8. Material y métodos	12
8.1. Tratamientos en animales	12
8.2. Diseño experimental	13
8.3. Prueba de funcionalidad hepática	14
8.4. Análisis histológico	15
8.5. Western Blot	16
8.6. Lipoperoxidación	17
8.7. Inmunofluorescencia (IF)	18
8.8. Inmunohistoquímica (IHC)	19
8.9. Análisis estadístico	19
9. Resultados	20
10. Discusión	41
11. Conclusión	48
12. Referencias	49

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Lobulillo hepático como unidad funcional y la polaridad del hepatocito.....	3
--	---

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados.....	17
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental.....	14
Figura 2. Análisis macroscópico de la evaluación de daño en el hígado causado por ANIT.	21
Figura 3. Análisis Histológicos y pruebas bioquímicas de la evaluación de daño.	24
Figura 4. Análisis de los núcleos picnóticos y su respuesta celular.....	26
Figura 5. Análisis Histológicos de la evaluación de daño a nivel sinusoidal.....	28
Figura 6. Activación de la vía MAPK/ ERK 1/2 dependiente de tiempo.	30
Figura 7. HGF aumenta la proliferación en hígado con daño colestásico.....	32
Figura 8. HGF contrarresta la alteración en la homeostasis redox inducida por colestasis experimental.....	34
Figura 9. Efectos distintos del HGF de la respuesta antioxidante en el sistema de glutatión dependiente de tiempo.	36
Figura 10. HGF puede reducir la inflamación hepática inducida por ANIT al inhibir el reclutamiento de neutrófilos.....	38
Figura 11. HGF puede reducir la inflamación hepática inducida por ANIT al modular el reclutamiento de macrófagos anti-inflamatorios.....	40

1. Introducción

1.1 Generalidades

El hígado constituye aproximadamente entre el 2% y el 3% del peso corporal en un adulto promedio y una de sus características más importantes es que posee un sistema de doble irrigación sanguínea, que proviene un 75% de la vena porta y un 25% de la arteria hepática, lo que aporta un suministro adecuado en nutrientes y oxígeno (Kalra et al., 2024).

El hígado es considerado un órgano clave en nuestro organismo debido a que realiza numerosos procesos esenciales, tanto fisiológicos como metabólicos, vitales para mantener la homeostasis celular en los vertebrados, entre ellos la respuesta inmunológica, la biotransformación de xenobióticos, el procesamiento, regulación, distribución y metabolismo de los aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas, entre otros (Kalra et al., 2024; Shulpekova et al., 2022).

1.2 Organización hepática

Las múltiples funciones del hígado dependen de una intrincada organización tridimensional del tejido, en donde diferentes tipos celulares coexisten e interactúan de manera coordinada. Poseen una localización espacial precisa, lo que hace que cada célula sea esencial. A nivel macroscópico el lobulillo hepático es considerado la unidad fundamental, que incluye estructuras celulares y tisulares que se distribuyen entre la

vena central y la triada portal integrada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar (Martínez-Torres et al., 2024).

Es importante destacar que, la sangre que proviene del intestino, del páncreas y del bazo ingresa a través de la vena porta y posteriormente se mezcla con la sangre que llega por la arteria hepática. Posteriormente la sangre fluye hacia la vena central a través de una extensa red de un tipo único de lechos microvasculares llamados sinusoides (permeables debido a las fenestras que atraviesan el citoplasma), mientras la bilis es excretada a través de los canalículos biliares en dirección contraria (Gibert-Ramos et al., 2021; Martínez-Torres et al., 2024).

1.3 El canalículo biliar

Los hepatocitos son células epiteliales especializadas y constituyen aproximadamente el 85% del parénquima hepático (Olsavsky Goyak et al., 2010) y desempeñan un rol crucial al absorber, secretar o excretar simultáneamente diferentes tipos de moléculas (como carbohidratos, proteínas, lípidos, xenobióticos, entre otros), con el objetivo de mantener la homeostasis y mantener una composición sanguínea adecuada (Tocan et al., 2021; Trefts et al., 2017).

Los hepatocitos poseen una polarización múltiple en el hígado, con varios dominios apicales, estos dominios se organizan en dos regiones funcionales: el dominio basolateral, que está en contacto con células adyacentes o con los sinusoides; y el dominio apical, que constituye entre el 10% y el 15% de la superficie total de la célula

y que forma canálculos biliares para la secreción de bilis (Akhtar & Streuli, 2013; Boyer, 2013).

Por otra parte, la región de transición entre estos dominios, donde el dominio apical se encuentra con lumen y el basolateral se conecta con otras células y la matriz extracelular, está definida por las uniones estrechas. Estas estructuras están asociadas a los mecanismos responsables de la polarización apico-basal, un proceso que depende tanto de las señales de las interacciones célula-célula mediadas por cadherinas, como de la activación de integrinas inducida por la matriz extracelular (Bryant et al., 2014; Rodríguez-Boulan & Macara, 2014; Tocan et al., 2021).

Es relevante mencionar que el dominio apical está formado entre dos hepatocitos adyacentes cuyas membranas apicales contiguas representan la única barrera física entre la sangre y el canálculo biliar, lo que la convierte en un determinante crítico de la permeabilidad paracelular entre la sangre y la bilis (**Imagen 1**) (Anderson & Van Itallie, 1995; Boyer, 2013).

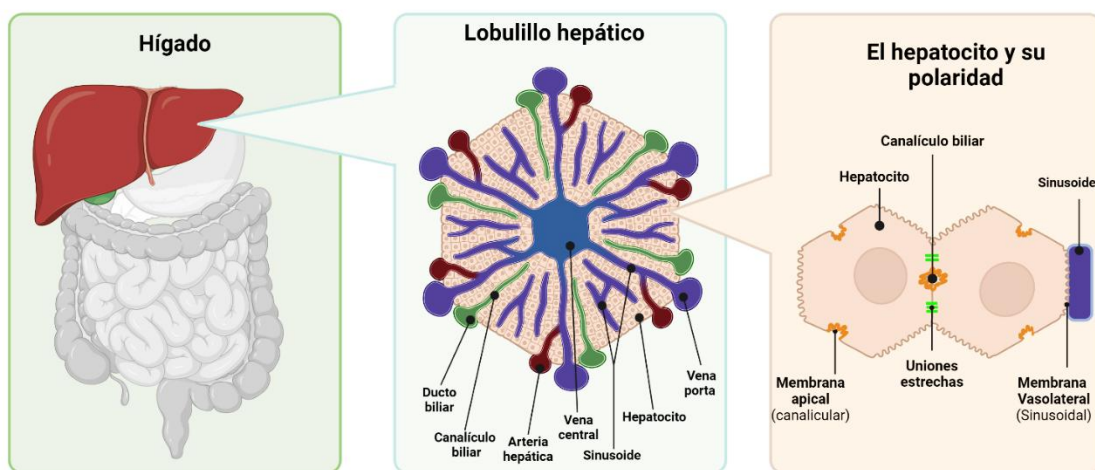


Imagen 1. Lobulillo hepático como unidad funcional y la polaridad del hepatocito.

Creado en BioRender.

1.4 Transportadores ABC

Entre las diversas biomoléculas sintetizadas por el hígado se encuentran los ácidos biliares, los cuales son derivados del colesterol. Los ácidos biliares tienen un papel fundamental al facilitar la absorción de nutrientes en el intestino y la secreción de colesterol en la bilis, lo que contribuye a mantener su homeostasis en el cuerpo (Chiang & Ferrell, 2018; Evangelakos et al., 2021; Nuño-Lámbarri et al., 2016).

Los ácidos biliares desempeñan un papel crítico en la eliminación de lípidos y xenobióticos en el hígado. El transporte de las sales biliares desde los hepatocitos hacia la bilis está regulado por la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette por sus siglas en inglés), que incluye la proteína 2 de resistencia a múltiples fármacos (Abcc2/Mrp2) y la proteína exportadora de sales biliares (Abcb11/Bsep) (Akita et al., 2001; Jedlitschky et al., 2006; Razori et al., 2020).

Una vez excretada al canalículo biliar mediante transportadores específicos, la bilis fluye a través del árbol biliar, en donde los colangiocitos desempeñan un papel clave en su modificación. Estas células epiteliales ajustan la composición de la bilis mediante la secreción de bicarbonato y otros componentes, lo que contribuye a su regulación y funcionalidad (Xia et al., 2006).

Posteriormente, la bilis se almacena en la vesícula biliar, donde se concentra hasta recibir un estímulo postprandial. Este estímulo, mediado principalmente por la hormona colecistocinina, provoca la contracción de la vesícula biliar y la liberación de su contenido hacia el duodeno. En este segmento inicial del intestino delgado, la bilis desempeña múltiples funciones esenciales para la digestión (Ticho et al., 2019).

1.5 Enfermedad colestásica

Si el equilibrio homeostático de bilis se rompe en el hígado, se desencadenan diversas hepatopatías (Piscaglia et al., 2010).

Las enfermedades hepáticas se caracterizan por la disfunción o alteración en las principales funciones del hígado, las cuales tienen una alta prevalencia a nivel mundial, siendo responsables de un gran número de fallecimientos anuales. Son tan recurrentes que cobran aproximadamente 2 millones de muertes al año en todo el mundo (Asrani et al., 2019). En México, las enfermedades hepáticas se encuentran entre las principales causas de mortalidad, y se estima que habrá un incremento significativo en el número de muertes por esta causa en los próximos 30 años, llegando a ser de casi dos millones. Por otro lado, la colestasis que se define como la reducción en la secreción y el flujo de bilis, ha sido identificada como un factor desencadenante en el desarrollo de diversas enfermedades hepáticas (Méndez-Sánchez et al., 2005; Onofrio & Hirschfield, 2020)

Esta patología puede clasificarse como “obstruktiva” si es causada por un bloqueo mecánico producido en las vías extra e intrahepáticas, o bien como “funcional” cuando se produce por alteraciones hepatobiliares o ductales en la formación de bilis (Onofrio & Hirschfield, 2020).

La colestasis intrahepática, es una condición caracterizada por la obstrucción parcial o total del flujo biliar debido a la disfunción de los transportadores de ácidos biliares

(Onofrio & Hirschfield, 2020). La colestasis intrahepática desencadena un proceso inflamatorio crónico y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el tejido hepático (Salas-Silva et al., 2020; Woolbright & Jaeschke, 2019; Zhang et al., 2018). Esto resulta en un daño tanto a los hepatocitos como a los colangiocitos y, de manera indirecta, afecta a otros órganos como el intestino (Juanola et al., 2021; Lopez-Ramirez et al., 2022), el páncreas (Santos et al., 2012) y los riñones (Salas-Silva et al., 2022; Somagutta et al., 2022).

En la colestasis causada por aumento de estrógenos, se ha reportado un aumento en la presencia de transportadores ABC, la proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos (Abcc4/Mrp4) y la proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos (Abcc32/Mrp3) (Alaei Faradonbeh et al., 2022; Ruiz et al., 2013), localizados en la membrana basolateral del hepatocito (Wagner & Trauner, 2005). Estos transportadores desempeñan la función de eliminar ácidos biliares y xenobióticos del hepatocito hacia la circulación sistémica, compensando así la disfunción y deslocalización de MRP2 y BSEP en la secreción biliar (Alaei Faradonbeh et al., 2022; Basiglio et al., 2021; Sohail et al., 2021). Esta respuesta compensatoria ayudaría a contrarrestar la acumulación de ácidos biliares y podría contribuir también a mitigar el daño hepático en una colestasis intrahepática.

1.6 α -Naftil-Isotiocianato y su mecanismo de daño

Un modelo muy utilizado para inducir colestasis intrahepática es la administración de α -Naftil-Isotiocianato (ANIT), el cual es un compuesto considerado hepatotóxico ya que genera daño en las células epiteliales biliares (Tanaka et al., 2009) y acumulación de

ácidos biliares en los hepatocitos (Wu et al., 2017). El ANIT se utiliza como agente químico para estudiar la patogénesis de la colestasis obstructiva debido a que favorece la infiltración de neutrófilos al parénquima hepático (Kodali et al., 2006), lo que conlleva a la producción exacerbada de ROS (Lopez-Ramirez et al., 2022).

El daño provocado por el exceso de ROS aumenta la muerte celular por necrosis y apoptosis, ocasionando la producción de “debris” que obstruyen los canalículos biliares, lo que favorece la retención de bilis. Como consecuencia, se genera el deterioro de la expresión y contenido de transportadores canaliculares de sales biliares, desarreglo de las uniones estrechas, y obstrucción biliar debido a la descamación de las células epiteliales del conducto biliar (Dahm et al., 2010; Greaves, 2012; Salas-Silva et al., 2021).

El daño hepático se asocia con la activación de mecanismos de reparación que involucran citocinas, incluyendo el factor de crecimiento transformante (TGF) (Thenappan et al., 2010), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Mariotti et al., 2021), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Zhao et al., 2020) y otros factores de crecimiento, como el HGF (Gomez-Quiroz et al., 2016; Sani et al., 2023).

1.7 El Factor de Crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met (Vía HGF/c-Met)

Clavijo-Cornejo et al., en 2013 reportó que el HGF regula la actividad de la enzima NADPH oxidasa (del inglés Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) en

las células hepáticas a través de un mecanismo de doble acción mediante su activación y la producción de ROS, para activar una señalización hepatoprotectora. A su vez, esta respuesta activa a la proteína quinasa C (PKC), promoviendo la activación del factor nuclear de eritrocitos 2 (Nrf2) y la expresión de proteínas implicadas en la respuesta antioxidante, así como también en la expresión de transportadores implicados en las reacciones de detoxificación de fase II (Clavijo-Cornejo et al., 2013; Gomez-Quiroz et al., 2016; Salas-Silva et al., 2020). Hasta ahora no se conoce cómo es este mecanismo de protección en un modelo *in vivo*.

Los efectos fisiológicos de la administración del HGF en un modelo colestásico intrahepático incluyen la modulación de las ROS, la supresión de la muerte celular y la reducción de la respuesta inflamatoria. Estos efectos promueven la restauración de la arquitectura celular en los tejidos hepáticos (Salas-Silva et al., 2020), intestinales (Lopez-Ramirez et al., 2022) y renales (Salas-Silva et al., 2022). Sin embargo, aún no se ha dilucidado completamente la vía de señalización a través de respuestas compensatorias mediante la cual este factor de crecimiento activa y produce su efecto protector para revertir el daño tisular.

2. Antecedentes

Se ha propuesto al factor de transcripción Nrf2 como una pieza central en la respuesta adaptativa del hígado ante el estrés oxidante y la colestasis, debido a que induce la expresión de enzimas y transportadores hepáticos como: GST, MRP2, MRP3, y MRP4, que están involucrados en la desintoxicación y el transporte de metabolitos y productos

químicos (Basiglio et al., 2021; Okada et al., 2009; Salas-Silva et al., 2020). Esto incluye la excreción de sales biliares y componentes conjugados con glutatión, lo cual es esencial para contrarrestar los efectos dañinos de la acumulación de sales biliares en la colestasis.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la activación de Nrf2 está mediada por la señalización del HGF y su receptor c-Met (Gomez-Quiroz et al., 2016). Clavijo-Cornejo et al. (2013) demostraron que la actividad de la NADPH oxidasa y la fosforilación de Nrf2 mediada por PKC δ son parte importante de los mecanismos implicados en la activación de Nrf2, mediando el aumento de la expresión de enzimas y proteínas antioxidantes, incluyendo blancos de Nrf2 como NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1 (NQO1), Glutatión (GSH) y gamma-glutamylcisteína sintetasa (γ -GCS). La señalización de HGF/c-Met es importante para la reparación tisular en un daño por colestasis; ya que ratones deficientes en c-Met son más susceptibles al daño hepatocelular y la fibrosis inducida por la obstrucción del conducto biliar (Gomez-Quiroz et al., 2016; Simoni-Nieves et al., 2021).

Otros estudios fuera y dentro de nuestro grupo revelaron el papel crítico de las proteínas β -catenina y ZO-1 en la fisiología biliar, ya que su pérdida específica en el hígado conduce a una morfología defectuosa del canalículo biliar, defectos en la secreción biliar y colestasis intrahepática. Además, la alteración de la integridad estructural y el buen funcionamiento del canalículo biliar también se asocia con la señalización de HGF/c-Met (Salas-Silva et al., 2020; Yeh et al., 2010).

Es importante destacar que las enfermedades colestásicas no solo afectan al hígado, sino que también tienen implicaciones en otros órganos. La acumulación de ácidos biliares debido a la colestasis puede afectar el epitelio renal (Salas-Silva et al., 2022), la permeabilidad intestinal (Lopez-Ramirez et al., 2022) y la morfología del páncreas.

3. Pregunta de investigación

¿Cuál es la vía de señalización específica mediante la cual el factor de crecimiento hepático (HGF) activa la regulación del estado redox y las reacciones de detoxificación de fase II durante la colestasis inducida por ANIT?

4. Justificación

Las colangiopatías colestásicas se caracterizan por una disfunción primaria de los conductos biliares, ya sea de naturaleza funcional u obstructiva. Estas enfermedades implican la presencia de eventos oxidantes que afectan principalmente a los transportadores presentes en la membrana de los hepatocitos, lo que resulta en una disminución del flujo de bilis.

México enfrenta desafíos específicos en términos de salud hepática, como la alta prevalencia de enfermedades como la hepatitis viral y la obesidad, que pueden

contribuir al desarrollo de la colestasis. La identificación de los mecanismos subyacentes y la caracterización de las vías de señalización involucradas en la colestasis son cruciales para el desarrollo de enfoques terapéuticos más efectivos y específicos para esta enfermedad.

En la actualidad, no se dispone de un tratamiento efectivo para estas patologías debido a la falta de comprensión de su origen y desarrollo. Por tanto, resulta imprescindible llevar a cabo estudios experimentales para profundizar en dicho conocimiento y así, abrir nuevas posibilidades terapéuticas para abordar estas enfermedades.

5. Hipótesis

El HGF inducirá una respuesta anticoléstatica mediada por la activación de Nrf2 en la regulación del estado redox celular, la expresión y la localización de transportadores de la familia ABC en un modelo experimental de colestasis en roedores.

6. Objetivo General

Caracterizar los mecanismos de protección inducidos por el HGF en la colestasis experimental.

7. Objetivos específicos

1. Identificar la ruta de señalización que despliega el HGF en el hígado para disminuir el daño colestásico inducido por el ANIT.
2. Determinar el estado de la regulación redox y de reacciones de detoxificación de la fase II inducida por el HGF, controladas por el factor de transcripción Nrf2 en la colestasis inducida por ANIT.
3. Determinar los efectos a nivel del sistema de glutatión y de la regulación de la expresión, contenido y la localización de transportadores de sales biliares inducido por la regulación activada por el HGF.

8. Material y métodos

8.1. Tratamientos en animales

Sesenta y cuatro ratones macho de la cepa CD1, con edades comprendidas entre las 8 y 10 semanas (procedentes de UPEAL, UAM Xochimilco, Ciudad de México), fueron alojados en las instalaciones destinadas a la experimentación animal del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. La cohorte experimental se dividió en dieciséis grupos homogéneos, cada uno compuesto por al menos 4 individuos.

Los murinos fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas, en instalaciones exentas de agentes patógenos, con una temperatura constante y un fotoperiodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad. El cuidado y manejo de los sujetos

experimentales se llevó a cabo siguiendo las directrices éticas establecidas por la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH) y de conformidad con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

8.2. Diseño experimental

Se emplearon ratones de la cepa CD1, con una edad comprendida entre 8 y 10 semanas; Los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en 4 grupos experimentales: 1) grupo de control no tratados (NT), 2) grupo tratado con ANIT por vía intragástrica con una dosis de 60 mg/kg (Sigma Aldrich, USA, #N4525), 3) grupo tratado con ANIT+HGF, donde se administró HGF con una dosis de 10 µg/kg por vía intravenosa y 24 h después de la administración del ANIT, y 4) grupo control tratado únicamente con HGF (Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA, #100-39). Los ratones se sacrificaron a las 30 h, 36 h y 48 h después de iniciar el tratamiento para la obtención de tejido hepático y suero (**Figura 1**).

Se recolectó suero sanguíneo de los animales para realizar pruebas de funcionalidad hepática como AST, ALT, ALP y bilirrubina total, así como tejido hepático para realizar: pruebas de funcionalidad hepática, análisis histológico, ensayo de lipoperoxidación (TBARS) y Western blot.

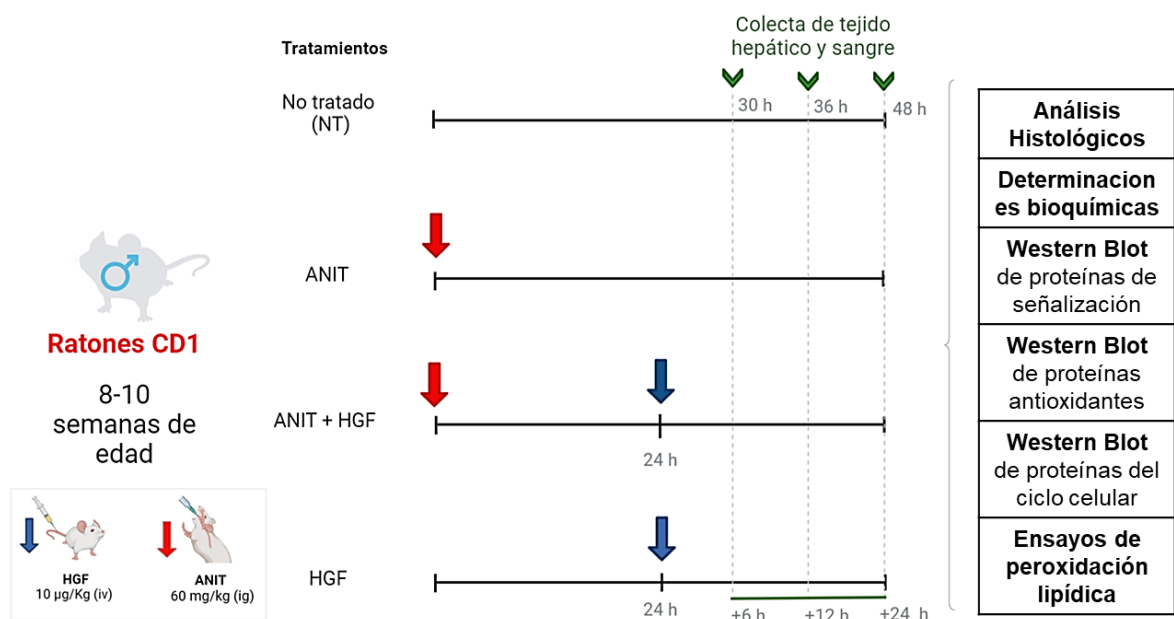


Figura 1. Diseño experimental

Los ratones de la cepa CD1 machos de 8-10 semanas de edad fueron divididos aleatoriamente a 4 grupos experimentales: 1) grupo de control no tratado (NT), 2) grupo tratado con α -Naftil-Isotiocianato (ANIT) por vía intragástrica a una dosis de 60 mg/kg, 3) grupo tratado con ANIT+HGF, donde se administró HGF (Factor de crecimiento de hepatocitos) a una dosis de 10 µg/kg por vía intravenosa 24 h después de la administración de ANIT, y 4) grupo control tratado únicamente con HGF. Los ratones se sacrificaron a las 30 h, 36 h y 48 h después de iniciar el tratamiento para la obtención de tejido hepático y suero. Las muestras recolectadas se utilizaron para llevar a cabo pruebas bioquímicas, Western blot (WB) de proteínas involucradas en la señalización celular, la respuesta antioxidante y ciclo celular. Por último, se evaluó el estado redox a través de ensayos de peroxidación lipídica y ensayos de glutatión.

8.3. Prueba de funcionalidad hepática

Se llevaron a cabo pruebas de funcionalidad hepática con el propósito de evaluar y medir el estado y la capacidad de funcionamiento del hígado en cada uno de los tratamientos. Para ello se anestesiaron a los ratones mediante la administración intraperitoneal de avertina (2,2,2-tribromoetanol) (Sigma, EUA). Al momento de la eutanasia, con el fin de obtener el suero sanguíneo, se recolectó la sangre de la vena cava superior y se centrifugó a 1,600 g durante 10 min a una temperatura de 4°C. Para

la determinación de los marcadores de daño hepático como: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y bilirrubina; Se utilizaron tiras reactivas comerciales (Roche, Alemania, #77188). Los análisis se hicieron mediante el SpotChem EZ (ARKRAY, USA Clinical Diagnostics).

8.4. Análisis histológico

Con el objetivo de observar los cambios e identificación de características en la forma y la estructura celular de nuestras muestras de tejido las preparaciones histológicas se realizaron mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E).

Primero se realizaron cortes histológicos en microtomo de muestras inmersas en parafina y posteriormente las muestras de tejido hepático se calentaron una 1 h a 58°C. De forma subsecuente fueron despafinadas durante 10min en xilol, seguido de un proceso gradual de hidratación en alcoholes con concentraciones decrecientes, desde 100% hasta 70%, durante 5 min cada uno, seguido de un periodo de 5 min en agua.

Luego, las secciones fueron sometidas a la tinción con hematoxilina de Harris durante 5 min, seguido por un lavado de 5 min en agua. A continuación, las secciones fueron sumergidas en una solución de HCl-EtOH al 96% hasta que se evidenció un cambio a un color rojizo. Posteriormente, fueron sumergidas en agua amoniacal (200 ml de agua destilada con 3-4 gotas de amoníaco) hasta que se observó un cambio a un color azul. Después, se llevó a cabo un nuevo lavado con agua corriente durante 2 min, seguido

de otro lavado con agua destilada durante 2 min. Posteriormente, los portaobjetos fueron sumergidos en eosina alcohólica durante 2 min.

Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en una solución de etanol con concentraciones progresivamente crecientes, desde etanol al 70% hasta etanol absoluto, seguido por xilol durante 1 min. Para concluir, se usó medio de inclusión Entellan.

8.5. Western Blot

Con el propósito de cumplir con el objetivo de caracterizar la vía de señalización inducida por la interacción de HGF con su receptor c-Met, se realizaron análisis de western blot siguiendo el protocolo anteriormente reportado (Salas-Silva et al., 2020). Para este análisis se emplearon anticuerpos específicos, tales como anti-p-ERK, anti-ERK, anti-p-AKT, anti-AKT, anti-p-PKC δ , y anti-PKCpan. Por otro lado, con el fin de determinar el estado de los efectos a nivel del sistema antioxidante, se evaluaron proteínas tales como Glutación S-transferasa Mu (GSTM), gama-glutamylcisteina sintasa (γ -GCS) y Glutación peroxidasa 1-6 (GPx 1-4). Por último, para determinar la proliferación celular en los tratamientos se realizó la evaluación de la Ciclina D1 y A, así como sus CDKs reguladoras (Cdk4 y Cdk6); también evaluamos proteínas como p21 y p27 los cuales son inhibidores universales de CDKs. La expresión de las proteínas se normalizó con β -actina en cada una de las membranas. Todos los anticuerpos utilizados en este estudio se registraron en la **Tabla 1**. Las imágenes se obtuvieron imágenes en un fotodocumentador GelLogic 1500 (Biostad, E.U).

Anticuerpo	Catálogo	Marca	Dilución
p44/42 MAPK (Erk 1/2)	4695T	Cell Signaling	1:1000
p-p44/42 MAPK (T202/Y204)	9101S	Cell Signaling	1:1000
p- PKC δ Thr 505	9374 S	Cell Signaling	1:1000
PKC-pan	4502356	Merck	1:1000
p-AKT Ser 473	9271 S	Cell Signaling	1:1000
AKT	9272 S	Cell Signaling	1:1000
PP2A	2038 S	Cell Signaling	1:1000
GSTM	sc- 292368	Santa Cruz	1:250
GSTM2	sc- 376486	Santa Cruz	1:250
GPx 1/2	sc- 133160	Santa Cruz	1:250
GPx 4	sc-166570	Santa Cruz	1:250
γ -GCS	sc- 22755	Santa Cruz	1:250
Cyclin D1	sc- 753	Santa Cruz	1:250
Cyclin A	sc- 271682	Santa Cruz	1:250
Cdk 4	sc- 749	Santa Cruz	1:250
Cdk 6	sc- 7181	Santa Cruz	1:250
p27	sc- 776	Santa Cruz	1:250
p21	sc- 6246	Santa Cruz	1:250
Aurora A	4718 S	Cell Signaling	1:1000
Goat pAb anti Rabbit	Ab-6721	Abcam	1:10,000
Rabbit to Mouse	Ab-6728	Abcam	1:10,000
Anti- β -actina monoclonal	A 2060	Sigma	1:10,000

Tabla 1. Anticuerpos utilizados

Lista de anticuerpos utilizados para la evaluación de la activación de las rutas de señalización de interés (AKT y ERK1/2), sistema de glutatión y análisis de proliferación a través de evacuación del ciclo celular y contenido proteico.

8.6. Lipoperoxidación

Se realizaron ensayos de TBARS (Sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés) para estimar el daño oxidante en las membranas celulares y utilizarlo como un indicador indirecto de estrés oxidante. La medición de la peroxidación lipídica se llevó a cabo mediante la detección de la generación de productos reactivos al ácido

tiobarbitúrico (TBARS) utilizando un método espectrofotométrico a una longitud de onda específica de 573 nm.

8.7. Inmunofluorescencia (IF)

La detección de la proteína Mieloperoxidasa (MPO), marcador de neutrófilos, se realizó a partir de cortes histológicos de tejido hepático de ratones, previamente embebidos en parafina. Para iniciar, los cortes fueron calentados a 60 °C durante 5 min y luego pasados por una serie de baños de xilol e isopropanol para eliminar la parafina y rehidratar el tejido. La recuperación antigénica se realizó mediante inmersión de las muestras en un buffer de citratos durante 1 h en baño maría, y luego se permeabilizó el tejido usando Triton X-100 al 0.1% en PBS por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos mediante incubación con suero de cabra o suero fetal bovino al 5% en PBS durante 30 min. Tras el bloqueo, las muestras se incubaron a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario MPO (dilución: 1:200, #GTX54393). Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS frío para eliminar el exceso de anticuerpos; en caso de ser necesario, el anticuerpo secundario Alexa 594 (dilución: 1:300, #sc-516608) fue incubado durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, se hicieron tres lavados adicionales de 10 min en PBS y se agregó medio de montaje con DAPI (#H-1200 Vector Laboratories, EE. UU.). Las fotos fueron tomadas con un microscopio invertido Carl Zeiss 780 LSM-NLO (Gena, Alemania).

8.8. Inmunohistoquímica (IHC)

Se realizaron pruebas inmunohistoquímicas para analizar el contenido y la localización del marcador de macrófagos antiinflamatorios CD163 en el tejido hepático afectado por colestasis inducida por ANIT.

Cada muestra de tejido hepático de ratón se fijó en formaldehído al 4% y se incluyó en bloques de parafina. Los cortes de tejido se realizaron con un grosor de 5 μ m y posteriormente se desparafinaron y rehidrataron mediante una serie de diluciones de etanol del 100% al 70%, seguido de agua destilada. Se procedió con la recuperación de antígenos y la inhibición de la peroxidasa endógena. Luego, los cortes se incuyeron con el anticuerpo primario anti-CD163 (dilución 1:200) a 4°C durante toda la noche. La detección de la señal se llevó a cabo el Kit de detección (#ab64264 Abcam, US). y el contraste final se realizó de los núcleos se realizó con hematoxilina (#06522 Sigma-Aldrich, Alemania).

8.9. Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) y se obtuvieron a partir de un mínimo de 4 animales individuales. Cada experimento se repitió al menos tres veces. Para comparar las medias entre los diferentes grupos, se aplicaron un análisis de varianza (ANOVA), seguido de pruebas de comparaciones múltiples utilizando la prueba de Tukey. Se utilizará el software Graph Pad Prism versión 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) para Windows. Se consideró un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

9. Resultados

Se validó nuestro modelo experimental de colestasis intrahepática inducida por ANIT, el cuál ha sido reportado ampliamente por nuestro grupo (Lopez-Ramirez et al., 2022; Salas-Silva et al., 2020). En los ratones que fueron tratados desde las 30 h (**Figura 2**), se observó una vista general de la cavidad abdominal en todos los tratamientos (**Figura 2A**). Se realizó un acercamiento al hígado y la vesícula biliar los cuales presentaron cambios en su coloración, donde el hígado mostró una coloración pardo-rojizo y hepatomegalia (**Figura 2B-C**) en los tratamientos de ANIT. Estos efectos se ven reestablecidos con el tratamiento de HGF. Por su parte observamos que los animales del grupo de ANIT+HGF y los ratones de los grupos NT muestran similitudes en cuestión de morfología (**Figura 2B**).

Por otro lado, se pudo observar que pasadas las 36 h de iniciado el tratamiento los hígados de los ratones tratados con ANIT conservaron los cambios morfológicos de daño descritos anteriormente, al mismo tiempo que el co-tratamiento (ANIT+HGF) mostraba el mismo patrón caracterizado por cambio en su coloración y hepatomegalia, así mismo, la vesícula presentó una coloración verde oscura en éstos, lo cual indica una mayor concentración de bilis (**Figura 2D-E**), así como una enteritis (**Figura 2**).

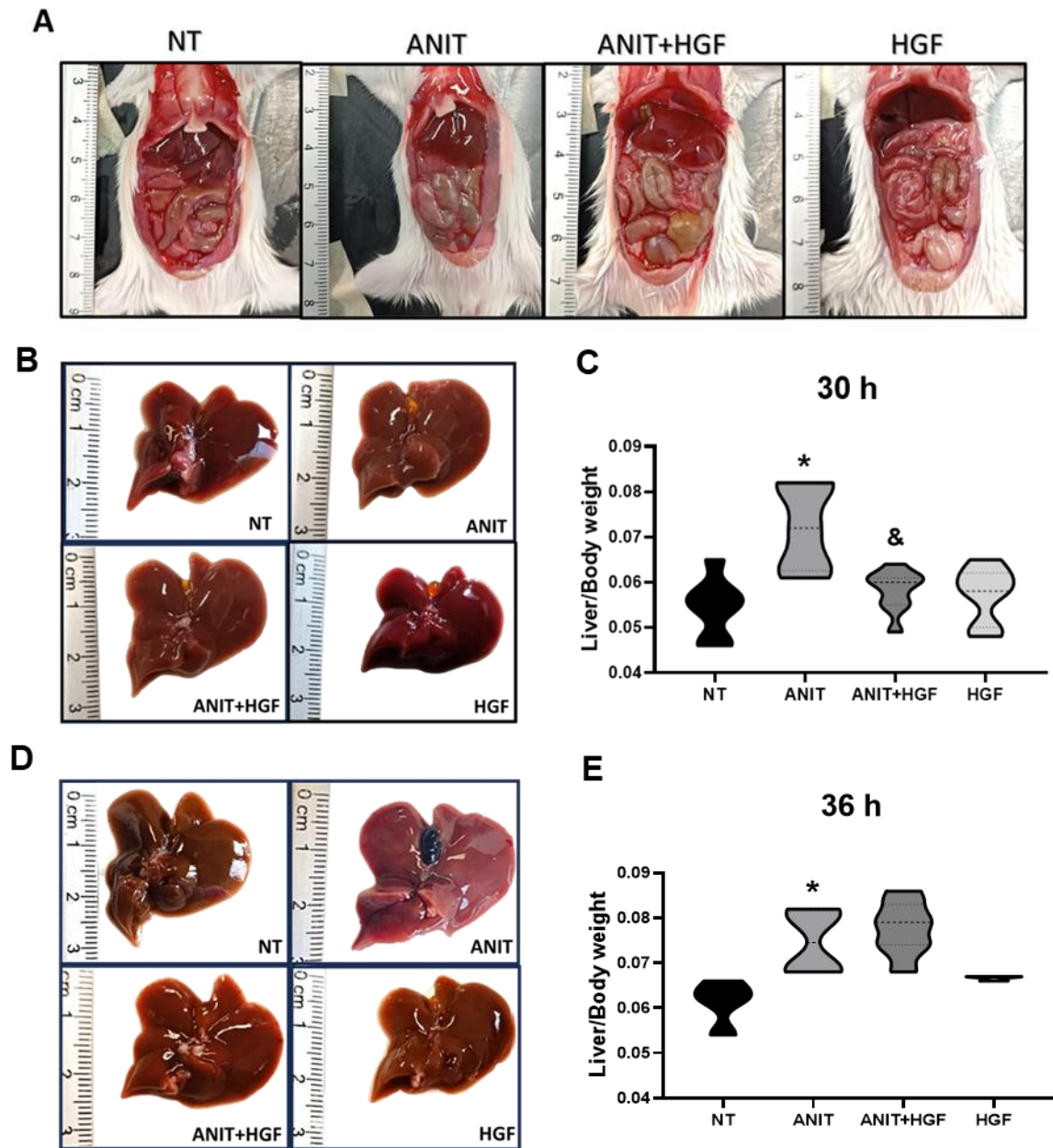


Figura 2. Análisis macroscópico de la evaluación de daño en el hígado causado por ANIT.

(A) Vista sistémica de la cavidad abdominal de ratones de la cepa CD1 de 30 h. (B y D) Cambios macroscópico a nivel hepático y de la vesícula biliar donde se observa cambios en su coloración a 30 h y 36 h. C y E) Relación peso del hígado-peso corporal a 30 h y 36 h. No tratado (NT), α -Naftil-Isotiocianato (ANIT), α -Naftil-Isotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las imágenes son representativas de al menos 5 animales experimentales. Cada grupo representa la mediana $\pm$ SEM en al menos cuatro ratones diferentes, * $p < 0.05$ vs NT, & $p < 0.05$ vs ANIT.

Para seguir evaluando el daño a nivel histológico se realizaron tinciones de H&E (**Figura 3A**), las cuales mostraron que el tejido de los ratones a las 30 h no tenían cambios significativos, ya que no se pudo observar ninguna zona necrótica ni inflamación. Esto cambió al analizar el grupo de ANIT+HGF de 36 h ya que éste presentó un menor número y tamaño de zonas necróticas, así como un menor número de infiltrado inflamatorio que rodea éstas zonas comparado con el grupo de ANIT a las 36 h. Por otra parte se puede observar que en el tiempo de 48 h la arquitectura del parénquima hepático se recuperó a niveles normales del daño favorecido por la administración de ANIT.

Con el objetivo de confirmar el desarrollo de la enfermedad colestásica, se midieron los niveles séricos de marcadores bioquímicos de función hepática a las 30 y 36 h después del inicio del tratamiento (**Figura 3B-C**). Los marcadores bioquímicos analizados incluyen alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y la fosfatasa alcalina (ALP), indicadores clave de daño hepatocelular y colangiocelular.

A las 30 h, se observó un aumento significativo de éstos marcadores en el grupo tratado con ANIT en comparación con el grupo control, lo cual refleja un compromiso significativo en la función hepática general. No obstante, en los ratones que recibieron el tratamiento con ANIT+HGF mostraron marcadores bioquímicos estadísticamente iguales a los niveles basales, lo que sugiere un efecto hepatoprotector del HGF. De manera similar, las transaminasas del grupo de HGF y NT no mostraron diferencias significativas (**Figura 3B**).

A las 36 h, los niveles de daño hepatocelular en los grupos de cotratamiento (ANIT+HGF) fueron comparables a los del grupo tratado solo con el ANIT, lo que indica que, aunque el HGF parece ofrecer cierta protección inicial, el daño inducido por ANIT prevalece en ese punto, superando la capacidad de reparación del tratamiento (**Figura 3C**). Este resultado es estadísticamente significativo, lo que sugiere que el nivel de daño colestásico causado por ANIT es lo suficientemente elevado como para limitar la eficiencia del HGF en etapas avanzadas del proceso patológico.

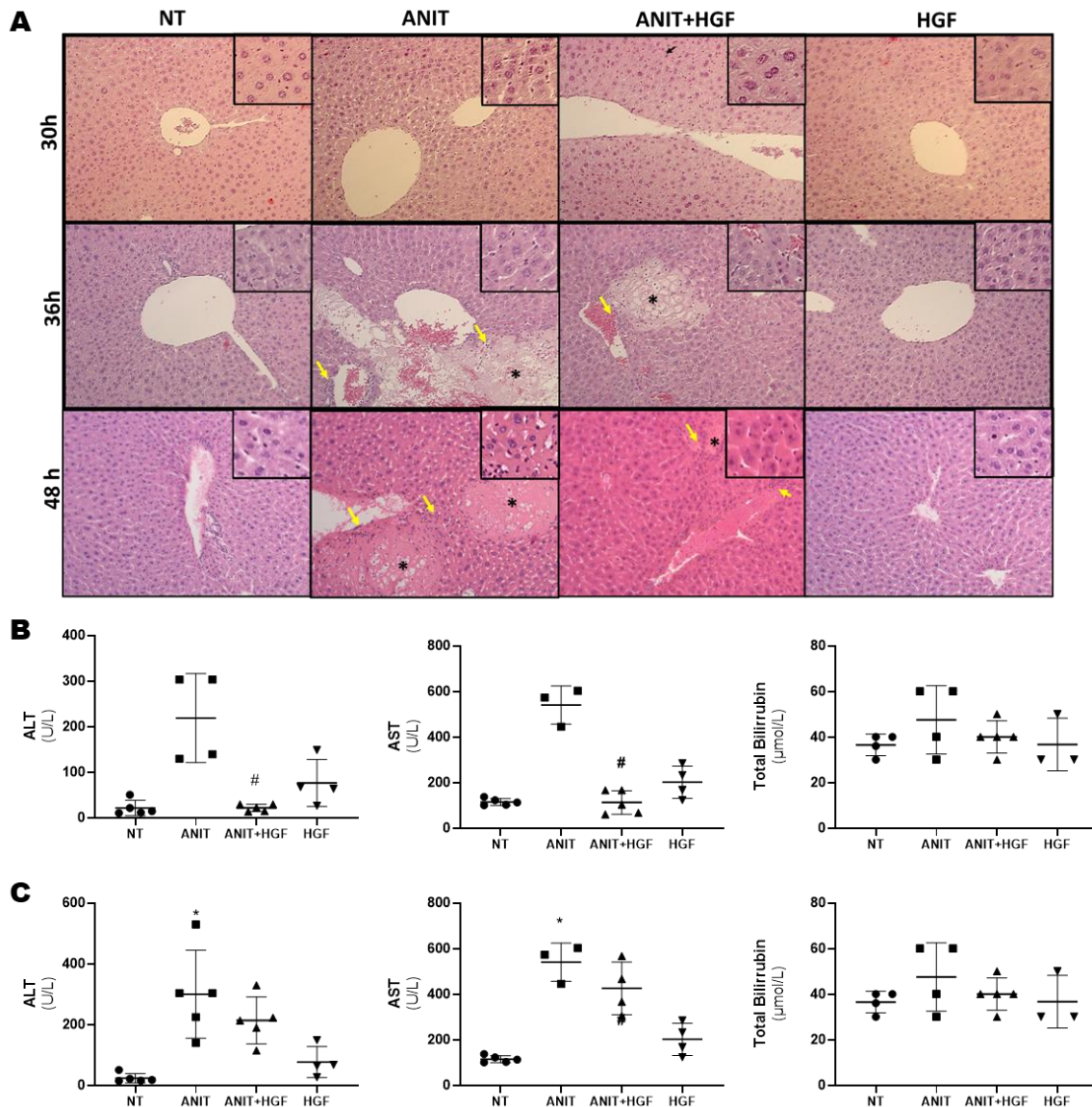


Figura 3. Análisis Histológicos y pruebas bioquímicas de la evaluación de daño.

A) Apariencia histológica mediante tinción con H&E (Los asteriscos negros indican áreas con necrosis, y las flechas negras muestran infiltrado inflamatorio) a tiempo de 30 h, 36 h y 48 h después de iniciar con el tratamiento. B) Actividad del aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), y bilirrubina total de ratones a las 30 h de iniciar con el tratamiento. C) Actividad del AST, ALT, y bilirrubina total de ratones a las 36 h de iniciar con el tratamiento. No tratado (NT), α -Naftil-Isotiocianato (ANIT), α -Naftil-Isotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las imágenes son representativas de al menos 4 animales experimentales y se presentan a un aumento original de 200 $\times$. Cada grupo representa la mediana $\pm$ SEM en al menos cuatro ratones diferentes, * $p < 0.05$, vs NT, # $p < 0.05$ vs ANIT.

Para continuar evaluando los efectos del tratamiento, analizamos los cortes con H&E a las 30 h y observamos que no había cambios drásticos en el parénquima hepático, como necrosis extensa o un incremento significativo del infiltrado inflamatorio (**Figura 3A**). No obstante, identificamos alteraciones en la morfología nuclear, lo cual nos impulsó a realizar una cuantificación detallada del porcentaje de células que exhibían tres tipos de núcleos, cada uno reflejando diferentes estados celulares: núcleos picnóticos, que son característicos de células en proceso de muerte celular programada; núcleos en regeneración, asociados a la proliferación celular, y núcleos normales. Esta evaluación en los tiempos de 30, 36 y 48 h nos permitió precisar mejor el impacto del tratamiento sobre la viabilidad celular, ya que los cambios en la morfología nuclear son un indicador temprano y sensible de daño o regeneración tisular.

Los resultados mostraron que, a las 30 h el grupo tratado con ANIT presentó un incremento en el porcentaje de núcleos en regeneración y muerte en comparación con el grupo control. En contraste, el grupo de co-tratamiento mostró un porcentaje similar de núcleos en proliferación respecto al grupo ANIT, pero una notable disminución significativa en los núcleos picnóticos, alcanzando valores comparables al grupo NT, Así mismo, los grupos NT y HGF presentaron valores estadísticamente equivalentes en todos los parámetros evaluados (**Figura 4A**).

También, realizamos la misma evaluación a las 36 h. En este punto, se observó que el grupo tratado con ANIT mostró una disminución en el número de núcleos en proliferación, acompañado de un incremento considerable en los núcleos picnóticos. Por otro lado, el grupo de co-tratamiento también presentó un aumento en los núcleos

picnóticos, pero, a diferencia del grupo ANIT, mostró un incremento significativo en los núcleos en regeneración. Además, se detectó un ligero aumento en los núcleos en regeneración en el grupo tratado únicamente con HGF (**Figura 4B**).

A las 48 h de iniciado el tratamiento, el grupo ANIT presentó un aumento drástico y significativo en el porcentaje de núcleos picnóticos, indicando un mayor grado de daño celular. En contraste, el grupo de co-tratamiento, aunque mostró una disminución en el número de núcleos en regeneración en comparación con las 36 h, seguía mostrando valores significativamente superiores en comparación con el grupo no tratado (NT). Al mismo tiempo, los núcleos picnóticos en el grupo de co-tratamiento se compararon con los del grupo NT, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (**Figura 4C**).

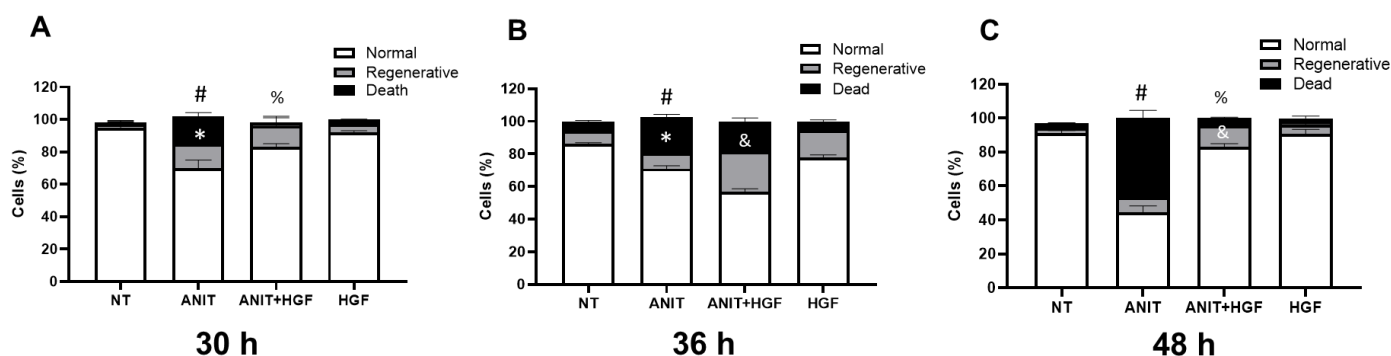


Figura 4. Análisis de los núcleos picnóticos y su respuesta celular.

A-C) Cuantificación del porcentaje de núcleos picnóticos teñidos con hematoxilina en relación con el número total de células a las 30, 36 y 48 h posteriores al inicio del tratamiento. No tratado (NT), α -Naftilisotiocianato (ANIT), α -Naftilisotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las imágenes son representativas de al menos 5 campos diferentes y se presentan a un aumento original de 200 $\times$. Cada grupo representa la mediana $\pm$ SEM en al menos cuatro ratones diferentes, * p < 0.05 ANIT Regenerative vs NT Regenerative, # p < 0.05 ANIT Death vs NT Dead, % p < 0.05 ANIT+HGF Death vs ANIT Dead, & p < 0.05 ANIT+HGF Regenerative vs ANIT Regenerative.

Otro aspecto observado en los análisis de H&E fue el tamaño de los sinusoides, los cuales presentaron un área variable en función del tratamiento y el tiempo. Como se ha documentado que los sinusoides se ensanchan con el objetivo de facilitar el reclutamiento del sistema inmune en patologías hepatocelulares, decidimos evaluarlos.

A las 30 h el grupo tratado con ANIT presentó un área sinusoidal estadísticamente similar al grupo no tratado (NT). No obstante, a las 36 y 48 h, el área de los sinusoides en el grupo ANIT aumentó. Por otro lado, en el grupo de co-tratamiento, las áreas sinusoidales a las 30 h fueron comparables a las del grupo NT, mientras que a las 36 y 48 h se observó una disminución en el área respecto al grupo ANIT. Los grupos NT y HGF no mostraron diferencias significativas en los valores del área sinusoidal en los distintos tiempos evaluados (**Figura 5 A-B**).

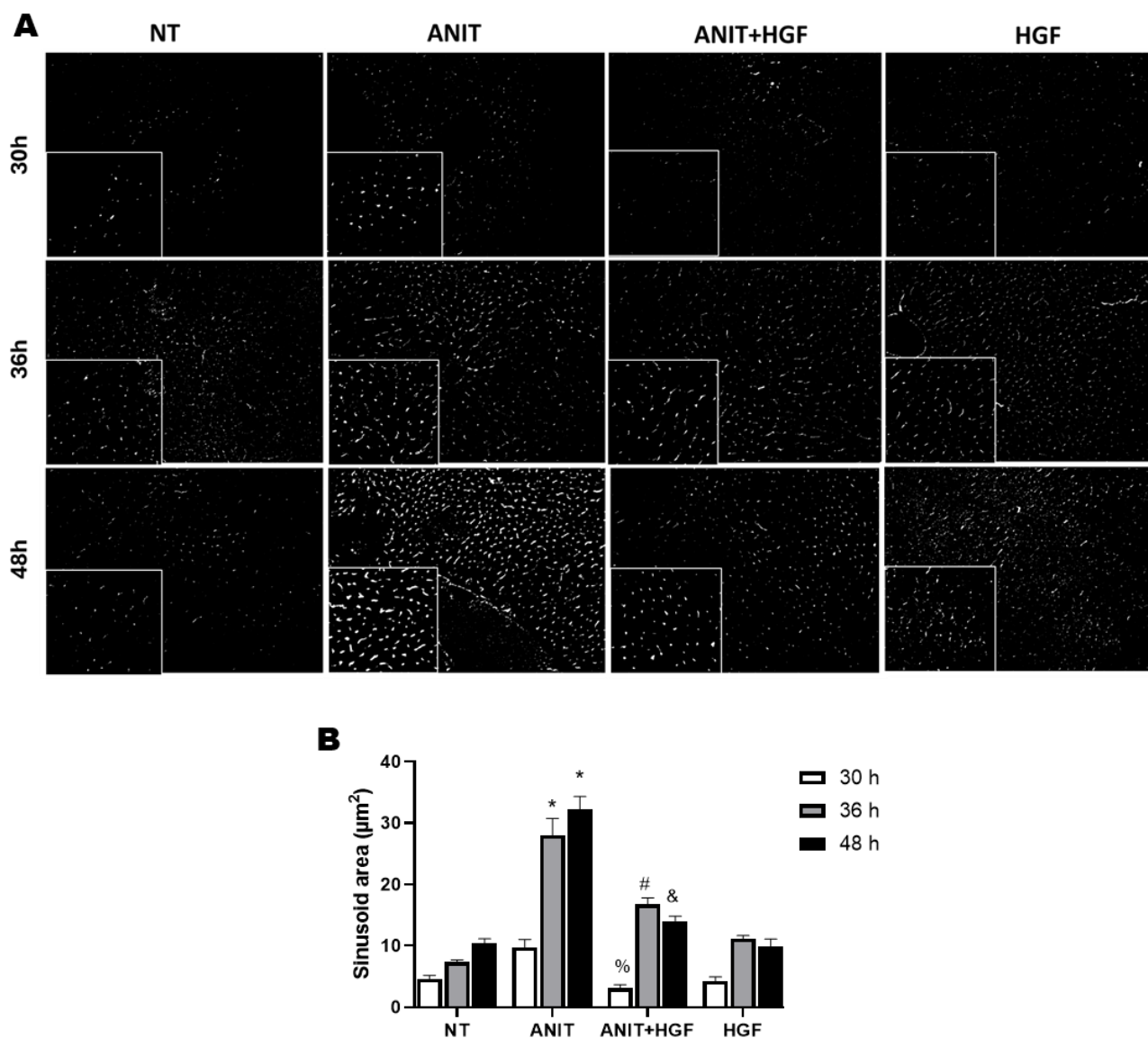


Figura 5. Análisis Histológicos de la evaluación de daño a nivel sinusoidal.

A) Apariencia histológica de sinusoides (los píxeles blancos indican las regiones sinusoidales y los píxeles negros indican las otras regiones celulares) a tiempo de 30 h, 36 h y 48 h después de iniciar con el tratamiento. B) Densitometría que muestra el área sinusoidal (μm^2) de los cuatro tratamientos a tres tiempos (30 h, 36 h y 48 h). No tratado (NT), α -Naftil-Isotiocianato (ANIT), α -Naftil-Isotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Las imágenes son representativas de al menos 4 animales experimentales y se presentan a un aumento original de 200 $\times$. Cada grupo representa la mediana $\pm$ SEM en al menos cuatro ratones diferentes, * $p < 0.05$ vs NT 30 h, # $p < 0.05$ vs ANIT 36 h, % $p < 0.05$ vs ANIT 30 h, & $p < 0.05$ vs ANIT 36 h y $^{\circ}p < 0.05$ vs ANIT 48 h.

Una vez confirmado el modelo descrito por Salas-Silva y colaboradores (Salas-Silva et al., 2020), se procedió a caracterizar la ruta que HGF estaba activando para ejercer su efecto hepatoprotector en la patología de la colestasis. Se encontraron cambios significativos dependientes de tiempo (30 h y 36 h) en las principales rutas de señalización involucradas en la enfermedad colestásica. Se evaluó el contenido proteico a través de Western blot (**Figura 6A y 6F**), la activación de proteínas como ERK 1/2, PKC δ y AKT. En los ratones de 30 h del grupo de ANIT (**Figura 6B**), la activación de la ruta de ERK 1/2 se ve reducida comparado con el grupo NT, mientras que el grupo ANIT+HGF se observaron cambios significativos en su activación, lo que podría estar asociándose a la reversión del daño a nivel macroscópico y microscópico reportado anteriormente para una exposición a 48 h (Salas-Silva et al., 2022). Para confirmar este hallazgo se midió el inhibidor de ERK 1/2, PP2A (**Figura 6C**), el cual sólo tuvo diferencia significativa en el grupo ANIT+HGF debido a la disminución de contenido. Por otro lado, a este tiempo, la activación de AKT y PKC δ no tuvieron cambios significativos (**Figura 6 D-E**).

A las 48h iniciado el tratamiento se obtuvieron resultados significativos debido a un incremento en la activación de ERK 1/2 en el grupo de ANIT (**Figura 6G**), respecto al control. Por otra parte, se observó un incremento en la activación de PKC δ en el grupo de ANIT, con respecto al grupo ANIT+HGF. Estos resultados nos sugieren que HGF a través de la unión con el receptor c-Met favorece la activación de la vía de señalización MAPK/ERK 1/2 para mitigar el daño colestásico por la administración de ANIT a las 30h de iniciar con el tratamiento (**Figura 6 A-J**).

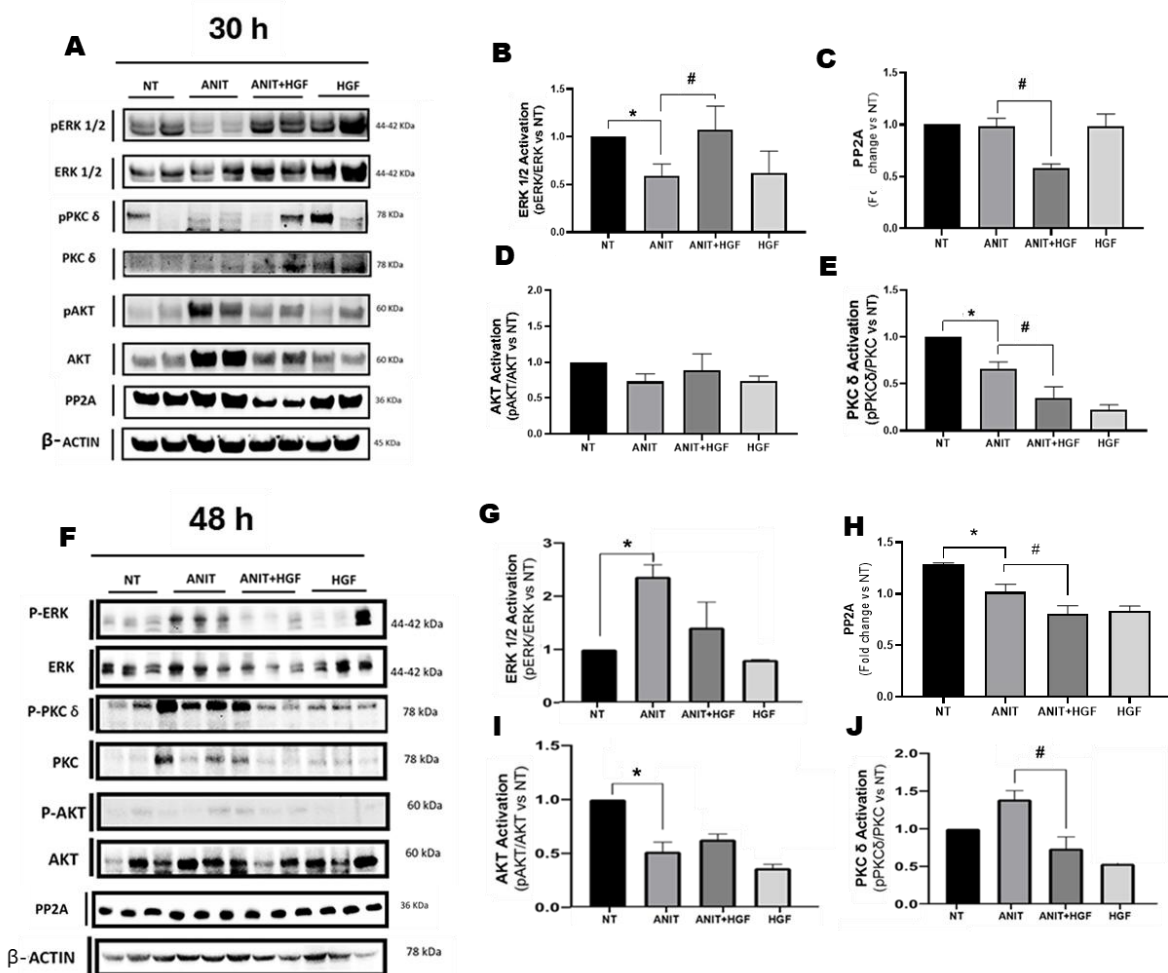


Figura 6. Activación de la vía MAPK/ ERK 1/2 dependiente de tiempo.

(A y F) Análisis de Western blot de vías de señalización celular dependientes de HGF y sus formas fosforiladas en un modelo *in vivo*, así como de una fosfatasa inhibitoria de la vía de ERK 1/2 (PP2A) a tiempos de 6 h y 12 h después de la administración de HGF. B, C, D y E) Cuantificación relativa de las proporciones de p-ERK/ERK, p-AKT/AKT, p-PKCδ/PKC y PP2A determinadas a partir de las bandas de transferencia Western que se muestran en el panel a 30 h. G, H I y J) Cuantificación relativa de las proporciones de p-ERK/ERK, p-AKT/AKT, p-PKCδ/PKC y PP2A determinadas a partir de las bandas de transferencia Western que se muestran en el panel a 36 h. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante densitometría y se normalizaron mediante niveles de β-actina como control de carga. No tratado (NT), α-Naftil-Isotiocianato (ANIT), α-Naftil-Isotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Cinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1 /2), Proteína cinasa B (AKT), Proteína cinasa C (PKC) y Proteína fosfatasa 2A (PP2A). Cada grupo representa la mediana ± SEM en al menos seis ratones diferentes, **p* < 0.05 vs NT y #*p* < 0.05 vs ANIT.

Con el fin de evaluar la respuesta de la activación de la vía de ERK 1/2, se realizó el análisis de contenido proteico a través de Western blot para determinar la proliferación celular en los tratamientos a través de la evaluación de la Ciclina D1 y A, así como sus CDKs reguladoras (Cdk4 y Cdk6); también evaluamos proteínas como p21 y p27 los cuales son inhibidores universales de CDKs, y por último Aurora A en los ratones de 30h (**Figura 7 A-B**).

A través de las densitometrías se observó que el grupo tratado sólo con ANIT induce el aumento CDK4, involucrada en la fase de transición G1/S, pero no de las demás proteínas del ciclo con respecto al control. Mientras que el grupo de ANIT+HGF favorece el aumento de contenido de Ciclina A, p27, p21 y Aurora A con respecto al grupo ANIT, lo que puede sugerir que la mayoría de las células se encuentran en fase de síntesis y de mitosis (**Figura 7B**).

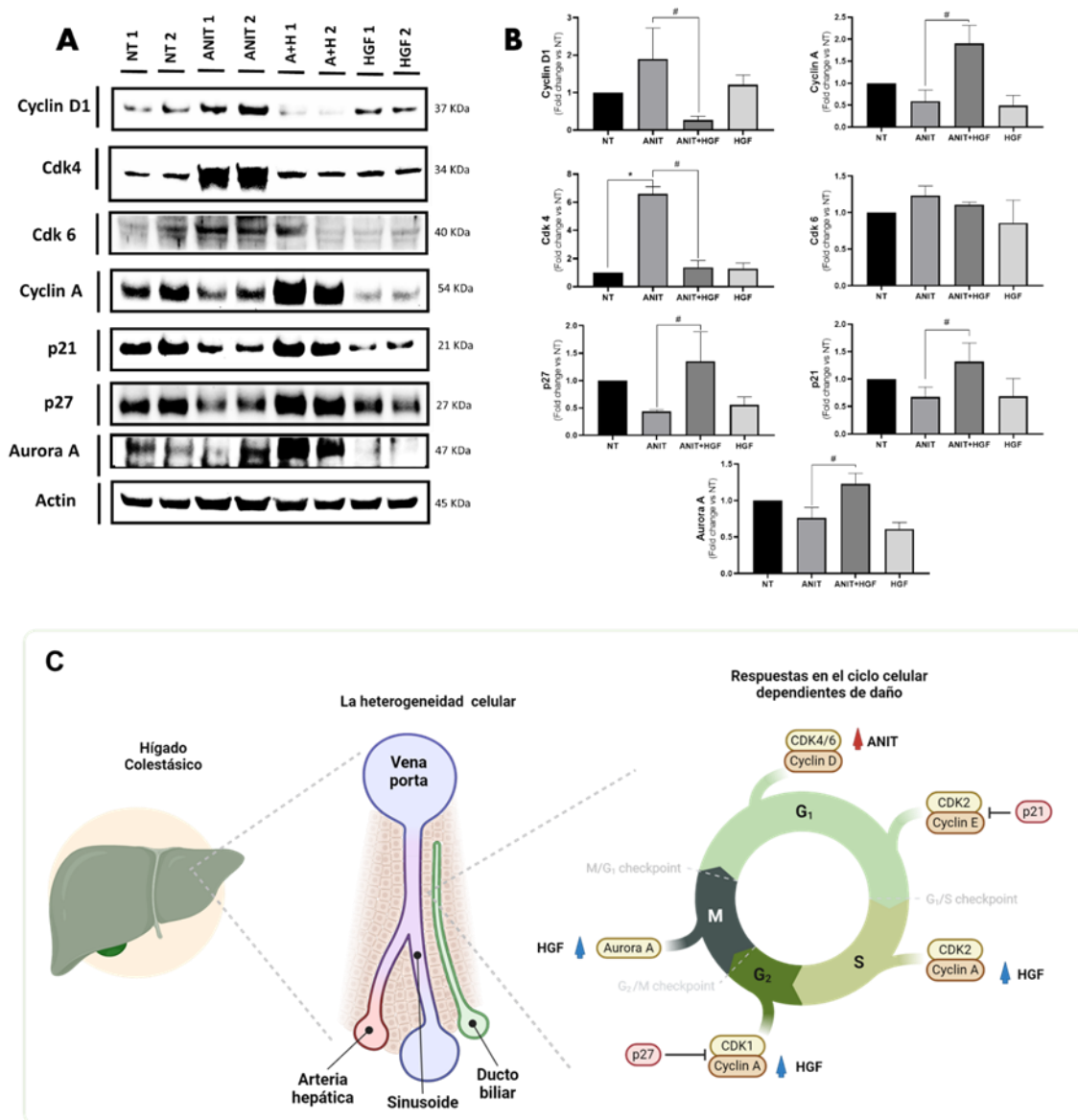


Figura 7. HGF aumenta la proliferación en hígado con daño colestásico.

A) Análisis de Western blot de proteínas del ciclo celular favorecidas por la señalización MAPK/ERK 1/2 en un modelo *in vivo*, a tiempos de 6 h después de la administración de HGF. B) Cuantificación relativa de las proporciones de Ciclina D1, Ciclina A, Cdk4, Cdk6, p21, p27 y Aurora A determinadas a partir de las bandas de transferencia Western que se muestran en el panel. C) Esquema representativo de la respuesta al daño, favoreciendo la proliferación, dependientes de tratamiento creado en BioRender. Los niveles de proteína se cuantificaron mediante densitometría y se normalizaron mediante niveles de β -actina como control de carga. No tratado (NT), α -Naftil-Isotiocianato (ANIT), α -Naftil-Isotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Cada grupo representa la mediana $\pm$ SEM en al menos seis ratones diferentes, * $p < 0.05$, vs NT, # $p < 0.05$ vs ANIT.

Se tiene registro de que el ANIT induce estrés oxidante en las células hepáticas al aumentar la producción de ROS, siendo ésta una de sus principales fuentes de daño. Para evaluar el efecto del HGF dependiente de tiempo (30, 36 y 48 h) en un evento colestásico, se realizó la técnica de TBARS como forma indirecta de daño generado por ROS, a través de la lipoperoxidación (**Figura 8A**). Se logra observar de forma evidente cómo el ANIT presenta un aumento de las sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico en todos los tiempos en comparación con el grupo NT. Mientras que, este tipo de daño, en presencia de HGF (ANIT+HGF) disminuye la lipoperoxidación a medida que pasa el tiempo, de forma significativa hasta llegar a niveles normales. Este resultado nos sugiere la participación de HGF en la regulación redox en un sistema colestásico alto en oxidantes.

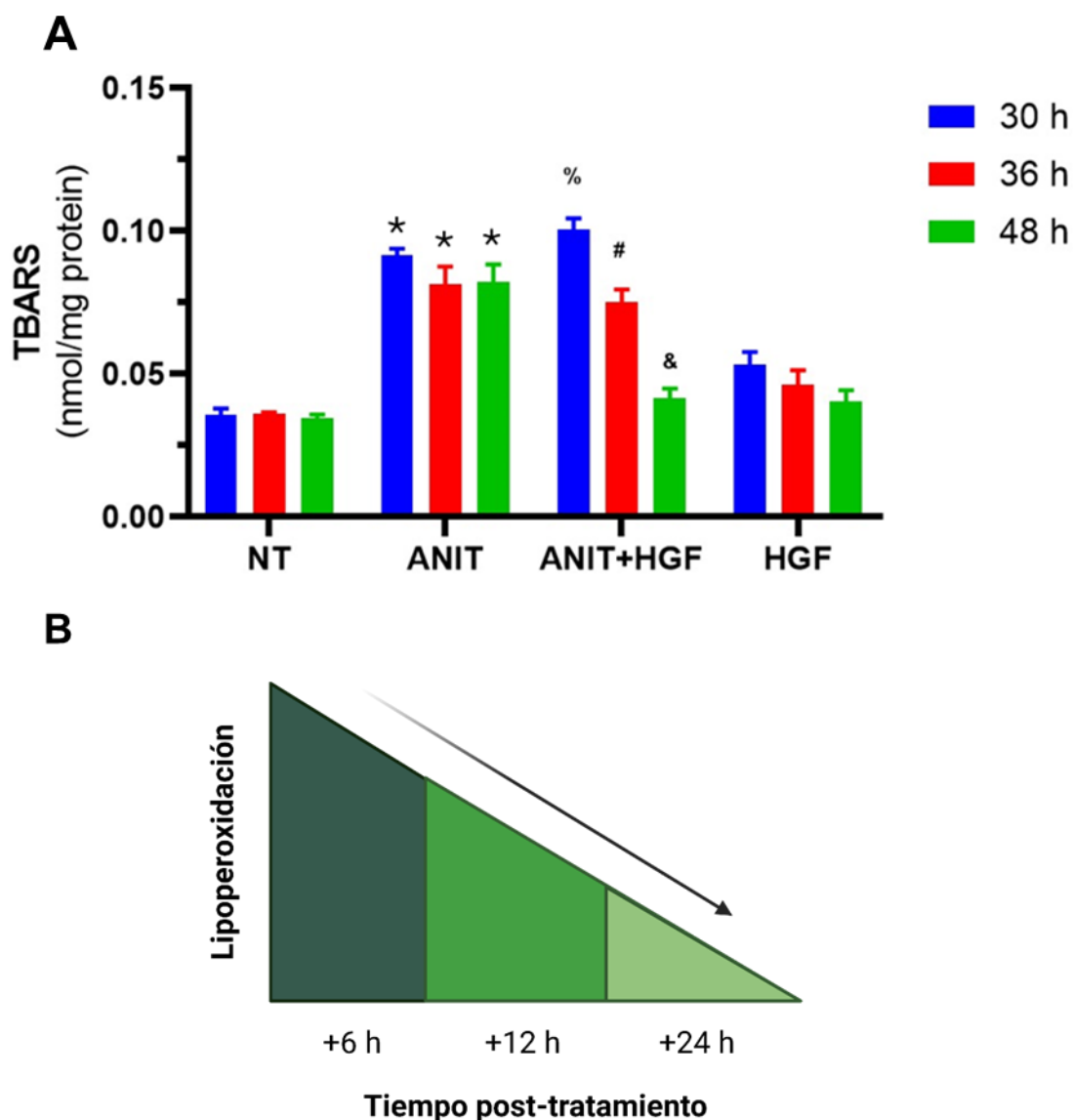
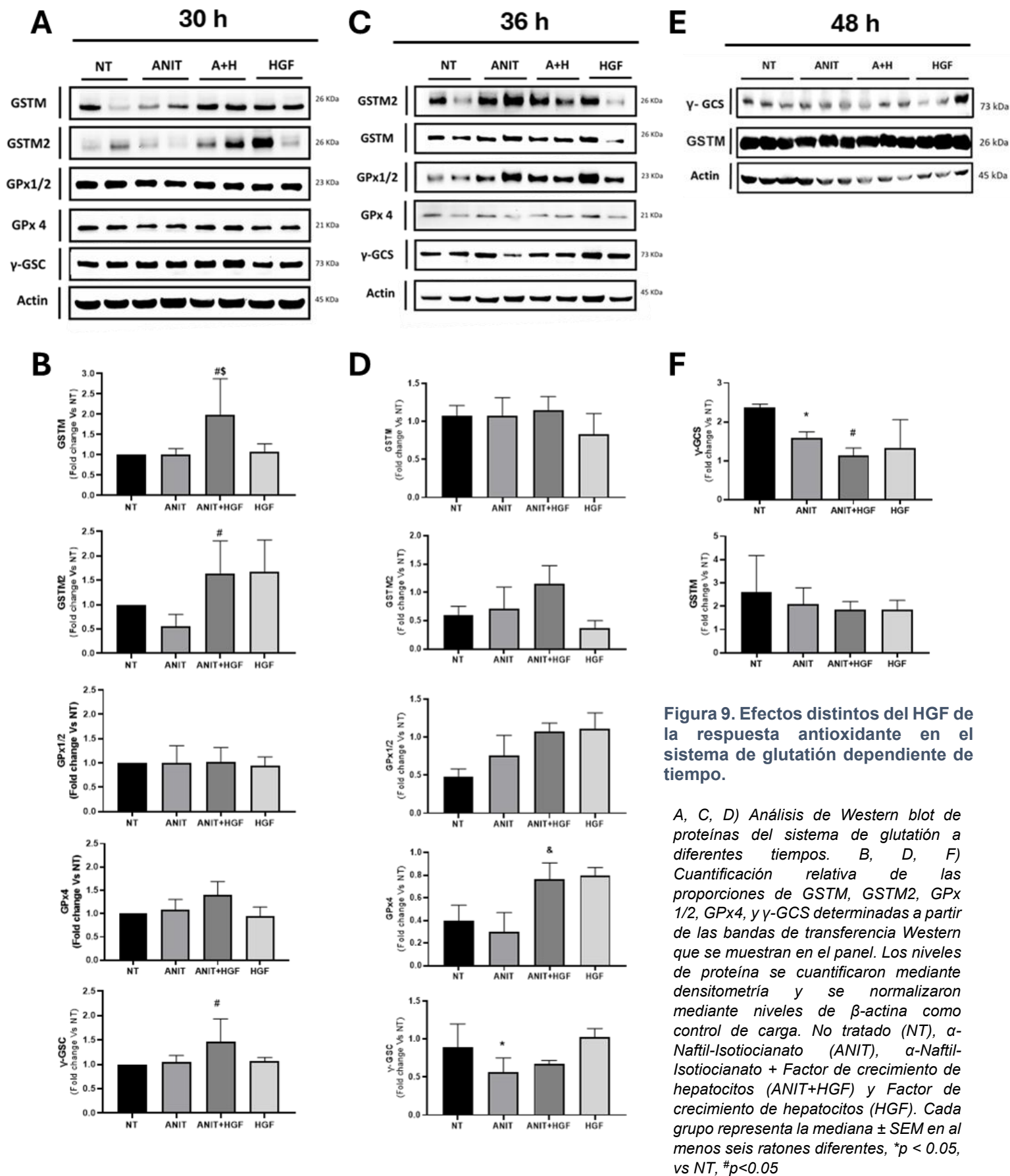


Figura 8. HGF contrarresta la alteración en la homeostasis redox inducida por colestasis experimental.

A) Determinación de la peroxidación lipídica analizada mediante ácido Tiobarbitúrico reactivo sustancias (TBARS). B) Esquema representativo del efecto ejercido por HGF en un modelo de daño por ANIT (Disminución de la lipoperoxidación dependiente de tiempo). No tratado (NT), α -Naftil-Isotiocianato (ANIT), α -Naftil-Isotiocianato + Factor de crecimiento de hepatocitos (ANIT+HGF) y Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Cada grupo representa la mediana $\pm$ SEM en al menos cinco ratones diferentes, * $p < 0.05$, vs NT, %, #, & $p < 0.05$ vs ANIT.

Está registrado en la literatura que el sistema de glutatión es de los principales mecanismos de regulación redox. Es por esto por lo que evaluamos la cantidad proteica de varias proteínas involucradas en este sistema por Western blot a diferentes tiempos (30 h, 36 h y 48 h).

A 30 h post administración de HGF en ratones con colestasis inducida por ANIT, se observó un incremento significativo en la cantidad proteica de Glutatión-S-transferasas (GSTM y GSTM2) y en γ -GCS, componentes clave del sistema de glutatión. Este hallazgo sugiere una respuesta adaptativa temprana del sistema antioxidante ante la acción del HGF (**Figura 9 A-B**). Sin embargo, tras 12 h adicionales (a las 36 h), se evidenció un aumento específico en la cantidad de Glutatión peroxidasa 4 (GPx4), mientras que las demás proteínas evaluadas no mostraron cambios significativos en su expresión. Este incremento en la expresión de GPx4 a las 36 h podría indicar una fase posterior de respuesta adaptativa, posiblemente relacionada con la función antioxidante del glutatión (**Figura 9 C-D**). Es importante destacar que a las 48 h se observó una disminución notable en la expresión de γ -GCS, lo que sugiere una posible modulación temporal en la respuesta del sistema de glutatión inducida por HGF (**Figura 9 E-F**). Estos resultados respaldan la hipótesis de que la administración de HGF desencadena una regulación dinámica y temporal del sistema de glutatión en el contexto de la colestasis inducida por ANIT.



Se tienen registros que el sistema inmune al ser estimulado por diversos factores como los ácidos biliares pueden activarse y acumularse en el hígado afectado por colestasis donde a través de la acción de mediadores inflamatorios y la regulación por citocinas, contribuyen a la destrucción de hepatocitos y células epiteliales de los conductos biliares, lo que puede agravar y, en algunas ocasiones, retrasar la progresión de la enfermedad hepática colestásica (Chen & Zhang, 2023). Por lo que decidimos evaluar parámetros de infiltrado inflamatorio en el tejido hepático de neutrófilos y macrófagos antiinflamatorios a las 30 y 36 h.

A las 30 h, las imágenes y los análisis de densitometría revelan, como era de esperar, que el tratamiento con ANIT favorece un aumento en el número de células positivas a MPO, con respecto al grupo NT, lo que podría indicar un reclutamiento significativo de neutrófilos. Este fenómeno se mantiene también a las 36 h. Por otro lado, en el cotratamiento con HGF a 30 y 36 h, observamos que el número de células positivas es estadísticamente menor en comparación con el grupo tratado solo con ANIT (**Figura 10**). Esto sugiere que el HGF podría estar modulando la respuesta inflamatoria al reducir el reclutamiento de neutrófilos, lo que a su vez podría tener implicaciones positivas en la reducción del daño hepático asociado con la colestasis.

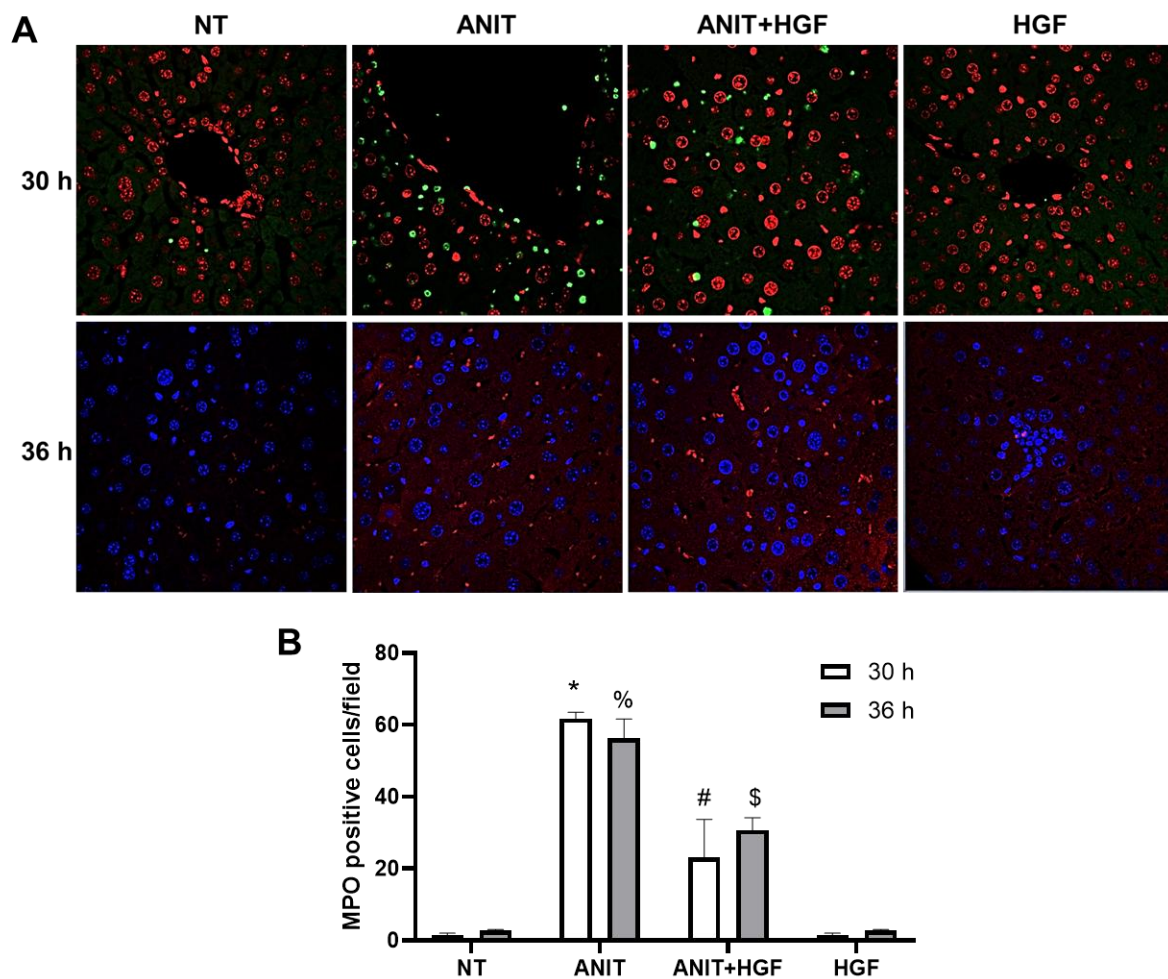


Figura 10. HGF puede reducir la inflamación hepática inducida por ANIT al inhibir el reclutamiento de neutrófilos.

A) IF para MPO (verde-30 h y rojo-36 h) Dapi (rojo-30 h y azul-36 h, respectivamente). B) Gráfico de células positivas observadas por campo. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Las imágenes son representativas de al menos 4 animales experimentales y se presentan a un aumento original de 400×. Los histogramas muestran el promedio $\pm$ error estándar de la media (SEM), * $p < 0.05$, vs NT 30 h, % $p < 0.05$, vs NT 36 h, # $p < 0.05$ vs ANIT 30 h y \$ $p < 0.05$ vs ANIT 36 h.

A lo largo de los años, numerosos estudios han confirmado que los macrófagos pueden activarse tras daños intrahepáticos o extrahepáticos, lo que resulta en la liberación de especies reactivas de oxígeno y la producción de citocinas pro o antiinflamatorias. Esta activación puede inducir vías de señalización cruciales, como las MAPK en los hepatocitos. Por esta razón, decidimos evaluar los efectos de los macrófagos mediante el uso de un marcador específico para macrófagos antiinflamatorios (Chen & Zhang, 2023; Kim et al., 2017; Lou et al., 2014; Mulder et al., 2009).

Los resultados mostraron que, a las 36 horas, ANIT induce el reclutamiento de macrófagos M2, especialmente en las áreas necróticas del tejido, en comparación con el control, donde la cantidad de células positivas al marcador es mínima (**Figura 11B**).; aunque estas células están presentes, su localización se limita únicamente a la vena central. En contraste, nuestro cotratamiento provoca un aumento exacerbado en el reclutamiento de estos macrófagos, no solo en las áreas de daño necrótico, sino que su localización se concentra principalmente en la triada portal (**Figura 11**).

Este patrón de distribución podría indicar un papel activo de los macrófagos M2 en la respuesta reparativa del tejido hepático, sugiriendo que estos podrían estar contribuyendo a procesos de regeneración y antiinflamación en las zonas dañadas. Además, la mayor acumulación en la triada portal podría reflejar un intento del sistema inmune de restaurar la homeostasis en áreas críticas del hígado, donde se encuentran los conductos biliares y los vasos sanguíneos importantes para la función hepática.

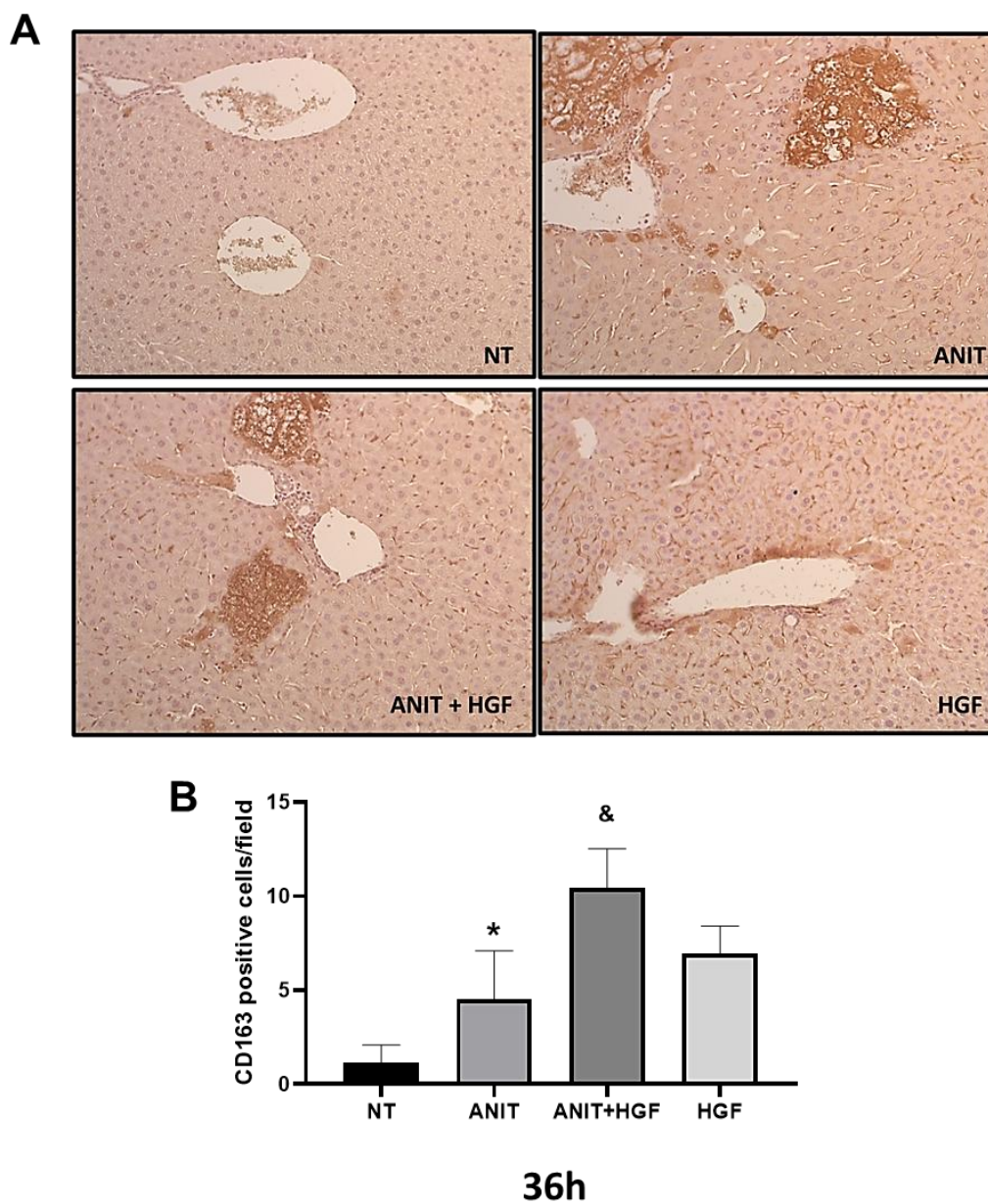


Figura 11. HGF puede reducir la inflamación hepática inducida por ANIT al modular el reclutamiento de macrófagos anti-inflamatorios.

A) Muestra IHC positivas para el marcador CD163 a 36 h. B) Densitometría del Número de células marcadas por CD163. Las imágenes son representativas de al menos 4 animales experimentales y se presentan a un aumento original de 200×. Los histogramas muestran el promedio $\pm$ error estándar de la media (SEM), * $p < 0.05$, vs NT, & $p < 0.05$, vs ANIT 36 h.

10. Discusión

La colestasis intrahepática se caracteriza por ser una enfermedad aguda que causa alteraciones generalmente en el hígado y la vesícula biliar. Se ha reportado que a nivel macroscópico el hígado desarrolla hepatomegalia y existe un cambio de coloración en el parénquima hepático debido al daño producido por la retención de bilis, lo que favorece la presencia de eventos proinflamatorios y a su vez la muerte de hepatocitos y colangiocitos por necrosis (Liu et al., 2022; Salas-Silva et al., 2022).

Nuestros datos mostraron estas características en el modelo de ANIT desde las 30 h de haber iniciado el tratamiento; al mismo tiempo, se corroboró mediante la evaluación macroscópica, histológica y de pruebas bioquímicas en suero. Los resultados obtenidos en este punto nos indican que la administración de HGF favorece la reversión del daño a nivel hepático desde tiempos cortos de 6 h.

Con el fin de continuar evaluando los efectos del tratamiento, observamos en los cortes teñidos con H&E a las 30 h que no se presentaban cambios drásticos en el parénquima hepático, como necrosis extensa o un incremento notable en el infiltrado inflamatorio. Sin embargo, se detectaron alteraciones en la morfología nuclear, lo que nos llevó a cuantificar el porcentaje de células que presentaban tres tipos de núcleos asociados a diferentes estados celulares: núcleos picnóticos, indicativos de células en proceso de muerte, núcleos en regeneración y núcleos normales, en los tiempos de 30, 36 y 48 h. Los resultados sugieren que el daño inducido por agentes como ANIT activa una serie de mecanismos que incluyen tanto apoptosis como proliferación celular, en un intento del hígado por compensar el daño.

Por otra parte, el aumento de núcleos picnóticos en el grupo ANIT, especialmente a las 36 y 48 h, sugiere una apoptosis activa como respuesta al daño inducido por ANIT, un agente colestásico conocido por provocar necrosis y estrés oxidativo en los hepatocitos. La picnosis, caracterizada por la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo, es un marcador claro de apoptosis (Schwabe & Luedde, 2018). La muerte celular hepática en este contexto puede estar mediada por vías de señalización inflamatorias, y por la acumulación de ácidos biliares tóxicos, que inducen estrés del retículo endoplásmico y mitocondrial, contribuyendo a la muerte celular, principalmente (Malhi & Gores, 2008; Malhi et al., 2010; Schwabe & Luedde, 2018).

Por otro lado, el aumento de núcleos en regeneración en el grupo de co-tratamiento con HGF es consistente con el papel bien documentado de HGF como un factor promotor de la proliferación hepatocelular (Zhao et al., 2022). El HGF es conocido por su capacidad de activar la vía de señalización MAPK/ERK, la cual es crucial para la proliferación y regeneración hepática. Este aumento en núcleos en regeneración, especialmente a las 36 h, sugiere que el co-tratamiento con HGF está promoviendo la proliferación celular como una respuesta regenerativa ante el daño hepático inducido por ANIT.

El hecho de que en las etapas más tardías (48 h) el número de núcleos picnóticos siga aumentando en el grupo ANIT, mientras que en el co-tratamiento con HGF se mantengan en niveles más bajos, podría indicar que el HGF está atenuando la progresión de la muerte celular, promoviendo la regeneración y protegiendo parcialmente los hepatocitos del daño irreversible.

Una parte fundamental del lobulillo hepático son los sinusoides, ya que son componentes clave del microambiente hepático, y responden a diversos estímulos en situaciones de daño hepático o estrés metabólico, alterando su tamaño en función de la severidad de la patología (Lu, 2022; Ortega-Ribera et al., 2020).

Un aumento en el área sinusoidal, como el observado en el grupo tratado con ANIT a las 36 y 48 h, podría estar relacionado con una respuesta inflamatoria. Este fenómeno ha sido asociado con la activación de células de Kupffer y el reclutamiento de leucocitos al espacio sinusoide, lo cual promueve el ensanchamiento de estos vasos para facilitar el tráfico celular (Ortega-Ribera et al., 2020). Estudios recientes indican que el agrandamiento de los sinusoides es una respuesta adaptativa frente al daño hepatocelular, buscando facilitar la llegada de células inmunitarias que intentan reparar el tejido dañado (Lu, 2022).

Por otro lado, el hecho de que el grupo de co-tratamiento con HGF presentara una disminución del área de los sinusoides a las 36 y 48 h podría estar relacionado con el papel modulador del HGF sobre la respuesta inflamatoria y la regeneración hepática. Además, estudios recientes sugieren que el HGF promueve la reparación del endotelio sinusoidal, lo cual podría evitar el ensanchamiento patológico de estos vasos (Mungunsukh et al., 2014).

En cambio, la falta de cambios significativos en el grupo NT y en el grupo HGF podría indicar que estos tratamientos no generan un estrés suficientemente elevado para

alterar la estructura sinusoidal, lo que se alinea con estudios que demuestran que los sinusoides mantienen su estructura normal en condiciones de equilibrio hepático.

El infiltrado inflamatorio es uno de los puntos principales cuando hablamos de la distensión sinusoidal, es por eso que nosotros propusimos estudiar a dos células importantes en este sistema: Los neutrófilos y los macrófagos.

Se tiene bien reportado que los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune innata, especialmente en situaciones de daño tisular como la colestasis inducida por ANIT (Dahm et al., 1991; Hill & Roth, 1998; Lopez-Ramirez et al., 2022) Su activación se acompaña de la producción de especies reactivas de oxígeno, que aunque son eficaces en la eliminación de patógenos, también pueden provocar daño colateral a las células sanas del hígado (Sun et al., 2024). Este fenómeno es crítico, ya que el daño mediado por neutrófilos puede contribuir a la progresión de la colestasis, estableciendo un círculo vicioso donde la inflamación perpetúa la lesión hepática.

La persistencia de neutrófilos en el tejido, si bien es un indicativo de la lucha del sistema inmune contra el daño, también puede sugerir un fallo en los mecanismos de resolución de la inflamación. Sin embargo, su reclutamiento sostenido puede ser un signo de que los procesos de resolución están comprometidos, lo cual es un aspecto crítico en el manejo de enfermedades hepáticas.

Por otro lado, el hallazgo de un aumento significativo en el reclutamiento de macrófagos M2 en áreas de necrosis es notable. Estos macrófagos no solo actúan

como células efectoras en la eliminación de detritos celulares, sino que también desempeñan un papel crucial en la modulación de la respuesta inflamatoria y su capacidad para secretar citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento puede ser crucial para la recuperación del tejido hepático (Bruneau et al., 2022). La localización predominante en la triada portal sugiere que están involucrados en la regulación de la homeostasis biliar y vascular, lo cual es esencial en el contexto de la colestasis, como un tipo de respuestas inmunitarias adaptativas (Shan & Ju, 2020).

Este fenómeno podría indicar un cambio hacia una respuesta reparativa, donde los macrófagos M2 intentan mitigar el daño infligido por la respuesta inflamatoria inicial. Sin embargo, la interacción entre neutrófilos y macrófagos es compleja; Se tiene bien reportado que los neutrófilos pueden facilitar la activación de macrófagos y activar respuestas proinflamatorias (Gujral et al., 2003), pero, por otro, grupos de investigación han identificado una interacción neutrófilo-macrófago previamente no apreciada que facilita la regeneración y reparación del hígado, lo que las convierte en una parte integral del ajuste fino de la reparación tisular (Chen et al., 2024; Yang et al., 2019).

También, se observó que para mitigar la acumulación de ácidos biliares y preservar la integridad de los hepatocitos frente a posibles daños severos se desencadenan diversos mecanismos adaptativos a través de la señalización iniciada por el HGF/c-MET. El HGF una vez que se une a su receptor c-MET favorece la activación de la vía MAPK/ ERK 1/2, esto a través de análisis proteómicos a tiempos de tratamiento de 6h; por lo tanto, se hipotetizó que esta vía es la que dirige todos estos eventos antiolestásicos y de reversión del daño.

También se evaluó el contenido de PP2A, una fosfatasa inhibidora de esta vía, la cual encontramos a la baja, lo que significaría que el modelo de daño genera su disminución con el objetivo de que aumente la señalización de la vía de las MAPquinasas y por lo tanto, también la activación de factores de transcripción como NRF2, y la transcripción de sus genes blancos involucrados en la respuesta redox, importante en un sistema prooxidante como el nuestro.

Por otro lado, se observó también que, a las 36 h de tratamiento, esta misma vía está involucrada en los ratones tratados sólo con el agente colestásico, posiblemente a que la célula realiza esfuerzos desesperados como último recurso para evitar un daño a través de la vía ERK 1/ 2 /PKC δ .

Se ha documentado exhaustivamente que la activación de esta cascada de señalización incide directamente en la regulación de genes claves que orquestan diferentes respuestas celulares de protección (Guégan, 2012)

La interconexión intrínseca entre la señalización de ERK 1/2 y diferentes procesos celulares como la proliferación constituye un eje central en nuestro análisis; Es por eso que analizamos diferentes proteínas clave del ciclo celular. Nuestros hallazgos sugieren un aumento observado en las proteínas p27 y p21 en el grupo ANIT+HGF a 30 h, esto podría ser una respuesta adaptativa para contrarrestar el estrés celular y el daño inducido por ANIT, ya que estas proteínas tienen roles importantes en la regulación del ciclo celular y la detención de la proliferación, por lo que su aumento

podría estar relacionado con un intento de detener la progresión del ciclo celular en las células dañadas, evitando así la proliferación descontrolada y promoviendo la reparación del tejido hepático.

Al mismo tiempo, el aumento del contenido de las proteínas Ciclina A y Aurora A sugieren el aumento de las células en fase S y M del ciclo celular en el grupo de co-tratamiento, lo cual puede ser esencial para compensar el daño y recuperar la homeostasis tisular. Esta respuesta compensatoria podría ser crucial para restaurar la función hepática y promover la recuperación del tejido afectado por la colestasis.

La activación de la vía por HGF/c-Met no solo se ha visto que desencadena proliferación como evento de protección, sino que también se ha registrado que favorece un impacto significativo en la regulación de genes implicados en la homeostasis redox (Casas-Grajales, 2015). Entre estos sistemas, el de glutatión emerge como un componente crucial en la defensa antioxidante intracelular.

El análisis temporal de las proteínas antioxidantes reveló patrones dinámicos en su expresión a lo largo del tiempo. A las 6 h después de la administración de HGF en ratones con colestasis inducida por ANIT, se observó un incremento significativo en las Glutación-S-transferasas (GSTM y GSTM2) y en γ -GCS, indicando una respuesta adaptativa inicial del sistema antioxidante. Posteriormente, a las 36 h, se detectó un aumento específico en la expresión de Glutación peroxidasa 4 (GPx4), mientras que las demás proteínas evaluadas no mostraron cambios significativos. Esta respuesta sugiere una fase posterior de adaptación antioxidante, posiblemente relacionada con la función de GPx4 en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo,

a las 48 h, se observó una disminución notable en la expresión de γ -GCS, lo que podría indicar una regulación negativa o una modulación temporal en la respuesta del sistema antioxidante. Estos resultados destacan la complejidad temporal de la respuesta de las proteínas antioxidantes ante la administración de HGF en el contexto de la colestasis inducida por ANIT, como lo reporta, ya que como se ha reportado previamente en diferentes sistemas, ANIT es un agente altamente oxidante (Salas-Silva, 2022; Lopez-Ramirez, 2022).

No obstante, es necesario llevar a cabo más experimentos que incluyan técnicas inmunohistoquímicas e inmunofluorescencia para confirmar proliferación, así como la evaluación del cociente de glutatión reducido y oxidado, para obtener un mayor conocimiento acerca del mecanismo de daño y protección del HGF.

11. Conclusión

El HGF muestra un papel multifunción que interactúa con varias dianas celulares ejerciendo su efecto hepatoprotector a través de la activación de la vía ERK 1/2, promoviendo tanto la proliferación celular como la regulación del sistema antioxidante de glutatión. Esto contribuye a mitigar los efectos negativos de la colestasis experimental inducida por ANIT, reduciendo la necrosis y la modulación del infiltrado inflamatorio generado por la producción de ROS.

12. Referencias

- Akhtar, N., & Streuli, C. H. (2013). An integrin–ILK–microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nature Cell Biology*, 15(1), 17-27. <https://doi.org/10.1038/ncb2646>
- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., & Sugiyama, Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1511(1), 7-16. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00355-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00355-2)
- Alaei Faradonbeh, F., Lastuvkova, H., Cermanova, J., Hroch, M., Nova, Z., Uher, M., Hirsova, P., Pavek, P., & Micuda, S. (2022). Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Deficiency Aggravates Estrogen-Induced Impairment of Bile Acid Metabolomics in Rats. *Front Physiol*, 13, 859294. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.859294>
- Anderson, J. M., & Van Itallie, C. M. (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, 269(4 Pt 1), G467-475. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.4.G467>
- Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*, 70(1), 151-171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Basiglio, C. L., Crocenzi, F. A., Sánchez Pozzi, E. J., & Roma, M. G. (2021). Oxidative Stress and Localization Status of Hepatocellular Transporters: Impact on Bile Secretion and Role of Signaling Pathways. *Antioxid Redox Signal*, 35(10), 808-831. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0021>
- Boyer, J. L. (2013). Bile formation and secretion. *Compr Physiol*, 3(3), 1035-1078. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>
- Bruneau, A., Guillot, A., & Tacke, F. (2022). Macrophages in cholangiopathies. *Curr Opin Gastroenterol*, 38(2), 114-120. <https://doi.org/10.1097/mog.0000000000000814>
- Bryant, David M., Rognot, J., Datta, A., Overeem, Arend W., Kim, M., Yu, W., Peng, X., Eastburn, Dennis J., Ewald, Andrew J., Werb, Z., & Mostov, Keith E. (2014). A Molecular Switch for the Orientation of Epithelial Cell Polarization. *Developmental Cell*, 31(2), 171-187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.08.027>
- Chen, J., & Zhang, S. (2023). The Role of Inflammation in Cholestatic Liver Injury. *Journal of Inflammation Research*, Volume 16, 4527-4540. <https://doi.org/10.2147/jir.s430730>
- Chen, Y., Yang, Y., Lu, J., Chen, H., Shi, Z., Wang, X., Xu, N., Xu, X., & Wang, S. (2024). Neutrophil and macrophage crosstalk might be a potential target for liver regeneration. *FEBS Open Bio*, 14(6), 922-941. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13803>
- Chiang, J. Y. L., & Ferrell, J. M. (2018). Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene Expr*, 18(2), 71-87. <https://doi.org/10.3727/105221618x15156018385515>
- Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., López-Reyes, A., Domínguez-Pérez, M., Nuño, N., Domínguez-Meraz, M., Bucio, L., Souza, V., Factor, V. M., Thorgeirsson, S. S., Gutiérrez-Ruiz, M. C., & Gómez-Quiroz, L. E. (2013). Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*, 95(6), 1177-1184. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.005>

- Dahm, L. J., Ganey, P. E., & Roth, R. A. (2010). 9.25 - α -Naphthylisothiocyanate. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 571-579). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01024-1>
- Dahm, L. J., Schultze, A. E., & Roth, R. A. (1991). An antibody to neutrophils attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury. *J Pharmacol Exp Ther*, 256(1), 412-420.
- Evangelakos, I., Heeren, J., Verkade, E., & Kuipers, F. (2021). Role of bile acids in inflammatory liver diseases. *Semin Immunopathol*, 43(4), 577-590. <https://doi.org/10.1007/s00281-021-00869-6>
- Gibert-Ramos, A., Sanfeliu-Redondo, D., Aristu-Zabalza, P., Martínez-Alcocer, A., Gracia-Sancho, J., Guixé-Muntet, S., & Fernández-Iglesias, A. (2021). The Hepatic Sinusoid in Chronic Liver Disease: The Optimal Milieu for Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(22). <https://doi.org/10.3390/cancers13225719>
- Gomez-Quiroz, L. E., Seo, D., Lee, Y.-H., Kitade, M., Gaiser, T., Gillen, M., Lee, S.-B., Gutierrez-Ruiz, M. C., Conner, E. A., Factor, V. M., Thorgerisson, S. S., & Marquardt, J. U. (2016). Loss of c-Met signaling sensitizes hepatocytes to lipotoxicity and induces cholestatic liver damage by aggravating oxidative stress. *Toxicology*, 361-362, 39-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.004>
- Greaves, P. (2012). Chapter 9 - Liver and Pancreas. In P. Greaves (Ed.), *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (Fourth Edition)* (pp. 433-535). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53856-7.00009-9>
- Gujral, J. S., Farhood, A., Bajt, M. L., & Jaeschke, H. (2003). Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology*, 38(2), 355-363. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50341>
- Hill, D. A., & Roth, R. A. (1998). Alpha-naphthylisothiocyanate causes neutrophils to release factors that are cytotoxic to hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 148(1), 169-175. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8314>
- Jedlitschky, G., Hoffmann, U., & Kroemer, H. K. (2006). Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2(3), 351-366. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.3.351>
- Juanola, O., Hassan, M., Kumar, P., Yilmaz, B., Keller, I., Simillion, C., Engelmann, C., Tacke, F., Dufour, J. F., De Gottardi, A., & Moghadamrad, S. (2021). Intestinal microbiota drives cholestasis-induced specific hepatic gene expression patterns. *Gut Microbes*, 13(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1911534>
- Kalra, A., Yetiskul, E., Wehrle, C. J., & Tuma, F. (2024). Physiology, Liver. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.
- Kim, S. Y., Jeong, J. M., Kim, S. J., Seo, W., Kim, M. H., Choi, W. M., Yoo, W., Lee, J. H., Shim, Y. R., Yi, H. S., Lee, Y. S., Eun, H. S., Lee, B. S., Chun, K., Kang, S. J., Kim, S. C., Gao, B., Kunos, G., Kim, H. M., & Jeong, W. I. (2017). Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4-MD2 complex. *Nat Commun*, 8(1), 2247. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02325-2>
- Kodali, P., Wu, P., Lahiji, P. A., Brown, E. J., & Maher, J. J. (2006). ANIT toxicity toward mouse hepatocytes in vivo is mediated primarily by neutrophils via CD18. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(2), G355-G363. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00458.2005>

- Liu, J., Liu, J., Meng, C., Huang, C., Liu, F., & Xia, C. (2022). Oleanolic acid alleviates ANIT-induced cholestatic liver injury by activating Fxr and Nrf2 pathways to ameliorate disordered bile acids homeostasis. *Phytomedicine*, 102, 154173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154173>
- Lopez-Ramirez, J., García-Barrera, M., Nuño-Lámbarri, N., Salas-Silva, S., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Souza, V., Gomez-Quiroz, L. E., & Ortiz, L. B. (2022). HGF AND PROTECTIVE ROLL IN THE INTESTINAL COLLATERAL DAMAGE BY A-NAFTILISOTIOCIANATO- INDUCE CHOLESTASIS. *Annals of Hepatology*, 27, 100635. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100635>
- Lou, G., Ma, X., Fu, X., Meng, Z., Zhang, W., Wang, Y. D., Van Ness, C., Yu, D., Xu, R., & Huang, W. (2014). GPBAR1/TGR5 mediates bile acid-induced cytokine expression in murine Kupffer cells. *PLoS One*, 9(4), e93567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093567>
- Lu, L. (2022). Guidelines for the Management of Cholestatic Liver Diseases (2021). *J Clin Transl Hepatol*, 10(4), 757-769. <https://doi.org/10.14218/jcth.2022.00147>
- Malhi, H., & Gores, G. J. (2008). Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*, 134(6), 1641-1654. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.002>
- Malhi, H., Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2010). Hepatocyte death: a clear and present danger. *Physiol Rev*, 90(3), 1165-1194. <https://doi.org/10.1152/physrev.00061.2009>
- Mariotti, V., Fiorotto, R., Cadamuro, M., Fabris, L., & Strazzabosco, M. (2021). New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Rep*, 3(3), 100251. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100251>
- Martínez-Torres, D., Maldonado, V., Pérez-Gallardo, C., Yañez, R., Candia, V., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., Morales-Navarrete, H., & Segovia-Miranda, F. (2024). Phenotypic characterization of liver tissue heterogeneity through a next-generation 3D single-cell atlas. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53309-4>
- Méndez-Sánchez, N., Villa, A. R., Chávez-Tapia, N. C., Ponciano-Rodríguez, G., Almeda-Valdés, P., González, D., & Uribe, M. (2005). Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Annals of Hepatology*, 4(1), 52-55. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)32086-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)32086-1)
- Mulder, J., Karpen, S. J., Tietge, U. J., & Kuipers, F. (2009). Nuclear receptors: mediators and modifiers of inflammation-induced cholestasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14(7), 2599-2630. <https://doi.org/10.2741/3400>
- Mungunsukh, O., McCart, E. A., & Day, R. M. (2014). Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling. *Biomedicines*, 2(4), 301-326. <https://doi.org/10.3390/biomedicines2040301>
- Nuño-Lámbarri, N., Domínguez-Pérez, M., Baulies-Domenech, A., Monte, M. J., Marin, J. J., Rosales-Cruz, P., Souza, V., Miranda, R. U., Bucio, L., Montalvo-Jave, E. E., Concepción Gutiérrez-Ruiz, M., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J. C., & Gomez-Quiroz, L. E. (2016). Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9895176. <https://doi.org/10.1155/2016/9895176>
- Okada, K., Shoda, J., Taguchi, K., Maher, J. M., Ishizaki, K., Inoue, Y., Ohtsuki, M., Goto, N., Sugimoto, H., Utsunomiya, H., Oda, K., Warabi, E., Ishii, T., & Yamamoto, M. (2009). Nrf2 counteracts cholestatic liver injury via stimulation of hepatic defense systems. *Biochem Biophys Res Commun*, 389(3), 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.156>
- Olsavsky Goyak, K. M., Laurenzana, E. M., & Omiecinski, C. J. (2010). Hepatocyte differentiation. *Methods Mol Biol*, 640, 115-138. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7_6

- Onofrio, F. Q., & Hirschfield, G. M. (2020). The Pathophysiology of Cholestasis and Its Relevance to Clinical Practice. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 15(3), 110-114. <https://doi.org/10.1002/cld.894>
- Ortega-Ribera, M., Hunt, N. J., Gracia-Sancho, J., & Cogger, V. C. (2020). The Hepatic Sinusoid in Aging and Disease: Update and Advances From the 20th Liver Sinusoid Meeting. *Hepatol Commun*, 4(7), 1087-1098. <https://doi.org/10.1002/hep4.1517>
- Piscaglia, A. C., Campanale, M., Gasbarrini, A., & Gasbarrini, G. (2010). Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: State of the Art and New Perspectives. *Stem Cells International*, 2010, 259461. <https://doi.org/10.4061/2010/259461>
- Razori, M. V., Martín, P. L., Maidagan, P. M., Barosso, I. R., Ciriaci, N., Andermatten, R. B., Sánchez Pozzi, E. J., Basiglio, C. L., Ruiz, M. L., & Roma, M. G. (2020). Spironolactone ameliorates lipopolysaccharide-induced cholestasis in rats by improving Mrp2 function: Role of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Life Sci*, 259, 118352. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118352>
- Rodriguez-Boulán, E., & Macara, I. G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(4), 225-242. <https://doi.org/10.1038/nrm3775>
- Ruiz, M. L., Rigalli, J. P., Arias, A., Villanueva, S., Banchio, C., Vore, M., Mottino, A. D., & Catania, V. A. (2013). Induction of hepatic multidrug resistance-associated protein 3 by ethynylestradiol is independent of cholestasis and mediated by estrogen receptor. *Drug Metab Dispos*, 41(2), 275-280. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.047357>
- Salas-Silva, S., López-Ramírez, J., Barrera-Chimal, J., Lazzarini-Lechuga, R., Simoni-Nieves, A., Souza, V., Miranda-Labra, R. U., Masso, F., Roma, M. G., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Bucio-Ortiz, L., & Gomez-Quiroz, L. E. (2022). Hepatocyte growth factor reverses cholemic nephropathy associated with α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis in mice. *Life Sciences*, 295, 120423. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120423>
- Salas-Silva, S., Simoni-Nieves, A., Chávez-Rodríguez, L., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Bucio, L., & Quiroz, L. E. G. (2021). Mechanism of cholangiocellular damage and repair during cholestasis. *Annals of Hepatology*, 26, 100530. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2021.100530>
- Salas-Silva, S., Simoni-Nieves, A., Razori, M. V., López-Ramírez, J., Barrera-Chimal, J., Lazzarini, R., Bello, O., Souza, V., Miranda-Labra, R. U., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Gomez-Quiroz, L. E., Roma, M. G., & Bucio-Ortiz, L. (2020). HGF induces protective effects in α -naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis by counteracting oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 174, 113812. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113812>
- Sani, F., Sani, M., Moayedfard, Z., Darayee, M., Tayebi, L., & Azarpira, N. (2023). Potential advantages of genetically modified mesenchymal stem cells in the treatment of acute and chronic liver diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03364-x>
- Santos, J. S., Kemp, R., Ardengh, J. C., & Elias, J., Jr. (2012). Conservative management of cholestasis with and without fever in acute biliary pancreatitis. *World J Gastrointest Surg*, 4(3), 55-61. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v4.i3.55>
- Schwabe, R. F., & Luedde, T. (2018). Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(12), 738-752. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0065-y>
- Shan, Z., & Ju, C. (2020). Hepatic Macrophages in Liver Injury. *Front Immunol*, 11, 322. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00322>
- Shulpekova, Y., Zharkova, M., Tkachenko, P., Tikhonov, I., Stepanov, A., Synitsyna, A., Izotov, A., Butkova, T., Shulpekova, N., Lapina, N., Nechaev, V., Kardasheva, S., Okhlobystin, A., & Ivashkin,

- V. (2022). The Role of Bile Acids in the Human Body and in the Development of Diseases. *Molecules*, 27(11). <https://doi.org/10.3390/molecules27113401>
- Simoni-Nieves, A., Clavijo-Cornejo, D., Salas-Silva, S., Escobedo-Calvario, A., Bucio, L., Souza, V., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Miranda-Labra, R. U., & Gomez-Quiroz, L. E. (2021). HGF/c-Met regulates p22phox subunit of the NADPH oxidase complex in primary mouse hepatocytes by transcriptional and post-translational mechanisms. *Annals of Hepatology*, 25, 100339. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100339>
- Sohail, M. I., Dönmez-Cakil, Y., Szöllősi, D., Stockner, T., & Chiba, P. (2021). The Bile Salt Export Pump: Molecular Structure, Study Models and Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inherited BSEP Deficiencies. *Int J Mol Sci*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020784>
- Somagutta, M. R., Jain, M. S., Pormento, M. K. L., Pendyala, S. K., Bathula, N. R., Jarapala, N., Mahadevaiah, A., Sasidharan, N., Gad, M. A., Mahmutaj, G., & Hange, N. (2022). Bile Cast Nephropathy: A Comprehensive Review. *Cureus*, 14(3), e23606. <https://doi.org/10.7759/cureus.23606>
- Sun, L., Yang, N., Liu, Z., Ye, X., Cheng, M., Deng, L., Zhang, J., Wu, J., Shi, M., & Liao, W. (2024). Cholestasis-induced phenotypic transformation of neutrophils contributes to immune escape of colorectal cancer liver metastasis. *J Biomed Sci*, 31(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01052-3>
- Tanaka, Y., Aleksunes, L. M., Cui, Y. J., & Klaassen, C. D. (2009). ANIT-Induced Intrahepatic Cholestasis Alters Hepatobiliary Transporter Expression via Nrf2-Dependent and Independent Signaling. *Toxicological Sciences*, 108(2), 247-257. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp020>
- Thenappan, A., Li, Y., Kitisin, K., Rashid, A., Shetty, K., Johnson, L., & Mishra, L. (2010). Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver. *Hepatology*, 51(4), 1373-1382. <https://doi.org/10.1002/hep.23449>
- Ticho, A. L., Malhotra, P., Dudeja, P. K., Gill, R. K., & Alrefai, W. A. (2019). Bile Acid Receptors and Gastrointestinal Functions. *Liver Res*, 3(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.01.001>
- Tocan, V., Hayase, J., Kamakura, S., Kohda, A., Ohga, S., Kohjima, M., & Sumimoto, H. (2021). Hepatocyte polarity establishment and apical lumen formation are organized by Par3, Cdc42, and aPKC in conjunction with Lgl. *Journal of Biological Chemistry*, 297(6), 101354. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101354>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- Wagner, M., & Trauner, M. (2005). Transcriptional regulation of hepatobiliary transport systems in health and disease: Implications for a rationale approach to the treatment of intrahepatic cholestasis [10.1016/S1665-2681(19)32071-X]. *Annals of Hepatology*, 4(2), 77-99. [https://doi.org/10.1016/S1665-2681\(19\)32071-X](https://doi.org/10.1016/S1665-2681(19)32071-X)
- Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2019). Inflammation and Cell Death During Cholestasis: The Evolving Role of Bile Acids. *Gene Expr*, 19(3), 215-228. <https://doi.org/10.3727/105221619x15614873062730>
- Wu, J.-S., Li, Y.-F., Li, Y.-Y., Dai, Y., Li, W.-K., Zheng, M., Shi, Z.-C., Shi, R., Wang, T.-M., Ma, B.-L., Liu, P., & Ma, Y.-M. (2017). Huangqi Decoction Alleviates Alpha-Naphthylisothiocyanate Induced Intrahepatic Cholestasis by Reversing Disordered Bile Acid and Glutathione Homeostasis in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00938>
- Xia, X., Francis, H., Glaser, S., Alpini, G., & LeSage, G. (2006). Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol*, 12(22), 3553-3563. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i22.3553>

- Yang, W., Tao, Y., Wu, Y., Zhao, X., Ye, W., Zhao, D., Fu, L., Tian, C., Yang, J., He, F., & Tang, L. (2019). Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature Communications*, 10(1), 1076. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09046-8>
- Yeh, T. H., Krauland, L., Singh, V., Zou, B., Devaraj, P., Stolz, D. B., Franks, J., Monga, S. P., Sasatomi, E., & Behari, J. (2010). Liver-specific β -catenin knockout mice have bile canalicular abnormalities, bile secretory defect, and intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 52(4), 1410-1419. <https://doi.org/10.1002/hep.23801>
- Zhang, Y., Huang, X., Zhou, J., Yin, Y., Zhang, T., & Chen, D. (2018). PPAR γ provides anti-inflammatory and protective effects in intrahepatic cholestasis of pregnancy through NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 504(4), 834-842. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.035>
- Zhao, S., Jiang, J., Jing, Y., Liu, W., Yang, X., Hou, X., Gao, L., & Wei, L. (2020). The concentration of tumor necrosis factor- α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity. *Cell Death Dis*, 11(1), 70. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2264-z>
- Zhao, Y., Ye, W., Wang, Y. D., & Chen, W. D. (2022). HGF/c-Met: A Key Promoter in Liver Regeneration. *Front Pharmacol*, 13, 808855. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.808855>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00258

Matrícula: 2223803087

Caracterización de los
mecanismos de protección
inducidos por el HGF en un
modelo murino de colestasis
experimental.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas
del día 13 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO
DR. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA
DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR
DRA. NATALIA NUÑO LAMBARRI

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de
Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen
de Grado cuya denominación aparece al margen, para la
obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: MARICRUZ GARCIA BARRERA

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

APROBAR

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



MARICRUZ GARCIA BARRERA
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. VERONICA SOUZA ARROYO

VOCAL

DR. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA

VOCAL

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

SECRETARIA

DRA. NATALIA NUÑO LAMBARRI