



---

UNIDAD IZTAPALAPA

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Efecto de una dieta hipercolesterolémica en la regulación de la  
NADPH oxidasa mediada por HGF/c-MET

T E S I S

Que para obtener el grado de:  
DOCTOR EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Alberto Gabriel López Reyes

Director de tesis: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz

Co-Director: Dr. Julio Granados Arreola

Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Iztapalapa, México, D. F., 18 de Septiembre de 2015

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz, así como en el laboratorio de Inmunogenética del departamento de trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición Salvador Zubirán con el Dr. Julio Granados Arriola

El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 166042 y 131707).

El programa de doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registro 001482.

## COMITÉ TUTORAL

### DIRECTOR

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

mcgr@xanum.uam.mx

### CO-DIRECTOR

Dr. Julio Granados Arriola

Laboratorio de Inmunogenética

Departamento de Trasplantes

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

julgrate@yahoo.com

### ASESOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

legq@xanum.uam.mx

## MIEMBROS DEL JURADO

### PRESIDENTE

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
[legq@xanum.uam.mx](mailto:legq@xanum.uam.mx)

### SECRETARIO

Dra. Karina Martínez Flores.  
Laboratorio de Líquido Sinovial  
Dirección de Investigación Biomédica  
Instituto Nacional de Rehabilitación  
[karinabiologist@hotmail.com](mailto:karinabiologist@hotmail.com)

### VOCAL

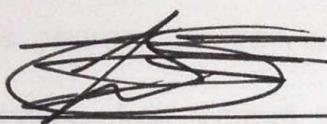
Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo.  
Laboratorio de Líquido Sinovial  
Dirección de Investigación Biomédica  
Instituto Nacional de Rehabilitación  
[dence\\_cc@hotmail.com](mailto:dence_cc@hotmail.com)

### VOCAL

Dr. José Luis Gómez Olivares  
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
[gool@xanum.uam.mx](mailto:gool@xanum.uam.mx)

Los miembros del jurado de designado por la División de Ciencias Biológicas y de la de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo Firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Efecto de una dieta hipercolesterolémica en la regulación de la NADHP oxidasa mediada por HGF/c-MET", con fecha \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2015.

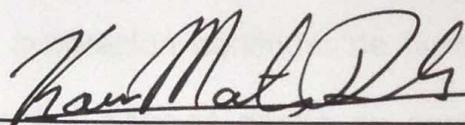
JURADO DE EXAMEN



PRESIDENTE

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

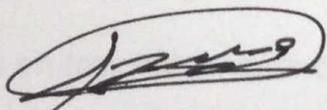
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa



SECRETARIA

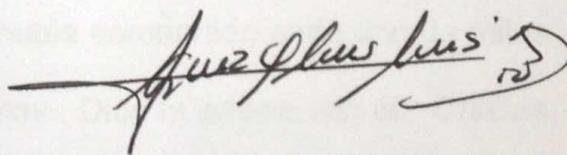
Dra. Karina Martínez Flores

Laboratorio de Líquido Sinovial  
Instituto Nacional de Rehabilitación



VOCAL

Dra. María del Refugio Clavijo Cornejo.  
Laboratorio de Líquido Sinovial  
Instituto Nacional de Rehabilitación



VOCAL

Dr. José Luis Gómez Olivares  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa

## DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a Marlid Cruz Ramos, quien ha creído en mi desde el primer día en que nos conocimos y ha impulsado este proyecto con amor, ternura pero sobre todo con una paciencia excepcional. Oso hoy cumpla la promesa de hacer el Doctorado y te lo dedico con el mismo amor que tú me has entregado durante estos años.

A mis padres, quienes con su ejemplo de superación continua, de humildad y dedicación, han forjado en mi el amor por las ciencias desde su punto más humanitario que es el hacer por el bienestar prójimo. De mi mayor gratitud Papá y Mamá por que hoy cumpla esta etapa arropado con su amor y cariño

A mis sobrinas Ma. José y Fátima, quienes aun sin entender muy bien de que se trata esto, con sus risas, sus loqueras y su amor conciben la alegría en los momentos más difíciles.

Con mucho amor para mi hermana con quien había compartido cada uno de estos pasos profesionales, pero que durante este último, Dios la arropo con él. Gracias por dejarme tu alegría en Jojo y Fafa.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a la Dra. Conchita Gutiérrez quien ha confiado en mí y se ha convertido en un ejemplo de vida personal y profesional.

*Teléfono: Dra. Conchita como esta..... Querido la tesis*

Al Dr. Granados quien desde mi llegada al DF creyó en mí y quien con su ejemplo de desempeño humano y profesional, lo considero mi mentor.

*Teléfono: Como estamos Dr. Granados..... Beto muy contento trabajando*

Al Dr. Luis Gómez quien con sus logros es ejemplo de superación profesional y de quien aprendía en cada una de las charlas que tenía con él ya fueran científicas o vinícolas.

Al Dr. Carlos Pineda por su apoyo incondicional y por ser guía en este nuevo camino de mi vida profesional.

*Como vamos Dr. Pineda... Hay que publicar más*

A los doctores: Dra. Karina Martínez, Dra. Denise Clavijo y Dr. José Luís Olivares, quienes fueron parte fundamental de este proyecto al brindar su tiempo y dedicación para evaluar este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a Kary y Deni, ex-compañeras de Laboratorio de fisiología celular y ahora compañeras de trabajo del laboratorio de Líquido Sinovial, por brindarme de manera incondicional su amistad así como su apoyo durante este camino en el mundo de la UAM

A mis maestros del Laboratorio de Fisiología Celular de la UAM, por sus enseñanzas y apoyo incondicional. Dra. Vero y Dra. Leti

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular de la UAM, Mayrita, Natalia, Cristina, y Arturo, quienes hicieron placentera mi estadía en el laboratorio.

Mi total gratitud a Javi, Yessi, Moni, Gaby, Marwin, Cristina y Josué, quienes forman parte de los alicientes por los cuales se logran alcanzar estas metas, y de quienes aprendo día a día.

A mis hermanos José y Rubén, quienes al igual que sus esposas Nonita y Pau, siempre han estado presentes en esos momentos difíciles y han arropado a Marlid y a mí.

A mis tíos Rafa, Juanjo, Luis, quienes durante este camino profesional me han brindado su amor y su apoyo

Al Instituto Nacional de Rehabilitación por brindarme la oportunidad y las herramientas para culminar esta etapa.

A todas aquellas personas que de manera directa o indirecta han contribuido en el desarrollo de este trabajo, Gracias!!

*LA CIENCIA QUE NO SE VE, NO EXISTE*

## RESUMEN

El incremento en la prevalencia de la obesidad en el mundo, está co-adyuvando al desarrollo de varias enfermedades crónicas degenerativas, entre ellas las relacionadas con el hígado. Datos experimentales revelan que es el tipo de lípido, más que el contenido de ellos, lo que condiciona la susceptibilidad al daño hepático. La sobrecarga de colesterol en el hígado conduce al agravamiento en el daño inducido por otros agentes tóxicos, sin embargo poco se ha explorado con respecto al estado que guarda la protección celular, sobre todo aquella mediada por la NADPH oxidasa e inducida por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El objetivo de este trabajo fue evaluar en hepatocitos, el efecto de la sobrecarga de colesterol en el proceso de protección mediado por la vía de HGF/NADPH oxidasa. Los resultados muestran que la administración de una dieta hipercolesterolémica en durante dos días a ratones C57/BL6 de 8 semanas induce daño hepático y esteatosis. Los hepatocitos aislados de estos animales mostraron una sobreactivación de la oxidasa y por tanto el establecimiento de estrés oxidante celular, que condiciona el tratamiento con HGF. A pesar de que la dieta hipercolesterolémica disminuyó la expresión proteica de las subunidades catalíticas y reguladoras de la NADPH oxidasa, este sistema incremento de su actividad, lo que promovió la expresión del factor de transcripción Nrf2 que responde ante situaciones de estrés oxidante. En conclusión, la sobre sobrecarga de colesterol impide la protección hepática mediada por el sistema HGF/NADPH oxidasa.

Palabras claves: Colesterol, Hepatocitos, Esteatosis, NADPH oxidasa, HGF

## **ABSTRACT**

The increment in the prevalence of obesity incidence in Mexico is leading to the increase in many chronic maladies, including liver diseases. It is well known that lipid-induced liver sensitization is related to the kind of lipid rather than the amount of them in the organ. Cholesterol overload in the liver aggravates the toxic effects of canonical liver insults. However, the status on the repair and survival response elicited by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and the hepatocyte growth factor (HGF) is not completely understood. In the present, work we aimed to figure out the HGF/NADPH oxidase-induced cellular protection in the hepatocyte with a cholesterol overload. Our results show that a hypercholesterolemic diet induced liver damage and steatosis in mice. The hepatocytes isolated from these animals exhibited an increase in basal NADPH oxidase activity, although transcriptional levels of some of its components were decreased. No effect on the oxidase activity was observed in HGF treatments. The protective effect of HGF was abrogated as a result of cholesterol cellular overload, calculated by a survival assay. In conclusion, the cholesterol overload in hepatocytes impairs the HGF/NADPH oxidase-induced cellular protection.

## Lista de abreviaturas

AA: Antimicina

AGL: Ácidos grasos libres

ALT: Alanino aminotransferasa

AST: Aspartato aminotransferasa

ATP: Adenosin trifosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

Ca: Calcio

CB: Cálculo biliar

CEH: Células estelares hepáticas

DHE: Dihidroetidio

DNA: Ácido desoxiribonucleotido

DPI: Difenilneiodonio

EGHNA: Enfermedad Grasa del Hígado no-Alcohólica

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

ERO: Especies reactivas de oxígeno

HC dieta: Hipercolesterolemia dieta

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HGF: Hepatocyte growth factor (por sus siglas en ingles)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

IL-6: Interleucina 6

IMC: Índice de masa corporal

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducible

LB: Litiasis biliar

MDA: Malonildialdehído

NAFLD: Non alcoholica Fatty Liver Diseases (por sus siglas en inglés)

NADPH oxidasa: Dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidasa

ON: Óxido nítrico

ONOO<sup>-</sup>: Radical peroxinitrito

PBS: Buffer salino de fosfatos

RL: Radicales libres

RI: Resistencia a la insulina

SFB: Suero fetal bovino

SOD: Superóxido dismutasa

TC: Colesterol total

TG: Triglicéridos

TNF-  $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral (por sus siglas en ingles)

4-HNE: 4-hidroxinonenal

## **ÍNDICE**

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	03
1. INTRODUCCIÓN	04
1.1. Hepatopatía grasa no-alcohólica	06
1.2. Del hígado graso a esteatohepatitis no-alcohólica	08
1.3. NADPH oxidasa en el establecimiento de NASH	13
1.4. Litiasis vesicular (LB)	17
2. ANTECEDENTES	28
3. HIPOTESIS	20
4. OBJETIVOS	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1. Animales y tratamiento	21
5.2. Diseño experimental	21
5.3. Histología	22
5.4. Pruebas bioquímicas y función hepática	22
5.5. Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos	22
5.6. Determinación de colesterol libre con filipina	23
5.7. Determinación de lípidos neutros con aceite rojo "O"	23
5.8. Actividad de la NADPH oxidasa	24
5.9. Extracción y determinación de proteína	25
5.10. Análisis del contenido proteico por <i>immunoblot</i>	25
5.11. Ensayo de viabilidad	26
5.12. Análisis ecográfico	27

5.13 Análisis de Líquido biliar por microscopía de luz polarizada	<b>27</b>
5.14 Análisis estadístico	<b>27</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
6.1 Morfología y disfuncionalidad hepática inducida por una dieta HC	<b>28</b>
6.2 Daño tisular en el parénquima hepático por la sobrecarga de colesterol	<b>30</b>
6.3 La dieta HC incrementa colesterol y TG en hepatocitos	<b>31</b>
6.4 El HGF es incapaz de disminuir la producción de ERO producidas por NADPH oxidasa en hepatocitos HC	<b>32</b>
6.5 La sobrecarga de colesterol disminuye la expresión proteica del sistema de protección HGF/NADPH oxidasa	<b>33</b>
6.6 El HGF es incapaz de mantener la viabilidad del hepatocito con alto contenido de colesterol	<b>34</b>
6.7 La presencia de colesterol a nivel de la vesícula biliar induce estrés oxidante afectando la respuesta antioxidante	<b>35</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>8. CONCLUSION</b>	<b>40</b>
<b>9. REFERENCIAS</b>	<b>41</b>
<b>10. ARTÍCULO</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Historia natural de la progresión de la obesidad a esteatohepatitis	<b>07</b>
<b>2</b>	Estructura de las NADPH oxidasas y su mecanismo de activación	<b>14</b>
<b>3</b>	Clasificación de las NADPH oxidasas de acuerdo a sus dominios	<b>15</b>
<b>4</b>	Cambios ecográfico, macroscópico y microscópico inducidos por una dieta HC	<b>29</b>
<b>5</b>	Cambios sistémicos y de funcionalidad	<b>29</b>
<b>6</b>	Evidencia a nivel histológico de esteatosis por una dieta alta en colesterol (HC)	<b>30</b>
<b>7</b>	Contenido de colesterol y triglicéridos en cultivo primario de hepatocitos	<b>31</b>
<b>8</b>	Efecto del HGF sobre la actividad de la NADPH oxidasa como fuente de ERO con dieta alta en colesterol	<b>32</b>
<b>9</b>	Efecto de una dieta HC sobre la expresión del sistema HGF/NADH oxidasa	<b>33</b>
<b>10</b>	Viabilidad celular	<b>34</b>
<b>11</b>	Efecto de los cristales de colesterol en la expresión proteica de vesícula biliar	<b>35</b>
<b>Tabla</b>		
<b>1</b>	Anticuerpos empleados en el inmunoblot.	<b>55</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

A partir del siglo XX la revolución industrial en Latinoamérica suscitó cambios importantes que repercutieron en la salud de la población, ya que se incrementó la expectativa de vida, exposición a sustancias tóxicas y tal vez una de las más importantes, el cambio en los hábitos alimenticios y la disminución de la actividad física, los cuales han incrementado la prevalencia de la obesidad (Méndez-Sánchez et al, 2004).

La obesidad representa el principal problema de salud de nuestra sociedad, ya que al lado de la diabetes, las dislipidemias, el síndrome metabólico y el hígado graso se consideran desórdenes pandémicos que afectan a más de un tercio de la población en las últimas décadas (Berlanga et al., 2014; Popkin et al., 2012).

En el contexto de los desórdenes metabólicos asociados a la obesidad, se circunscribe a la Enfermedad Grasa del Hígado no-Alcohólica (EGHNA--NAFLD) la cual incluye esteatosis simple, esteatohepatitis no-alcohólica (NASH por sus siglas en inglés), fibrosis y cirrosis. La NAFLD se caracteriza por tener un potencial para el desarrollo de carcinoma hepático y la falla hepática (Del Ben et al, 2014; Lirussi et al, 2007; Adams et al, 2005; Angulo, 2002). Generalmente, la NAFLD se asocia con una serie de enfermedades tales como obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia, enfermedad celíaca, así como a la exposición a diversos fármacos, toxinas, y procedimientos quirúrgicos (derivación yeyuno-ileal y otras operaciones en el tracto gastrointestinal) (Lirussi et al, 2007). Esta condición clínico-patológica se caracteriza por la infiltración de grasa en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol (Berlanga et al, 2014).

Aunque se asume que el hígado graso es el resultado de la acumulación de triglicéridos, el daño potencial de otros lípidos como el colesterol ha sido documentado. El colesterol es un lípido de importancia biológica en el que, en condiciones normales el hígado es capaz de regular y esterificar de forma eficiente, pero que en condiciones de sobrecarga puede convertirse en un mediador tóxico en la NAFLD o en la esteatohepatitis (Gutiérrez-Ruiz et al, 2012; Mari et al, 2006).

Existen reportes que sugieren al estrés oxidante como uno de los mecanismos clave para acelerar la progresión de esteatosis a NASH, por el desbalance entre agentes antioxidantes y pro oxidantes como la NADPH oxidasa. Esto se debe a que la NADPH oxidasa no es exclusiva de células fagocíticas, existe NADPH oxidasa no fagocítica en diferentes tipos celulares, entre ellas células hepáticas y pancreáticas que se activan por la acción de agonistas como la angiotensina II y es capaz de generar anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y otras especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales están implicadas en el daño a las células hepáticas (Del Ben et al, 2014; Bedard y Krause, 2007; Colmenero et al, 2007; Chen et al 1997).

Existen sustancias y moléculas antioxidantes con la capacidad de inhibir la síntesis de ERO o de secuestrar las ERO, ya existentes.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF por sus siglas en inglés) tiene propiedades pro-apoptóticas y en la actualidad se estudia su papel antioxidante como regulador negativo de la actividad de la NADPH oxidasa (Clavijo-Cornejo et al, 2013; Gómez-Quiroz et al, 2008). El factor de crecimiento de hepatocitos se identificó originalmente en 1984 como un potente mitógeno hepático. Hoy en día, el HGF participa en múltiples funciones, las cuales dependerán del tipo celular

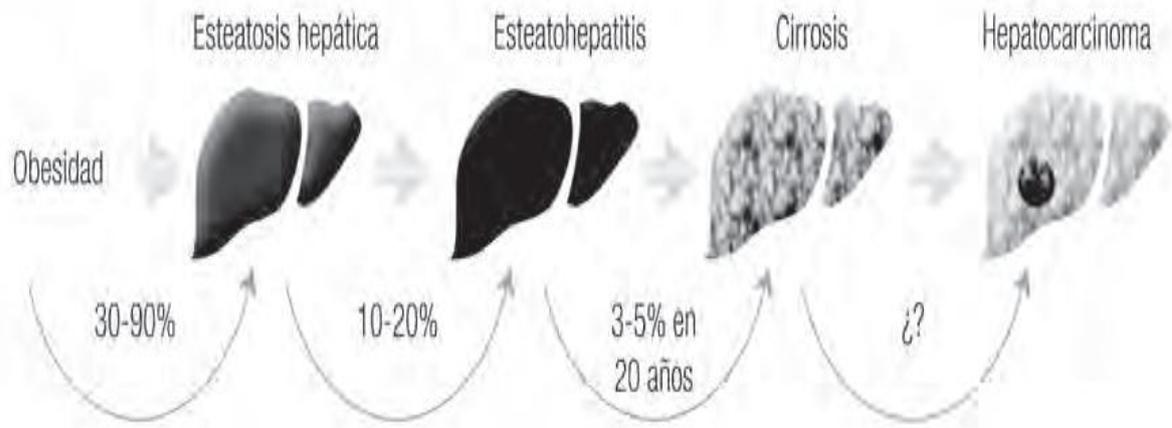
sobre el cual actúen. La actividad del HGF depende de la unión con su receptor c-Met (Cellular-mesenchymal epitelial transition factor) un proto oncogen que regula una complicada vía de señalización a través de la activación de las proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK). La activación de MAPK inducirá mecanismos de proliferación, transformación, diferenciación, apoptoisis, tubulogénesis, así como un control de la respuesta antioxidante (Clavijo-Cornejo et al. 2013; Palestino-Domínguez et al. 2012; Trusolino T et al.2010).

### **1.1 HEPATOPATIA GRASA NO-ALCOHOLICA**

La NAFLD, es la principal causa de enfermedad crónica del hígado en el mundo con una prevalencia superior al 30% de la población adulta y representa la causa más frecuente de hipertransaminasemia persistente (Musso et al, 2010).

Existen factores metabólicos, nutricionales, inflamatorios, autoinmunes, así como el consumo de fármacos y tóxicos que generan la NAFLD (Berlanga et al, 2014).

La patogénesis de la NAFLD comprende desde un simple depósito de grasa en el hígado (esteatosis), que tiene un curso clínico benigno, pero que, si se acompaña por un proceso inflamatorio genera cambios en el hígado que dan lugar a la esteatohepatitis no-alcohólica (NASH) descrita por Jurgen Ludwing en 1980 a la que reconoció como un estadio progresivo hacia el desarrollo de enfermedades más severas del hígado como la fibrosis, la cirrosis y el hepatocarcinoma como se muestra en la figura 1 (Uribe, M, 2008; Lazo et al, 2008; Solis-Herruzo, 2006; Schaffner y Thaler, 1986; Ludwing et al, 1980).



**Figura 1.** Historia natural de la progresión de la obesidad esteatohepatitis.

La NASH es un proceso crónico que puede avanzar a fibrosis y es responsable de la mayoría de los casos de cirrosis criptogénica con una expectativa de vida de 5-10 años en el 67% para pacientes que se complican con hipertensión y del 59 % para aquellos que desarrollan hepatocarcinoma (Propst et al, 1995)

El curso inflamatorio de la NASH implica el reclutamiento de linfocitos polimorfonucleares y mononucleares sobre el parénquima hepático compuesto por hepatocitos y la activación de células de Kupffer (macrófagos residentes), que inducen estrés oxidante generado por la formación de radicales libres (RL) (Tilg y Diehl, 2000).

Datos clínicos, epidemiológicos y bioquímicos sugieren que la NASH es una manifestación del síndrome metabólico, la cual es acompañada de alteraciones metabólicas de los lípidos, incluyendo hipertrigliceridemia y/o hipercolesterolemia, obesidad, resistencia a la insulina (RI) y diabetes mellitus tipo 2 principalmente (Bellentani et al 2009; Browning y Horton, 2004).

De acuerdo a lo reportado por el Instituto Nacional de Salud Pública, del año 1994 al 2000, la prevalencia de las dislipidemias incremento un 21%, mientras que en una sub-población con peso normal se detectó la presencia de hipercolesterolemia en un 42.6% de los cuales solo el 6% había sido diagnosticado (Aguilar-Salinas et al, 2010). La prevalencia de NASH en México no se conoce con precisión, sin embargo, extrapolando los datos de sobrepeso, obesidad y dislipidemias de la encuesta nacional de salud y nutrición (ENSANUT, 2012) en la que revela que un 68.9% de niños y niñas entre 5 y 11 años padecen sobrepeso u obesidad al igual que un 71.2% de adultos de más de 20 años, se predice a la NAFLD como la principal causa de enfermedad hepática para el año 2020 (ENSANUT, 2012).

## **1.2 DEL HIGADO GRASO A ESTEATOHEPATITIS NO-ALCOHOLICA**

Se estima que el 5 % de pacientes con hígado graso progresa a cirrosis, como consecuencia de la resistencia a la insulina que da pie al aumento de la lipólisis con liberación de grandes cantidades de ácidos grasos libres (AGL). Cuando esto ocurre, el hígado que ocupa un lugar estratégico en el curso de la sangre portal que recibe los AGL, lo que origina la esteatosis (Fernández-Rodríguez et al, 2006; Adams et al, 2005). Los AGL almacenados en los hepatocitos pueden seguir diversas rutas metabólicas como la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, en la gluconeogénesis o bien ser oxidados en las mitocondrias, peroxisomas o en los microsomas. Estas oxidaciones pueden conducir a estrés oxidante celular, ya que la beta-oxidación de la mitocondria genera ERO como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), durante la fosforilación oxidativa, por otro lado la beta-oxidación de los peroxisomas genera peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), finalmente la oxidación de los

microsomos con ayuda de los citocromos P-450 conduce a la formación tanto de  $O_2^-$  como de ácidos dicarboxílicos, con lo que se evidencia que si la RI es crucial para la patogénesis del hígado graso, el estrés oxidante es definitivo en su evolución a NASH ya que este último puede determinar la peroxidación lipídica, la degeneración y necrosis de las células, la muerte por apoptosis, formación de aldehídos reactivos como el malonildialdehído (MDA), la expresión de citocinas inflamatorias, la activación de células estelares hepáticas (CEH) y la fibrogénesis (Chittury y Farrell, 2001; James y Day, 1999).

La disfunción mitocondrial participa de manera decisiva en la génesis del hígado graso y en el origen del estrés oxidante ya que están implicadas en la beta-oxidación de los AGL y en la generación de ERO (Pessayre et al, 2002; Esposito et al, 1999).

Para que los AGL se trasloquen a la mitocondria es necesario que los AGL se unan a la carnitina mediante las enzimas carnitin-palmitoil transferasa CPT-1 y una traslocasa, si existe una deficiencia de estas enzimas los AGL se retienen en el citoplasma y se reesterifican a triglicéridos. Después de translocar a la matriz mitocondrial, se realizan una serie de reacciones de beta-oxidación (anabólicas) que tiene como producto principal acetil-CoA y el agente reductor NADH (James y Day, 1999; Yamamoto et al, 1996; Browyer et al, 1988). La acetil-CoA entra al ciclo de Krebs donde reacciona con el oxalaceto donde produce citrato compuesto de 6 átomos de carbono que después de una serie de reacciones de descarboxilación genera más moléculas de NADH. Mediante un proceso de fosforilación oxidativa los electrones cedidos por los agentes reductores a la cadena transportadora de electrones internalizan protones al espacio

intermembrana a través de los complejos mitocondriales (I a V). Cuando estos protones regresan a través de la ATPasa (complejo V) se genera la conversión de ADP a ATP y los electrones son tomados por el oxígeno para generar H<sub>2</sub>O (Fromenty y Pessayre, 2005).

Durante este proceso es normal que se escapen electrones y que tras unirse al oxígeno de la matriz mitocondrial den lugar a la formación de ERO, principalmente O<sub>2</sub><sup>-</sup>; por lo que una disfunción mitocondrial en condiciones de altas cantidades de AGL disminuye la formación de ATP y aumenta la cantidad de ERO (Wallace, 1999; Fromenty y Pessayre, 1995; Halliwell, 1994).

Las ERO resultantes, con la finalidad de encontrar estabilidad electrónica, oxidan los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas mitocondriales y plasmáticas, las que dan lugar a la formación de MDA y 4-hidroxi nonenal (4-HNE), los cuales inhiben al citocromo C del complejo 4 disminuyendo la función mitocondrial y potenciando la generación de ERO, las cuales pueden dañar al DNA mitocondrial y enzimas con núcleo hierro-sulfuro y con ello determinar la hipofunción de la cadena transportadora de electrones (Chen et al, 2000).

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa) derivado de los adipocitos no solo juega un papel crucial en la RI al inhibir al sustrato receptor de insulina (IRS)-1 tras la fosforilación en serina, sino que también juega un papel importante en la disfunción mitocondrial debido a una interferencia en el flujo de electrones en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, al quedar retenidos estos electrones en el citocromo b estos escapan reaccionando con el oxígeno generando ERO (Hui et al, 2004; Crespo et al, 2001, Sánchez-Alcázar et al, 2003; Sánchez-Alcázar et al, 2000). Por otro lado, TNF-alfa induce la expresión génica

de diversas citocinas inflamatorias y enzimas como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), enzima que cataliza la oxidación de la L-arginina que en presencia de oxígeno sintetiza citrulina y óxido nítrico (ON) (Solis-Herruzo, 2006; Tilg y Diehl, 2000).

El ON generado altera la función mitocondrial al bloquear al citocromo C e impedir el flujo de electrones lo que genera  $O_2^{\cdot-}$ , el cual al reaccionar con las concentraciones elevadas de ON dan lugar a radical peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), un radical libre altamente reactivo, que oxida al DNA y nitra los residuos de tirosina de las proteínas, disminuyendo la actividad funcional de las proteínas de la cadena transportadora de electrones (Radi et al, 2002; Radi et al, 2002; Szabó, 1996).

La alta concentración de AGL generados por la lipólisis como producto de la RI, al llegar al hígado y encontrarse con un ambiente oxidante ocasionado por una disfunción mitocondrial, induce la oxidación mitocondrial (Solis-Herruzo, 2006). Las ERO generadas no solo reaccionan con los AGL también pueden peroxidar lípidos de las membranas mitocondriales y alteran propiedades físico-químicas de las membranas lo que repercute en la actividad de las enzimas y receptores de membrana, en las interacciones intercelulares y la permeabilidad de la membrana, lo cual compromete la viabilidad celular y muerte por necrosis (Jenkins et al, 1982; Hegner y Platt, 1975).

Se sabe que los productos de oxidación de AGL y lípidos como el MDA y el 4HNE no solo inhiben la citocromo C, sino que participan en la fibrogénesis hepática al estimular la expresión del gen de colágena-1 utilizando como mediadores al factor de transcripción Sp-1 y SP-3 (Solis-Herruzo, 2006; Jian et al, 1997).

Mediante la activación de otros factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF-kB) y c-Myb, el estrés oxidante induce la activación y proliferación de las células estelares hepáticas (CEH), lo cual contribuye a la fibrogenesis hepática. NF-kB induce la expresión de TNF-alfa, molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1, por sus siglas en inglés), proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1, por sus siglas en inglés), la interleucina-6 (IL-6) y citocina inducida quimioatrayente de neutrofilos (CINC, por sus siglas en inglés) con lo que se justifica la presencia de infiltrados inflamatorios en NASH (Maher y Scott, 1996).

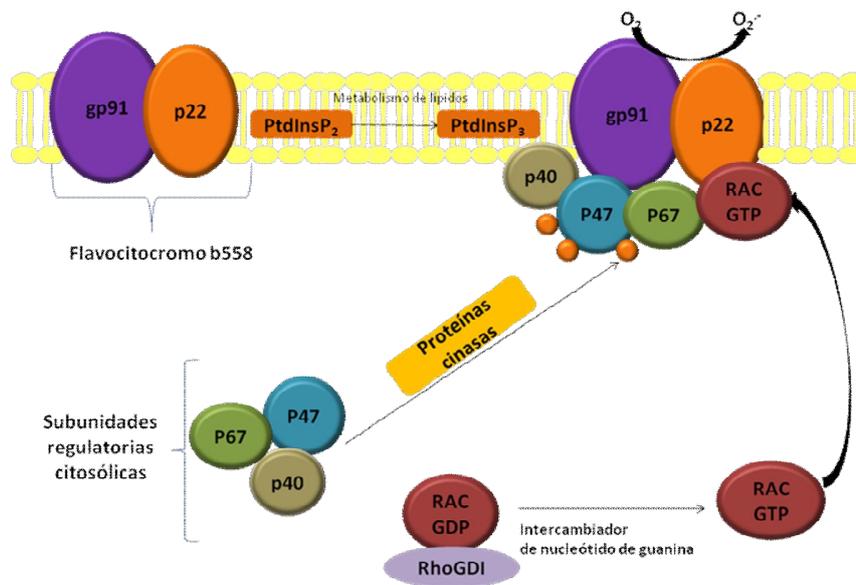
El estrés oxidante, los AGL y el TNF-alfa, pueden regular el mecanismo de muerte celular por apoptosis, ya que las ERO aumentan la expresión del ligando de FAS en la superficie de los hepatocitos y de esta manera inducir la apoptosis de ellos, ya que al unirse FAS ligando su recetor activa la procaspasa 8 y el factor Bid, el cual modifica a Bax y favorece la formación de canales en la membrana de las mitocondrias que da lugar a la liberación de la citocromo C, activando la vía intrínseca de la apoptosis al conformar el apoptosoma complejo integrado por citocromo C-Apaf.caspasa 9 (Lam et al, 2003;Feldstein et al, 2003;Feldmann et al, 2000;Pessayre et al, 2000).

Estas no son las únicas fuentes generadoras de ERO, existe la NADPH oxidasa de la familia de las NOX que se expresa en los hepatocitos implicada en la producción de ERO y en consecuencia de alteraciones celulares que inducen a la progresión de NASH (Solis-Herruzco, 2006).

### 1.3 NADPH OXIDASA EN EL ESTABLECIMIENTO DE NASH

La NADPH oxidasa (NOXs) fue originalmente identificada como un componente clave del sistema inmunitario para combatir agentes patógenos. Sin embargo, células del parénquima hepático y no parenquimatoso expresan diferentes miembros de la familia de las NOX. Su función como un complejo enzimático es catalizar la reducción de un electrón del oxígeno que, acoplado con la oxidación de NADPH, resulta en la producción de  $O_2^{\cdot-}$ . La producción de  $O_2^{\cdot-}$  es seguida por su dismutación a  $H_2O_2$  espontáneamente o a través de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Babelova et al, 2012; Cuypers et al, 2010).

La NADPH oxidasa está constituida por una subunidad catalítica gp91<sup>phox</sup> y una regulatoria p22<sup>phox</sup>, que forman al flavocitocromo b558, las cuales interactúan con elementos reguladores que por lo general se encuentran en el citosol como: p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y la GTPasa de Rac que se encuentra unida a la proteína inhibidora RhoGDP-inhibidor de disociación (RhoGDI) (Cui et al, 2011; De Minics y Brenner, 2007; Bokoch y Zhao, 2006; Lambeth, 2004; Babior, 1999; Someya et al, 1999). Tras una estimulación, las proteínas citosólicas reguladoras traslocan a la membrana donde interactúan con la flavoproteína b558 favoreciendo la actividad de la NADPH oxidasa (Fig. 2) con la finalidad de producir grandes cantidades de  $O_2^{\cdot-}$  para combatir infecciones microbianas (Ago et al, 2003; Ago et al, 1999).



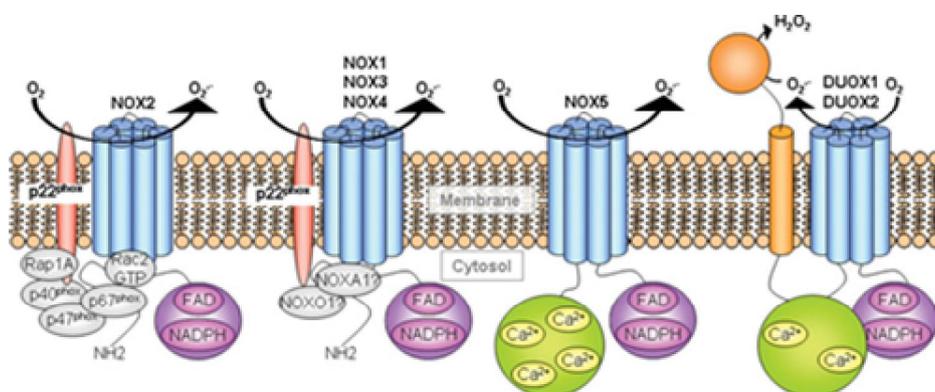
**Figura 2.** Estructura de la NADPH oxidasa y su mecanismo de activación.

Los complejos NADPH oxidasa no fagocíticos son estructural y funcionalmente similares a los fagocíticos, al generar  $O_2^{\cdot -}$  por una reducción molecular del oxígeno. Los niveles de ERO en la forma no fagocítica de la NADPH oxidasa son apenas un pequeño porcentaje comparado con los generados por NADPH oxidasa fagocítica (Brandes y Kreuzer, 2005).

La NADPH oxidasa fagocítica es un complejo constitutivamente activo que genera niveles basales bajos de ERO, pero que en respuesta a un agonista como Angiotensina II libera altos niveles de fuentes oxidantes. Se sabe que las ERO producidas en respuesta a un agonista, estimula de alguna manera vías intracelulares en sistemas redox (Bedard y Krause, 2007; Bataller et al, 2003; Wang et al, 2002).

Las NADPH oxidasas son clasificada de acuerdo al tipo de ERO que generen y de acuerdo a su composición en las subunidades (Babelova et al, 2012).

Existen tres NADPH oxidasa con un dominio gp91<sup>phox</sup> (NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4), cuya estructura y tamaño es similar, estas contienen un sitio de unión al sustrato NADPH y otro a FAD. De acuerdo a su topología este grupo de oxidasas se encuentran en la membrana y reducen oxígeno a través de la membrana para generar O<sub>2</sub><sup>-</sup> y en una segunda reacción de dismutación, dos moléculas de O<sub>2</sub><sup>-</sup> generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el que entre otras cosas puede funcionar como un sustrato para enzimas tipo peroxidasas y propagar el daño. Otro tipo de NADPH oxidasa es NOX5, que se encuentra constituida por una estructura básica de gp91<sup>phox</sup>, pero con un dominio extra en la parte amino denominado de calmodulina que contiene 4 sitios de unión para calcio (Ca). El Ca cuando se une al dominio de calmodulina provoca un cambio conformacional, exponiendo los residuos hidrofóbicos que unen y regulan a las enzimas blanco. El tercer grupo de oxidasas es el DUOX, con estructura similar a NOX5, conteniendo en la parte amino terminal un dominio homólogo a peroxidasa y el dominio de unión a Ca, el dominio peroxidasa se encuentra en la parte extracelular de la membrana. La importancia de este dominio en DUOX es que se encarga de generar ERO (Fig. 3) (Lambeth, 2004).



**Figura 3.** Clasificación de las NADPH oxidasa de acuerdo a sus dominios.

La estructura de la NADPH oxidasa no fagocítica expresada en las CEH del hígado no es conocida con exactitud, pero lo que sí es claro que p47<sup>phox</sup> y que requiere de Rac-1. Rac-1 es una proteína GTPasas de la familia Rho que regula la proliferación celular y reorganiza dinámicamente la actina del citoesqueleto. Por esta razón estas proteínas son componentes cruciales en el funcionamiento de la NADPH oxidasa de las CEH (De Minics y Brenner, 2007; De Minics et al, 2006).

Recientemente se ha propuesto una acción secundaria importante de la NADPH oxidasa, en la regulación de la biología celular del hígado ya que los altos niveles de ERO producidos por las células de Kupffer protegen al hígado de patógenos externos, por otro lado las bajas concentraciones de ERO producidas por las células no fagocíticas participan activamente en la regulación de las señales intracelulares en las CEH (Takeya y Sumimoto, 2006; Takeya et al, 2006; Adachi et al, 2005; Bataller et al, 2003).

Esto ha llevado a que se investigue el potencial rol de NADPH oxidasa como un mediador de diferentes agonistas pro-fibrogénicos involucrados en la fibrosis hepática (Bataller et al, 2003). La importancia de la NADPH oxidasa durante el daño hepático fue demostrada por un análisis de microarreglos realizado en tejido de pacientes con NASH, el cual mostró una sobre-expresión del gen de la NADPH así como de genes relacionados (Colmenero et al, 2007; Albado, 2006).

La angiotensina II ejerce un papel regulador en vías de señalización intracelular utilizando a la NADPH oxidasa como un mediador en las CEH esto se demostró cuando se observó una atenuación de la inflamación y la fibrosis al utilizar inhibidores de la angiotensina II (Bataller et al, 2005; Bataller et al, 2003).

La angiotensina II induce fosforilación de p47phox a través del receptor AT1 de la angiotensina (Croquet et al, 2002; Wei et al, 2000).

Recientes estudios sugieren que no solo los bloqueadores de la angiotensina II deprimen las ERO producidas por la NADPH oxidasa y las complicaciones que esto conlleva en la activación de procesos inflamatorios y fibrogénicos, por lo que se proponen sustancias o moléculas con capacidad antioxidante. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) ha mostrado tener un efecto antioxidante mostrando un efecto protector en la nefropatía diabética al disminuir los niveles de MDA y de glutatión oxidado (De Minics y Brenner, 2007).

#### **1.4 Litiasis Vesicular (LB)**

Además del hígado que es afectado por una dieta alta en colesterol, la vesícula biliar se ve comprometida con la litiasis. La litiasis es una enfermedad que se caracteriza por alteraciones en la homeostasis del colesterol y el metabolismo de las sales biliares, lo que origina disminución de la solubilidad del colesterol y su precipitación en la bilis. Existen dos tipos de cálculos biliares (CB), los pigmentarios y los de colesterol; estos últimos se presentan con una mayor frecuencia del 75-89% de todos los casos de LB, y los cuales se tratan a continuación. La colelitiasis es la formación de cálculos de colesterol en la vesícula biliar y en ocasiones también pueden presentarse en los conductos biliares intra y extra-hepáticos. El mecanismo de formación de cálculos de colesterol no se conoce del todo; sin embargo, en la patogénesis del proceso se identifican 3 fases: 1) La fase de sobresaturación de la bilis, 2) La fase de nucleación del colesterol en la bilis, y 3) La fase de hipomotilidad de la vesícula, cuando ésta ya

no se contrae lo suficiente para vaciar regularmente su contenido. Los factores etiopatogénicos críticos para la formación de CB son: una hipersecreción y elevación de triglicéridos, tabaquismo y diabetes mellitus (Méndez y Uribe 2008; González-Hita et al, 2005).

El principal factor de riesgo nutricional en el desarrollo de CB es la obesidad. La incidencia de LB se eleva en forma paralela al incremento del índice de masa corporal (IMC); 35% de las mujeres con  $IMC > 32 \text{ kg/m}^2$ , presentan CB. El mecanismo por el cual se forman estos cálculos no está claramente definido, se ha encontrado que los obesos, sintetizan una mayor cantidad de colesterol en hígado, el cual se secreta en cantidades excesivas, lo que origina sobresaturación de la bilis (Méndez y Uribe 2008; González-Hita et al, 2005).

## **2 ANTECEDENTES**

En la actualidad, la población mexicana tanto adulta como infantil presenta una prevalencia muy alta de obesidad. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) señala que 47.9 millones de mexicanos presentan sobrepeso y obesidad y cerca de un 43% presenta algún desorden en el metabolismo de lípidos como hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia y sólo un 6% lo sabe mediante diagnóstico médico. Además, varios estudios señalan que el mexicano tiene una predisposición genética al síndrome metabólico y que en su dieta, el consumo de grasas es superior al valor recomendado (Tellez-Ávila et al, 2008), lo que lleva a considerar que una proporción muy alta de la población mexicana padece o tiende a desarrollar hígado graso o esteatosis, considerando esta condición como un antecedente de enfermedades hepáticas más severas. En la

última década se han realizado importantes avances que nos han permitido una mejor comprensión de la patogénesis en algunas enfermedades hepáticas y se ha demostrado que el estrés oxidante participa en gran medida en el inicio y la progresión del daño hepático. Por lo que el desbalance del estado redox celular y/o el estrés oxidante determina en gran medida el inicio y progresión de los distintos estadios patológicos en el hígado, es por ello que la esteatosis no alcohólica con hipercolesterolemia ha recibido gran atención desde el punto de vista del tratamiento clínico. Por otra parte se conoce por estudios en nuestro grupo el papel protector del HGF en procesos de daño hepático, sin embargo no se conoce la participación de HGF/c-Met en el control del estado redox en la esteatosis producida por una dieta hipercolesterolémica (Enriquez-Cortina et al, 2013; Clavijo-Cornejo et al, 2013; Gutierrez-Ruiz et al, 2012; Valdés-Arzate et al, 2009; Gómez-Quiroz et al, 2008).

### **3 HIPÓTESIS**

El complejo HGF/NADPH oxidasa es capaz de generar un mecanismo de protección hepática, sin embargo ante una sobrecarga de colesterol el hepatocito es incapaz de llevar a cabo esta respuesta.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar actividad de la NADPH oxidasa en hepatocitos de ratones alimentados con una dieta rica en colesterol y su regulación por c-Met y HGF.

#### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Caracterizar el daño hepático inducido por una dieta HC por dos días en ratones c57BL/6.
- 2.- Evaluar el estado oxidante que induce una dieta HC sobre hepatocitos primarios de ratones.
- 3.- Analizar el efecto modulador de especies reactivas de oxígeno de HGF en hepatocitos primarios de ratones c57BL/6.
- 4.- Evaluar la participación del complejo de la NADPH oxidasa como generador de especies reactivas de oxígeno en hepatocitos primarios de ratones c57BL/6.
- 5.- Determinar en la vesícula biliar, los cambios anatómicos y morfoestructurales inducido por una dieta HC por dos días en ratones c57BL/6.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

El HGF recombinante fue obtenido de Peptotech de México, el anti-HGF se obtuvo de R&D systems (St Louis, MO, USA), los demás reactivos usados fueron de Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (México) salvo cuando se indique lo contrario.

### **5.1 Animales y tratamiento**

Ratones atones machos de la cepa C57BL6 de 8 semanas de vida se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación bajo los cuidados específicos de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a la *NIH guidelines for the care and use of laboratory animals*. Los animales estuvieron a una temperatura controlada (22 °C), ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h y un régimen de comida y agua de libre acceso.

### **5.2 Diseño experimental**

Se formaron dos grupos con 10 animales en cada uno. Los ratones, previo al inicio de la dieta, se dejaron en ayuno por 12 h. El primer grupo fue alimentado durante 48 h con una dieta balanceada estándar (Chow) (Purina, Inc), y el segundo recibió una dieta hipercolesterolémica (HC) que consistente en la dieta estándar Chow suplementada con 2% de colesterol y 0.5 % de colato de sodio (Dyest, Inc). Al término del tratamiento se extrajo sangre total de los animales y se separó el suero para realizar pruebas bioquímicas de función hepática y el perfil de lípidos. El tejido hepático fue seccionado para ser fijado con paraformaldehído neutro al 4% (PFA) y ser embebidos en parafina para los estudios histológicos, mientras que otra parte fue congelada a -80 °C hasta su utilización para realizar en Análisis de expresión proteica.

### **5.3 Histología**

Se obtuvieron cortes de 7  $\mu\text{m}$  de los tejidos incluidos en parafina. Los cortes posteriormente fueron desparafinados e hidratados gradualmente para realizar la tinción de hematoxilina y eosina y realizar el análisis histológico.

### **5.4 Pruebas bioquímicas y de función hepática**

La determinación de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol, triglicéridos (TG), lipoproteínas tanto de alta como baja densidad (HDL y LDL fueron analizados por un método automatizado empleando el sistema Reflotron (Roche, Inc.).

### **5.5 Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos**

Otro grupo de ratones se usó para el aislamiento de hepatocitos, mediante el método de doble perfusión con colagenasa, siguiendo el protocolo previamente reportado por Gómez-Quiroz y colaboradores en el 2008. Los hepatocitos se cultivaron en cajas Petri a una densidad de 250,000 células/cm<sup>2</sup> en medio Williams E suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) e incubados en una atmosfera controlada (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). La monocapa de hepatocitos adherida a las 4 h, se lavo con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y el medio fue reemplazado por uno libre de SFB y suplementado con antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Life Technology) al 1%. Los hepatocitos se mantuvieron en este medio durante 12 h para estabilizarlos y posteriormente poner los tratamientos.

Los hepatocitos en cultivo se trataron con 50 ng/ml de HGF (Peprotech, USA) a tiempos de 0.5, 1, 3, 6 y 12 h. Posterior al HGF, las células se utilizaron para la determinación del contenido de colesterol libre con la molécula fluorescente filipina y de triglicéridos (TG) con el aceite rojo "O"; o fueron lisadas para extraer proteína total utilizada para el análisis de Western blot. Otro grupo de células se empleó para determinar la actividad de la NADPH oxidasa.

### **5.6 Determinación de colesterol libre con filipina**

El contenido de colesterol en hepatocitos se determinó empleando la molécula fluorescente filipina (Sigma Aldrich, EUA) a una dilución 1:100 en albúmina sérica bovina (BSA) al 0.1% en PBS en los hepatocitos aislados de ambos grupos siguiendo el protocolo reportado por Mari y colaboradores 2006.

### **5.7 Determinación de lípidos neutros con aceite rojo O**

La determinación de los lípidos neutros en los hepatocitos se realizó fijando con paraformaldehído (PFA) al 2.5% durante 15 min, posteriormente se tiñeron con aceite rojo "O" (Sigma Aldrich, EUA) al 0.2% en isopropanol durante 1 h. Para la observación al microscopio de luz los hepatocitos se lavaron con isopropanol (J.T. Baker, México) al 60% para retirar el exceso de colorante y los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Harris (Hycel, México) durante 30 seg. La cuantificación se realizó extrayendo el colorante con isopropanol al 100% y se leyó a una absorbancia de 510 nm de longitud de onda.

## 5.8 Actividad de la NADPH oxidasa

La actividad de la enzima se realizó por la determinación del anión superóxido en un sistema con inhibición de la NADPH oxidasa, utilizando proteína de membrana que se extrajo con una solución de lisis compuesta por Tris-HCl 50mM pH7.4, EGTA 0.1mM, EDTA 0.1mM, PMSF 1mM, aprotinina y leupeptina 10µM y por sonicación en hielo, seguido de una centrifugación a 14, 000 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se volvió a centrifugar a 33,000 xg por 1h a 4 °C en una centrífuga Beckman modelo TL-100 y se decantó el sobrenadante, recuperando las fracciones membranales en 100 ul de buffer lisis así como por sonicación durante 3 s. La proteína obtenida se cuantificó con el reactivo de Bradford (Bio-Rad, Laboratories, Inc). Para determinar la producción del anión superóxido así como la actividad de la NADPH oxidasa, en una placa oscura de 96 pozos se utilizaron 20 ug de proteína a los que se les adicionó o no cloruro de difenileneiodonio (DPI) (Sigma Aldrich) inhibidor de la NADPH oxidasa a 10 µM por 30 min, como control de la detección del anión superóxido a otros pozos se les adicionó superóxido dismutasa (SOD) (Sigma Aldrich) 250 U/mg y se añadió una mezcla formada por solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH7.4, ácido dietilentriaminopentaacético 0.2 mM (DTPA), DNA de doble cadena 1.25 µg/mL, NADPH 6µM, dihidroetidio (DHE) (Invitrogen, Life Technologies) 2.4 µM por pozo, incubándose a 37°C. Finalmente la fluorescencia se leyó durante una hora en intervalos de 5 min, con un filtro de excitación de 485 nm y de emisión 535 nm en un equipo Multimode Detector (DTX880, Beckman Coulter) de acuerdo a lo reportado por Clavijo-Cornejo y colaboradores 2013.

## **5.9 Extracción y determinación de proteína**

Para el análisis del contenido de proteína por Western blot se extrajo la proteína total con solución de lisis compuesta del reactivo de extracción de proteína M-PER (Pierce Biotechnology, USA) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis, USA) y fosfatasa (PhosphoStop, Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Se incubó en hielo durante 15 min y después se centrifugó a 14,000 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó, se alicuotó y se almacenó a -80 °C. La proteína se cuantificó utilizando el estuche comercial de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Biotechnology, EUA), considerando al fabricante se tomó 5 ul de muestra y se le adicionó 150 ul de reactivo BCA diluido en 1:50 en  $\text{CuSO}_4$  y como curva patrón se utilizó albúmina sérica de bovino de 20-2,000 ug/ml, en seguida se incubó durante 2 h a 37 °C. Finalmente se la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Inc).

## **5.10 Análisis del contenido proteico por Inmunoblot**

Se utilizaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína y se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 11% en presencia de SDS al 0.1%, usando un voltaje de 120 V durante 120 min. Posteriormente la proteína se transfirió a una membrana de PVDF durante 18 min a 25 V y 1 A en un sistema trans-blot turbo (Bio-Rad Laboratories, Inc).

La membrana fue boqueada con albúmina al 5% en TBS-Tween durante 1 h en agitación constante. Para la detección de la proteína, la membrana se incubó con

anticuerpos específicos (tabla 1) durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con TBS-Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en una solución de albúmina al 1% en TBS-Tween por 90 min. Después se lavó 4 veces por 10 min con TBS-Tween. Se reveló con 1 ml de sustrato luminiscente Immobilon Western (Millipore Corporation, USA), las bandas fueron detectadas con el fotodocumentador Image Station 4000 mm Pro Kodak de Carestream (Rochester, NY). La cuantificación relativa por densitometría se realizó usando el Software Carestream Molecular Imaging.

### **5.11 Ensayo de viabilidad**

La viabilidad se determinó empleando el estuche comercial CCK-8 (Dojindo Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 5,000 células/pozo en placas de 96 pozos, posteriormente se les retiró el medio y se suplementó con uno fresco libre de suero y a cada pozo se le adicionaron 10 ul del reactivo CCK-8 dejando incubar 1h en condiciones estándar de cultivo celular. El estuche consiste en la reducción de una sal soluble de tetrazolio WST-8 mediante deshidrogenasas en la célula que da como producto un color naranja el cual se detectó a 450 nm en un lector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter, Inc). Las células Chow y HC se trataron con 15 µM de Antimicina A (AA,) por 12h, en presencia o no de HGF (50 ng/ml). Adicionalmente otro grupo de células fue pre-tratado con 10 µg/ml de DPI 30 min previo al tratamiento con HGF, posteriormente se agregó la AA.

### **5.12 Análisis ecográfico**

Se realizó un análisis de imagen ecográfica con el equipo de Siemens Diagnostic Ultrasound System, con la ayuda de una sonda VF13-5SP se realizó el ultrasonido sobre la parte peritoneal para identificar la vesícula y sobre ella se buscaron patrones homogéneos, hipoecoicos e hiperecoicos. El análisis de las imágenes se realizó por dos sonografistas cegados al estudio.

### **5.13 Análisis del líquido biliar por microscopia de luz polarizada**

Una vez expuesta el área peritoneal, se realizó la aspiración del líquido biliar y este fue analizado mediante microscopia de luz polarizada con la intención de identificar cristales de colesterol.

### **5.14 Análisis estadístico**

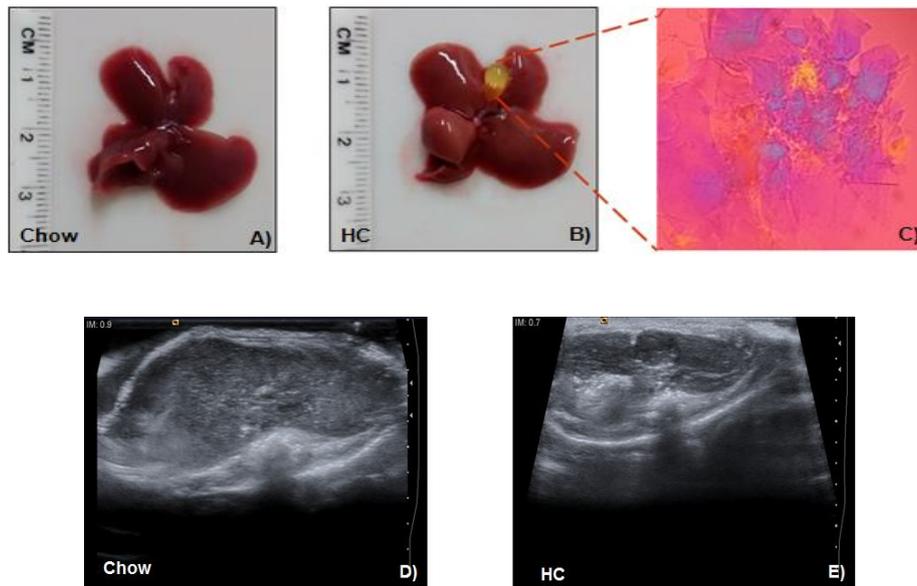
Los datos están representados como el promedio  $\pm$  error estándar de al menos tres experimentos independientes. La comparación entre grupos se realizó por medio de la prueba de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Bonferroni usando al programa informático GraphPad Prism 5 para Mac OSX. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con una  $P < 0.05$ .

## **6 RESULTADOS**

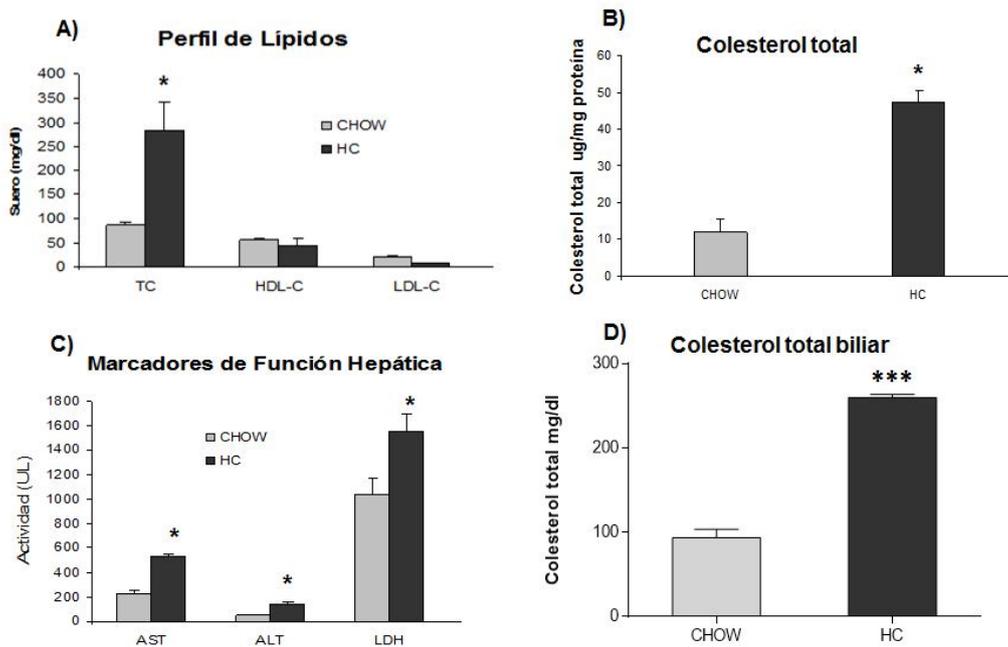
### **6.1 Morfología y disfuncionalidad hepática inducida por una dieta HC**

Después de dos días de alimentación con la dieta HC y tras realizar la inspección macroscópica del hígado se pudieron observar cambios en la coloración del hígado a rosa pálido debida al alto contenido de lípidos, así como aumento considerable en el tamaño de la vesícula biliar (Fig. 4B); estos cambios son evidentes al compararlos con los hígados que recibieron la dieta Chow (Fig. 4A). Estos hallazgos fueron consistentes con el análisis ecográfico en el que se pudo observar un aumento significativo del área de la vesícula biliar ( $8.5 \text{ cm}^2$ ) de los ratones HC (Fig. 4E) mientras que fue imperceptible las vesículas de los ratones Chow (Fig. 4D). El aumento de la vesícula biliar refleja un estado de litiasis inducida por hipersecreción de colesterol biliar en forma de cristales altamente birrefringentes con forma de laminas rectangulares con una muesca en uno de sus ángulos (Fig. 4C) los cuales fueron detectados ecográficamente como puntos hiperecóticos dentro de la vesícula biliar, aunado a un estado de hiperecogenicidad de la misma (Fig. 4E).

El perfil lipídico en suero, reflejo un aumento de colesterol total (TC) y triglicéridos (Fig. 5A), pero sin cambios en las lipoproteínas tanto HDL y LDL; igualmente el colesterol total se encontró elevado en tejido hepático (Fig. 5B) y en el líquido biliar (Fig. 5D) de los animales HC, todo esto comparado con los animales Chow. Así mismo, los niveles de enzimas transaminasas: ALT, AST y LDH, estuvieron incrementadas en los animales HC con respecto a los Chow (Fig.5C).



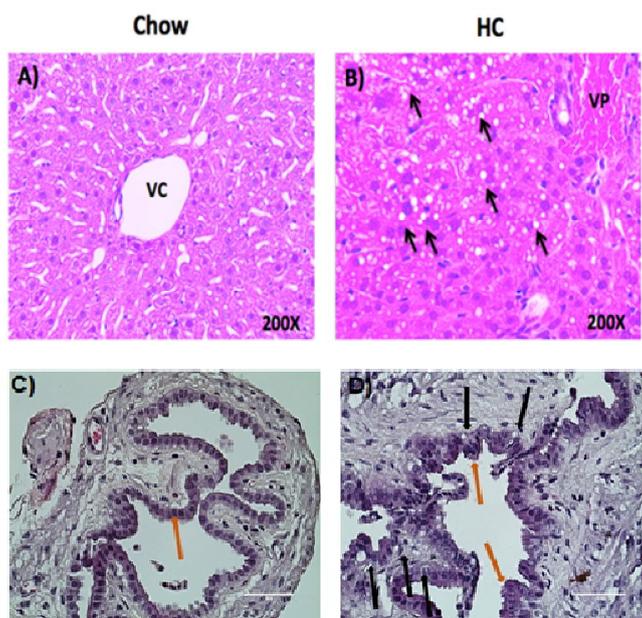
**Figura 4. Cambios ecográfico, macroscópico y microscópico inducidos por una dieta HC.** Se muestra la morfología del hígado Chow (A) a diferencia del hígado HC con un aspecto pálido por el depósito de lípidos (B) así como la evidencia de cristales de colesterol a nivel de vesícula biliar (C). Como puntos hiperecóicos se muestran los cristales de colesterol (E).



**Figura 5. Cambios sistémicos y de funcionalidad.** La determinación del perfil lipídico (A) así como de colesterol libre así como biliar (B,D) y marcadores de funcionalidad hepática (C) como aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) se llevó a cabo por métodos automatizados como se refiere en el apartado de materiales y métodos. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs Chow.

## 6.2 Daño tisular en el parénquima hepático por la sobrecarga de colesterol

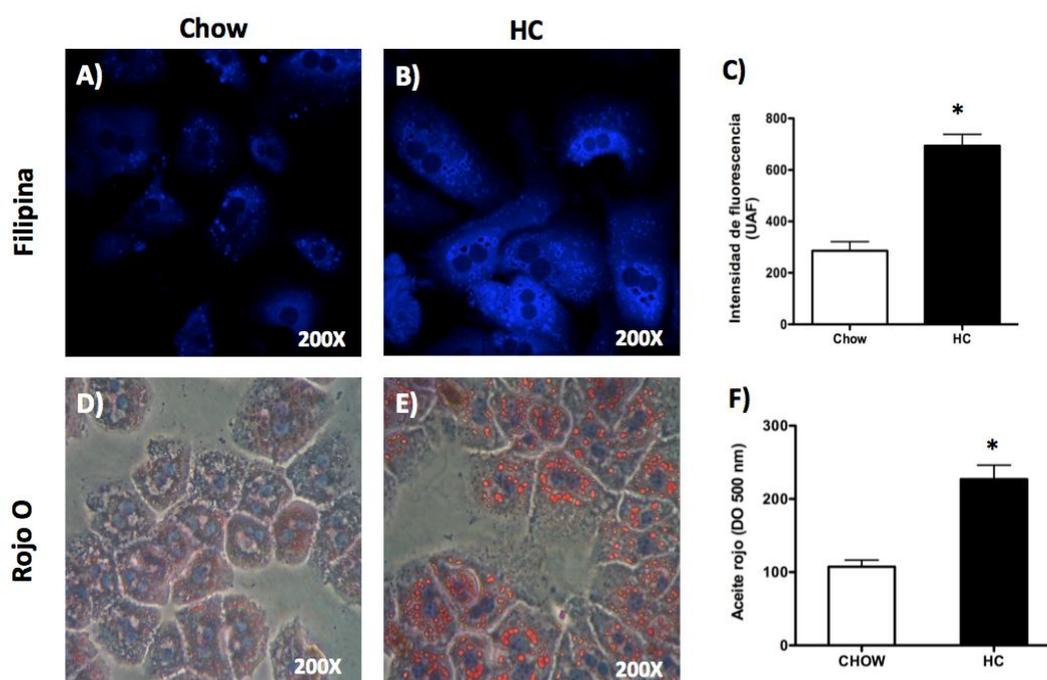
El análisis histológico de las biopsias hepáticas de los animales alimentados con dieta HC, muestra una clara esteatosis, caracterizada por una gran cantidad de microvesículas lipídicas, así como un desorden de la arquitectura hepática (Fig. 6B) en comparación con los animales alimentados con la dieta balanceada Chow que muestran la clásica irradiación de los cordoncillos hepáticos a partir de la vena central (Fig. 6A). La vesícula biliar, evidencio un incremento a nivel tisular del contenido de vesículas de colesterol (Indicado con las flechas negras), así como un cambio de epitelio simple columnar (Fig. 6D) a uno pseudoestratificado (Fig. 5E) y el aumento en la secreción merócrina a nivel de la superficie apical (Señalado con flechas naranjas).



**Figura 6. Evidencia a nivel histológico de esteatosis por una dieta hipercolesterolémica.** Secciones de hígado de animales alimentados con la dieta regular Chow (A) o hipercolesterolémica HC (B) teñidos con hematoxilina y eosina. Las flechas en color negro indican gotas lipídicas. Secciones de vesícula biliar de animales Chow (C) o HC (D) teñidos con hematoxilina y eosina mostrando con flechas negras las gotas de lípidos y con flechas naranjas el cambio de epitelio columnar en animales Chow a pseudoestratificado en animales tratados con la dieta hipercolesterolémica. Imágenes a 200 X, representativas de al menos tres animales.

### 6.3 La dieta HC incrementa colesterol y TG en hepatocitos

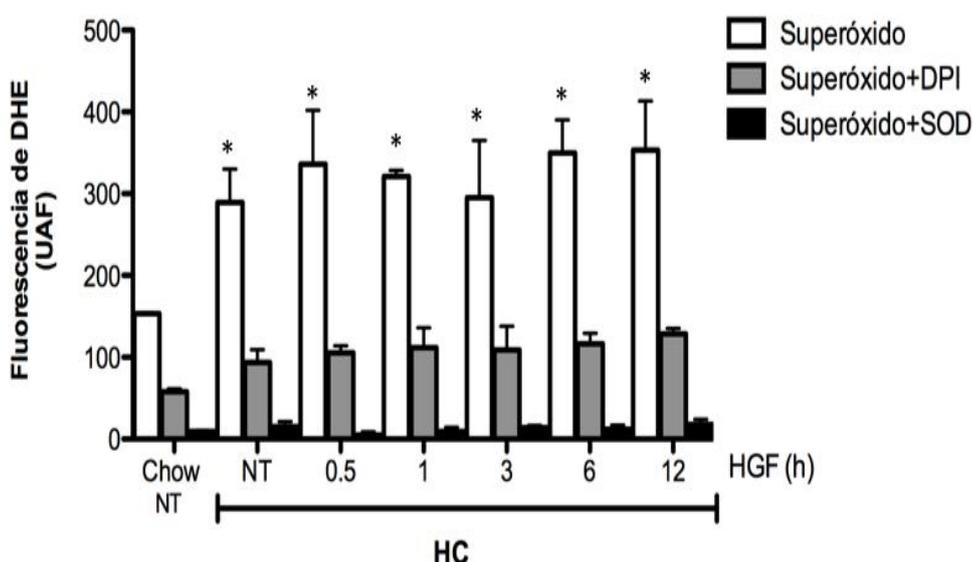
Se evidenció que los hepatocitos HC presentan una sobrecarga lipídica tanto de colesterol total como de lípidos neutros. La Figura 7B muestra claramente que los hepatocitos de ratones HC presentan contenido de colesterol al estar aumentada la fluorescencia con respecto a los Chow (Fig. 7A), el cual se cuantificó con un análisis fluorométrico (Fig. 7C). De manera muy similar los hepatocitos HC mostraron un incremento significativo en el contenido de TG (Fig. 7E y F) en comparación con los Chow (Fig. 7D).



**Figura 7. Contenido de colesterol y TG en cultivo de hepatocitos.** Se determinó la presencia de colesterol por medio de filipina en hepatocitos Chow (A) y en hepatocitos HC (B). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la filipina (C) se realizó con el software Image J. Los TG se detectaron con la prueba de aceite rojo O en hepatocitos Chow (D) y en hepatocitos HC (E). Posteriormente se extrajo el aceite rojo y se cuantificó a 500 nm por espectrofotometría (F). Las fotografías se muestran a un aumento original de 200X. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs Chow.

#### 6.4 El HGF es incapaz de disminuir la producción de ERO producidas por NADPH oxidasa en hepatocitos HC

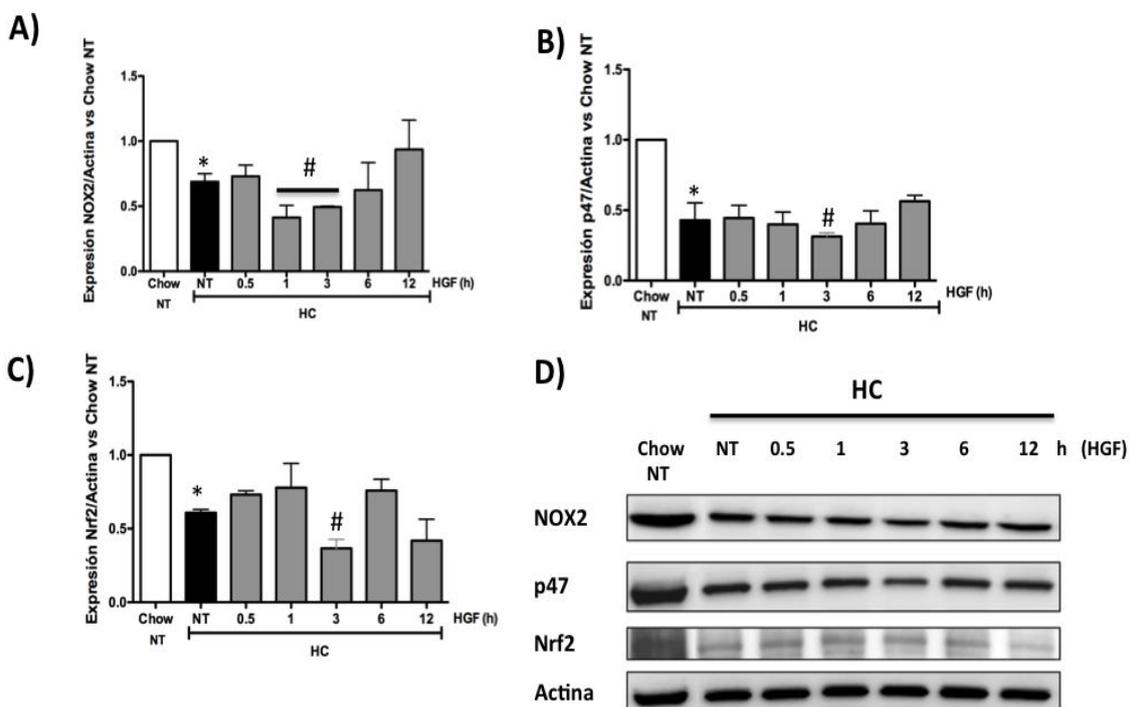
Con la finalidad de evaluar si la sobrecarga de colesterol modifica el papel antioxidante del HGF, realizamos un ensayo de la actividad de la NADPH oxidasa determinado la generación de anión superóxido en presencia o ausencia de DPI, un inhibidor de la oxidasa, y de SOD, enzima que dismuta el anión superóxido. La figura 7 muestra que los hepatocitos HC presentan un incremento significativo en la actividad basal en relación a las células no tratadas Chow, sin embargo el HGF fue incapaz de disminuir la producción de ERO generadas por la NADPH oxidasa.



**Figura 8. Efecto del HGF en un ambiente hipercolesterolémico sobre la actividad de la NADPH oxidasa como fuente de ERO.** Los hepatocitos de ambas dietas (Chow y HC) se trataron o no con 50 ng/ml de HGF por los tiempos indicados. Se cuantificó la producción de anión superóxido en presencia o no del inhibidor de la NADPH oxidasa (DPI) o de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM de las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). \*  $P < 0.05$  vs Chow.

## 6.5 La sobrecarga de colesterol disminuye la expresión proteica del sistema de protección HGF/NADPH oxidasa

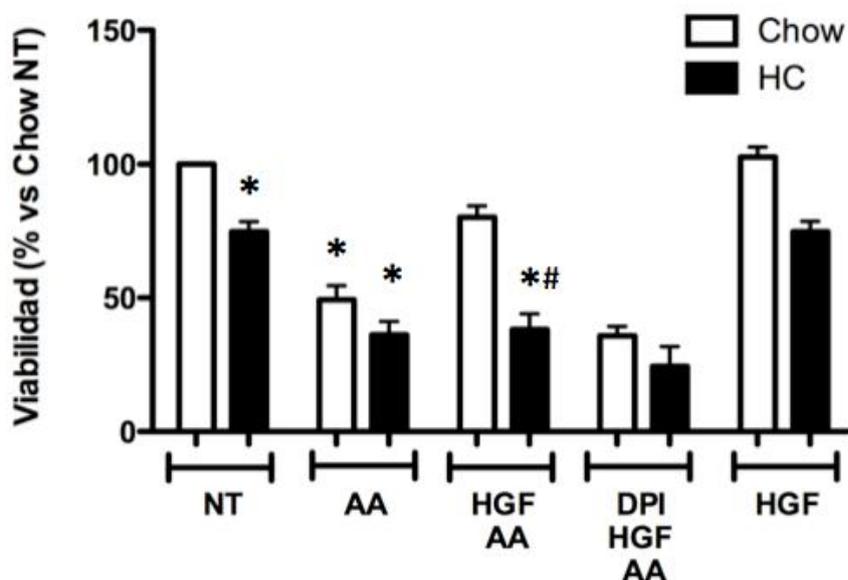
Transducionalmente el HGF indujo una disminución significativa a la 1 y 3 h de tratamiento en NOX2 (Fig. 9A), en p47 a las 3 h (Fig. 9B) y en Nrf2 a las 3 h (Fig. 9C) con respecto al HC NT. Los resultados son expresados como el incremento en la activación de las proteínas blanco con respecto a los hepatocitos Chow. Las imágenes representativas se muestran en la figura 9D.



**Figura 9. Efecto de una dieta hipercolesterolémica sobre expresión del sistema HGF/NADPH oxidasa.** El análisis densitométrico de los Western blot de las subunidades de la NADPH oxidasa (NOX2 y p47) así como del factor de transcripción Nrf2 se graficó como el incremento en la expresión proteica con respecto a los hepatocitos Chow no tratados. Se expresa el valor promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. El nivel de significancia considerado fue \*  $P < 0.05$  vs Chow NT; #  $< 0.05$  vs HC NT. Las imágenes de los blots son representativas.

## 6.6 El HGF es incapaz de mantener la viabilidad del hepatocito con alto contenido de colesterol

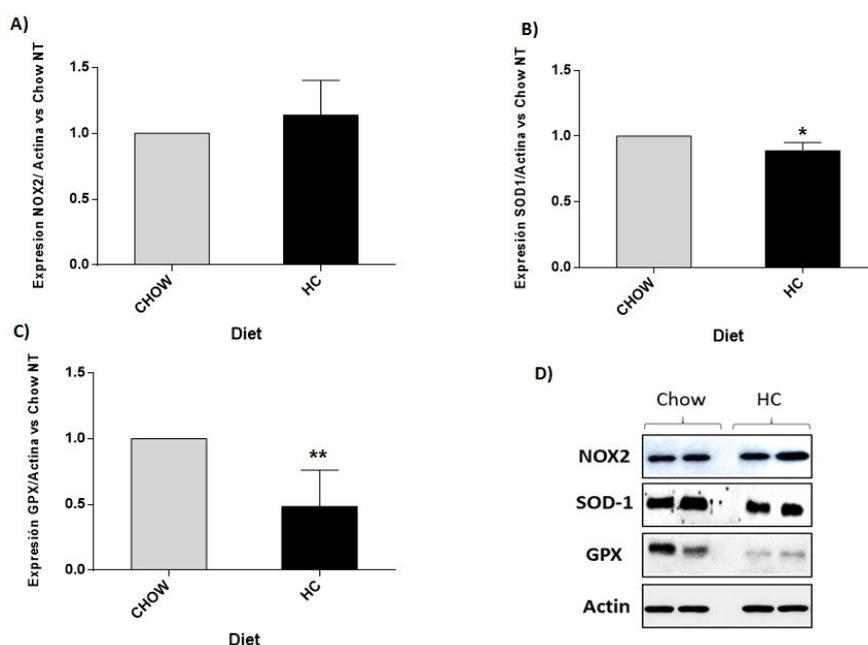
Finalmente, para determinar si el HGF tiene un estado protector en la viabilidad de los hepatocitos HC, se realizó un estudio de viabilidad con CCK-8. La figura 10 muestra que el HGF fue capaz de proteger ante los efectos prooxidantes de la AA un bloqueador de la cadena respiratoria mitocondrial, mientras que las células HC no mostraron efecto protector alguno mediado por el HGF, el inhibidor de la NADPH oxidasa DPI abrogó la respuesta protectora del HGF observado en las células Chow sin efecto en las HC.



**Figura 10. Viabilidad celular.** Los hepatocitos tanto Chow como HC fueron tratados o no con antimicina A (AA) a 15uM durante 6 h, en presencia o no de HGF (50 ng/ml) o DPI (10 ug/ml). La viabilidad al término de los tratamientos se determinó por medio del estuche comercial CCK-8 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las barras representan el promedio de 4 experimentos independientes  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs Chow NT; #  $P < 0.05$  vs Chow HGF+AA.

## 6.7 La presencia de colesterol a nivel de la vesícula biliar induce estrés oxidante afectando la respuesta antioxidante

A nivel de la membrana de la vesícula biliar pudimos observar que no hay cambio en la expresión de NOX2, mientras se observa una disminución significativa del sistema antioxidante como es SOD-1 y glutatión peroxidasa (GPX) en las vesículas de los ratones que recibieron la dieta HC en comparación con los que recibieron la dieta Chow.



**Figura 11. Efecto de los cristales de colesterol en la expresión proteica de vesícula biliar.** Western blot representativo de la expresión de NOX2, SOD-1 y GPX. El análisis densitométrico se graficó como el incremento en la expresión proteica con respecto a los hepatocitos Chow no tratados. Cada barra expresa el valor promedio  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. El nivel de significancia considerado fue \*  $P < 0.05$  vs Chow. Las imágenes de los blots son representativas.

## 7 DISCUSIÓN

Se ha documentado ampliamente el grave problema que existe en México con la obesidad, particularmente infantil (Fernández-Cantón et al, 2011; García-García et al, 2008), la cual está impactando en el ser humano no solo en el sistema cardiocirculatorio o en el metabolismo, sino también a nivel hepático, donde se ha documentado su impacto en desórdenes como la NAFLD y el NASH.

La organización mundial de la salud (OMS) ha dejado claro que los tres principales factores de riesgo para las enfermedades crónicas son el tabaquismo, la hipertensión y los niveles elevados de colesterol en plasma (OMS, 2003). Algunos estudios han mostrado, particularmente en adolescentes y niños mexicanos, que los niveles de colesterol son muy elevados ubicándolos como personas con un alto riesgo de padecer enfermedades crónicas en la etapa adulta (Roth et al, 2010; Juárez-Muñoz et al, 2006; González et al, 2005).

Se ha publicado que una dieta rica en colesterol genera un incremento en el contenido de este lípido en hepatocitos de animales de experimentación, mostrando que el hígado es más susceptible a estímulos citotóxicos mediados, por ejemplo, por el TNF- $\alpha$ . Esta sensibilización ejercida por los lípidos acumulados se presentó exclusivamente en animales con una sobrecarga de colesterol y no en aquellos que recibieron una dieta con sobrecarga de triglicéridos, pero no de colesterol, lo que confirma que es el tipo de lípidos y no la cantidad lo que determina el daño hepático (Mari et al, 2006).

La dieta HC proporcionada a los animales mostró ejercer un efecto esteatogénico claro, las histologías mostradas en la figura 5B muestran claramente el tejido hepático con esteatosis, particularmente microvesicular, mientras que los niveles en suero de colesterol libre están significativamente elevados con respecto a los animales con dieta Chow, sin cambios en HDL y LDL (figura 6A). El daño al hígado se corroboró con un incremento en las pruebas de función hepática (figura 6C) las cuales se elevaron significativamente en los animales alimentados con la dieta HC, lo cual es congruente con lo reportado previamente por Mari y colaboradores (2006), dejando patente una vez más que el contenido de colesterol y TG se relaciona con la severidad en el daño hepático.

Con la finalidad de conocer directamente el efecto en el mecanismo mediado por el HGF y la NADPH oxidasa en los hepatocitos, aislamos hepatocitos de animales de ambos grupos y analizamos el contenido de lípidos. La figura 7 muestra que aún en cultivo los hepatocitos mantienen la sobrecarga, tanto de colesterol (figura 7B), como de TG (figura 7E).

Procedimos a determinar la actividad de la NADPH oxidasa en los hepatocitos HC. La figura 8 muestra que los hepatocitos de ratones HC presentan un incremento significativo en la actividad de la NADPH oxidasa con respecto a los Chow. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado previamente en hepatocitos Chow (Clavijo-Cornejo et al, 2013) el HGF no mostró efecto alguno sobre la actividad de la enzima en los hepatocitos HC. Clavijo-Cornejo y colaboradores (2013) reportaron previamente un incremento en la actividad de NADPH oxidasa, desde los 5 min de tratamiento con HGF, teniendo un pico máximo a los 30 min de tratamiento,

decaendo la actividad hasta valores por debajo del control a las 24 h. Ambos efectos mostraron ser fundamentales para la protección ejercida por el HGF. El incremento temprano tendió a la activación de Nrf2, un factor de transcripción encargado de la expresión de proteínas antioxidantes y de fase II y III de detoxificación (Klaassen y Reisman, 2010; Niture et al, 2010; Vollrath et al, 2006), mientras que la represión transcripcional mediada por el HGF evitó la utilización de la NADPH oxidasa por factores citotóxicos como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la sobrecarga de colesterol abrogó la activación de la NADPH oxidasa por el HGF. Asimismo, si bien la dieta por si sola indujo la represión transcripcional de proteínas del sistema como NOX2, NOX4 y p47, el HGF no tuvo efecto sobre ellas (figura 9).

Interesantemente, los datos muestran un resultado compensador en la NADPH oxidasa, ya que si bien la dieta HC disminuyó su expresión, la actividad se encuentra elevada sugiriendo un claro efecto compensatorio.

Nuestro grupo de trabajo ha caracterizado los efectos del HGF como factor hepatoprotector. Sabemos que la ausencia en la señalización de el condiciona a daño oxidante, apoptótico, fibrótico y carcinogénicos (Marquardt et al, 2012; Gómez-Quiroz et al, 2008; Takami et al, 2007; Kaposi-Novak et al, 2006), dejando claro lo indispensable que es la respuesta del HGF en la protección hepática. En el presente trabajo mostramos que la sobrecarga de colesterol impide la respuesta protectora del HGF, lo cual condicionó al daño oxidante (figura 11).

Los resultados sugieren fuertemente que en estados hipercolesterolémicos el HGF es incapaz de ejercer su respuesta protectora presentando al hígado vulnerable, particularmente ante retos pro-oxidantes como puede ser la infección por el virus de la hepatitis B o C, el alcohol o procesos inflamatorios sistémicos. El control de los niveles hepáticos de colesterol libre se posiciona como un nuevo blanco de intervención terapéutica.

La presencia de microlitiasis a nivel macroscópico, nos llevó a realizar un estudio imagenológico no invasivo como es el US. De acuerdo con Hanbidge et al, (2004) así como Harvey y Miller (1999) es el primer estudio de evaluación de patología biliar aguda con una sensibilidad de un 83% y una especificidad del 95% porque es considerado el principal procedimiento de imagen para demostrar la existencia de cálculos. En nuestros resultados fue evidente el cambio de tamaño de la vesícula biliar de la presencia de un fondo ecogénico debido a la presencia de los cristales de colesterol. No obstante, además del abordaje imagenológico se ha establecido el análisis histológico, puesto que se ha reportado que las células epiteliales columnares están revestidas por una mucosidad natural fisiológica que desempeña un papel regulador en la colelitiasis, ya que promueve la nucleación de piedras. De esta forma, los cambios morfológicos de la vesícula biliar antes de la formación de cálculos en ratones reveló un temprano y rápido aumento en la producción de moco, así como, un cambio de epitelio columnar a pseudoestratificado por el gran número de células en degeneración debido probablemente a la presencia de los cálculos, tal y como nosotros evidenciamos en el grupo con una dieta alta en colesterol, confirmando el impacto que aún con

dos días de una ingesta alta en lípidos es suficiente para generar cambios evidentes que se ven traducidos a nivel molecular por un incremento en la expresión de proteína pro-oxidantes como la NADPH oxidasa y por lo tanto afectando la expresión proteínas antioxidantes como lo ha referido Grattagliano et al, (2009) en pacientes con cálculos biliares.

## **8 CONCLUSIÓN**

Los resultados a nivel macroscópico, funcional y celular sugieren que en estados hipercolesterolémicos, el HGF es incapaz de ejercer su respuesta protectora hepática, ya que lo vuelve vulnerable ante retos prooxidantes muy probablemente porque abroga el efecto protector mediado por el sistema HGF/NADPH oxidasa/Nrf2. Estos resultados nos permiten establecer que una dieta alta en colesterol puede afectar de manera importante los mecanismos de protección a nivel hepático lo cual promovería la progresión en el daño de este órgano.

## 9 REFERENCIAS

1. **Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S.** NADPH oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281.
2. **Adams L, Lymp J, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P.** The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 229: 375-378.
3. **Ago T, Nuno H, Ito T, Sumimoto H.** Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47<sup>phox</sup>. Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the SH3 domain-mediated intramolecular interaction in p47<sup>phox</sup>, thereby activating the oxidase. *The Journal of Biological chemistry* 1999; 274: 33644-33653.
4. **Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, Sumimoto H.** Phosphorylation of p47<sup>phox</sup> directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 4474-4479.
5. **Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ, Rull J, Villalpando S, Barquera S, Rojas R.** Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex* 2010; Supp 1: S44-53.
6. **Albado E.** Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 2006; 65: 278-290.

7. **Angulo P.** Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-1231.
8. **Babelova A, Avaniadi D, Jung O, Fork C, Beckmann J, Kosowski J, Weissmann N, Anikumar N, Shah AM, Schaefer L, Schroder K y Brandes RP.** Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(4):842-53.
9. **Babior BM.** NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.
10. **Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA.** Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1346-1355.
11. **Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lamaster JJ, Brenner DA.** NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin invest* 2003; 112:1383-1394.
12. **Bedard K, Krause KH.** The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87:245-313.
13. **Bellentani S, Marino M and Noone.** Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1, S4-8.
14. **Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T.** Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7:221-39.
15. **Bokoch GM, Zhao T.** Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:1533-1548.

16. **Brandes RP, Kreuzer J.** Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005; 65:16-27.
17. **Browning JD, Horton JD.** Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114(2):147-152.
18. **Browyer BA, Miles JM, Haymond MW, et al.** L-Carnitine therapy in home parenteral nutrition patients with abnormal liver tests and low plasma carnitine concentration. *Gastroenterol* 1988; 94: 434-438
19. **Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballeria J.** Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009; 50:789-796.
20. **Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, López-Reyes A, Dominguez-Perez M, Nuno N, Dominguez-Meraz M, et al.** Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie* 2013; 95:1177-1184.
21. **Chen J, Petersen DR, Shenker S, et al.** Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 544-552.
22. **Chittury S, Farrell GC.** Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41.
23. **Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Bellot P, Miquel R, Moreno M, Jares P, Brosh J, Arroyo V, Caballería J, Gines P.** Hepatic Expression of

- candidate genes in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 687-697.
24. **Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, et al.** Gene expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and TNF-receptors, p55 and p57, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163.
25. **Croquet V, Moal F, Veal N, Wang J, Oberti F, Roux J, Vuillemin E, Gallois Y, Douay O, Chappard D, Cales P.** Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 773-780.
26. **Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Matsumoto M, Zhang J, Zhu K, Katsuyama M, Tokok NJ y Yabe-Nishimura C.** Nox1/Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reductase form (NADPH) oxidase promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 2011; 54(3):949-58.
27. **Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsele J y Smeets K.** Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 2010; 23(5):927-40.
28. **De Minicis S, Brenner DA.** Nox in liver Fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462 (2): 266-272.

29. **De Minics S, Bataller R, Brenner Da.** NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic?. *Gastroenterology* 2006; 131:272-275.
30. **Del Ben M, Polimeni L, Carnevale R, Bartimoccia S, Nocella C, Baratta F, Loffredo L, Pignatelli P, Violi F, Angelico F.** NOX2-generated oxidative stress is associated with severity of ultrasound liver non-alcoholic fatty liver. *BMC Gastroenterol* 2014;14:81 doi:10.1186/1471-230x-14-81.
31. **Enriquez-Cortina C, Almonte-Becerril M, Clavijo-Cornejo D, Palestino-Dominguez M, Bello-Monroy O, Nuno N, et al.** Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicol Sci* 2013;135;26-36.
32. **ENSANUT.** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, vol. 2012. México, Distrito Federal. Gobierno Federal. (Fecha de revisión, 02 de septiembre de 2015: <http://ensanut.insp.mx/informes/DistritoFederal-OCT.pdf>).
33. **Esposito LA, Melov S, Panov A, et al.** Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4820-4825.
34. **Feldmann G, Haouzi D, Moreau A et al.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology* 2000; 31:674-683.

35. **Fernández Cantón, Sonia B. MN, Yura A., Viguri Uribe R.** Sobrepeso y obesidad en menores de 20 años de edad en México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2011; 68;79-81.
36. **Fernández-Rodríguez CM, Alfonso-López S, López-Serrano P, Gutiérrez ML, Temiño R, Barbado A, Lledó-Navarro JL, Pérez-Fernández MT, Cacho G, Nevado M.** Síndrome metabólico y progresión de la lesión hepática en la infección por el virus de la hepatitis C y el hígado graso no alcohólico. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29 (supli 1): 9-14.
37. **Feldstein AE, Canbay A, Angulo P et al.** Hepatocyte apoptosis and Fas expression are prominent features of human non alcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443.
38. **Fromenty B, Pessayre D.** Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1995; 67: 101-154.
39. **Fromenty B, Pessayre D.** Mitochondrial injury and NASH. En: Farrell GC, Georg J, de la M. Hall P, et al. editores. *Fatty Liver Disease. NASH and Related disorders*. Malden: Blackwell; 2005: 132-142.
40. **García-García E, De la Llata-Romero M, Kaufer-Horwitz M, et al.** Obesity and the metabolic syndrome as a public health problem: a reflection. *Salud Pública Mex* 2008; 50(6):530-47.
41. **García-Ruiz C.** Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol* 2009;50;789-96.

42. **Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS.** Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283;14581-9.
43. **González G, Fernández JD, Sánchez J, Rodríguez JJ, Quintero AG.** Colesterolemia en adolescentes sexo femenino de Morelos, México. *Revista Chilena de Nutrición* 2005;32.
44. **González-Hita M, Bastidas Ramírez BE, Panduro-Cerda A.** Factores de riesgos en la génesis de la litiasis vesicular. *Inv Salud* 2005; VII(1):71-78.
45. **Grattagliano I, Wang DQ, Di Ciaula A, Diogo CV, Palasciano G, Portincasa P.** Biliary proteins and their redox status changes in gallstone patients. *Eur J Clin Invest.* 2009 Nov; 39(11):986-92.
46. **Gutierrez Ruiz MC, Dominguez Perez M, Rodriguez Gonzalez S, Nuno Lambarri N, Licona Retama C, Gomez-Quiroz LE.** High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor. *Gac Med Mex* 2012; 148;236-42.
47. **Halliwell B.** Free radicals, antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence?. *Lancet* 1994; 244: 721-724.
48. **Hanbidge AE, Bruckler PM, O'Malley ME, Willson SR.** Imaging evaluation for acute pain in the right upper quadrant. *RadioGraphics* 2004; 24:1117-1135

49. **Harvey RT, Miller WT.** Acute biliary disease: Initial CT and follow-up US versus initial US and follow-up CT. *Radiology* 1999; 213:831-836.
50. **Hegner D, Platt D.** Effect of essential phospholipids on the properties of ATPases of isolated rat liver plasma membranes of young and old animals. *Mech Ageing Dev* 1975; 4:191-200.
51. **Hui JM, Hodge A, Farrell GC et al.** Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin?. *Hepatology* 2004; 40:46-54.
52. **James O, Day C.** Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999; 353:1634-1636.
53. **Jenkins PJ, Portman BP, Eddleston ALWF et al.** Use of polyunsaturated phosphatidylcholine in HBsAg negative chronic active hepatitis. Results of a prospective double blind controlled trial. *Liver* 1982; 2:77-81.
54. **Jian JG, Chen Q, Bell A, et al.** Transcriptional regulation of the hepatocyte growth factor (HGF) gene by the Sp family of transcription factors. *Oncogene* 1997; 14:3039-3049.
55. **Juárez-Muñoz IE, Anaya-Florez MS, Mejía-Arangure JM, Games-Eternod J, Sciandra-Rico M, Núñez-Tinoco F, et al.** Niveles séricos de colesterol y lipoproteínas y frecuencia de hipercolesterolemia en un grupo de adolescentes de la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006;63:162-168.
56. **Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS.** Met-regulated expression signature defines a subset of

human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 2006; 116:1582-1595.

57. **Klaassen CD, Reisman SA.** Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244:57-65.

58. **Lam TKT, Carpentier A, Lewis GF, De Werve GV, Fantus IG, Giacca A.** Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:863-873.

59. **Lambeth JD.** Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(3):181-188.

60. **Lazo M, Clark JM, Noone.** The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28:339-350.

61. **Lirussi F, Matropasqua E, Orlando S, Orlando R.** Probiotics for no-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 24(1):CD005165.

62. **Ludwing J, Niffiana TR, McGill DB, Ott BJ.** Non-alcoholic steatohepatitis, Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Prea* 1980; 55:434-438.

63. **Maher JJ, Scott MK.** Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in primary culture and liver injury in vivo. *Hepatology* 1996; 24:905 A.

64. **Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al.** Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006; 4:185-198.
65. **Marquardt JU, Seo D, Gomez-Quiroz LE, Uchida K, Gillen MC, Kitade M, et al.** Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl<sub>4</sub> exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochim Biophys Acta* 2012.
66. **Méndez SN , Uribe M.** Inhibición de la absorción de colesterol. Una nueva estrategia para el tratamiento médico de la litiasis de colesterol. *Medicina Universitaria* 2008; 10(41):230-234.
67. **Méndez-Sánchez N, Chávez-Tapia N, Uribe M.** Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. *Gac Med Mex* 2004; 140:S67-S72.
68. **Musso G, Gambino R, Cassader M.** Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev* 2010; 11:430-445.
69. **Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK.** Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244:37-42.
70. **OMS.** Dieta, Nutrición y Prevención de enfermedades crónicas. Informe de una consulta Mixta de Expertos OMS. 2003.
71. **Palestino-Dominguez M, Clavijo-Cornejo D, Gutiérrez-Ruiz MC y Gómez-Quiroz LE.** El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met en la

protección contra el daño hepático inducido por el alcohol. *Reb* 2012 (31):118-126

72. **Pessayre D, Mansouri A, Fromenty B.** Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis V. Mitochondrial dysfunction in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:193-199.
73. **Pessayre D, Feldmann G, Haouzi D et al.** Hepatocytes apoptosis triggered by natural substances (cytokines, other endogenous substances and foreign toxins). In: Cameron RG, Feuer G. editors. *Apoptosis and its modulation by drugs: handbook of experimental pharmacology*. Heidelberg: Springer-Verlag 2000. 59-108 p.
74. **Popkin BM, Adair LS, Ng SW.** Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nut Rev* 2012; 70:3-21.
75. **Propst A, Propst T, Judmaier G, Vogel W.** Prognosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 1995; 108:1607.
76. **Radi R, Cassina A, Hodara R.** Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria. *Biol Chem* 2002; 383:401-409.
77. **Radi R, Cassina A, Hodara R et al.** Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radi Biol Med* 2002; 33:1451-1464.
78. **Roth GA, Fihn SD, Mokdad AH, Aekplakorn W, Hasegawa T, Lim SS.** High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an

analysis of national health examination survey data from eight countries. Bulletin of the World Health Organization 2010; 89:92-101.

79. **Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Hernández-Muñoz T, et al.** Reactive oxygen species mediates the down-regulation of mitochondrial transcripts and proteins by tumour necrosis factor- $\alpha$  in L929 cells. *Biochem J* 2003; 370:609-619.
80. **Sánchez-Alcázar JA, Schneider E, Martínez MA, et al.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases the steady state reduction of cytochrome b of mitochondrial respiratory chain in metabolically inhibited L929 cells. *J Biol Chem* 2000; 275:13353-13361.
81. **Schaffner F, Thaler H.** Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* 1986; 8:283-298.
82. **Solis-Herruzo JA.** Progresión de la estatohepatitis a cirrosis. Papel del estrés oxidativo y la muerte celular. *Gastroenterología y Hepatología* 2006; 29 (supl. 1):101-110.
83. **Someya A, Nuno H, Hasebe T, Nagaoka I.** Phosphorylation of p40-phox during activation of neutrophil NADPH oxidase. *J Leukoc Biol* 1999; 66:851-857.
84. **Szabó C.** DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by ONOO. *Free Rad Biol Med* 1996; 21:855-869.

85. **Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, Gomez-Quiroz LE, Conner EA, Factor VM, et al.** Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67:9844-51.
86. **Takeya R, Ueno N, Sumimoto H.** Regulation of superoxide-producing NADPH oxidases in nonphagocytic cells. *Methods Enzymol* 2006; 406:456-468.
87. **Takeya R, Sumimoto H.** Regulation a novel Superoxide-Producing NADPH Oxidases. *Antiox Redox Signal* 2006; 8:1523-1532.
88. **Tellez-Avila FI, Sánchez-Avila F, García-Saenz de Sicilia M, Chávez-Tapia NC, Franco-Guzmán AM, López-Arce G, Cerda-Contreras E, Uribe M.** Prevalence of metabolic síndrome, obesity and diabetes type 2 in cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:4771-5.
89. **Tilg H, Diehl AM.** Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000; 343:1467-1476.
90. **Trusolino L, Bertotti A and Comoglio PM.** MET signaling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(12):834-48. doi: 10.1038/nrm3012
91. **Uribe M.** Esteatosis hepática, obesidad y comorbilidades. *Rev Gastroenterol Mex* 2008; supl 2 (73):22- 25.
92. **Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, Hernández E, Kershenobich D, Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz E.**

- Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med* 2009; 47:424-30.
93. **Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J.** Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J* 2006; 395:599-609.
94. **Wallace DC.** Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* 1999; 283:1482-1488.
95. **Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA.** Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:1697-1702.
96. **Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF.** The regulatory role of AT<sub>1</sub> receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub>. *World J Gastroenterol* 2000; 6:824-828.
97. **Yamamoto S, Abe H, Kohgo T, et al.** Two novel gene mutations (Glu 74Lys, Phe 383Tyr) causing the "hepatic" form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Human Genet* 1996; 98:116-118.

## 10. TABLAS

<b>Tabla 1. Anticuerpos empleados en Inmunoblot</b>		
<b>Anticuerpo</b>	<b>Masa molecular kDa</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
Gp91 phox (Nox2)	65	Conejo
p47	45	Cabra
Nrf2	56	Conejo
SOD-1	23	Conejo
GPX	23	Ratón
Actina	43	Ratón

## La acumulación de colesterol en hepatocitos sobreactiva el fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADPH) oxidasa pero abroga la respuesta de protección del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

Alberto G. López-Reyes<sup>1,2</sup>, Karina Martínez-Flores<sup>2</sup>, Denise Clavijo-Cornejo<sup>2</sup>, Natalia Nuño-Lámbarrri<sup>3</sup>, Mayrel Palestino-Domínguez<sup>3</sup>, Verónica Souza<sup>3,4</sup>, Leticia Bucio<sup>3,4</sup>, Arturo Panduro<sup>4,5</sup>, Roxana U. Miranda<sup>3,4</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>3,4</sup> y María Concepción Gutiérrez-Ruiz<sup>3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F., México; <sup>2</sup>Laboratorio de Sinovioanálisis, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F., México; <sup>3</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F., México; <sup>4</sup>Red Fisiopatología de las Enfermedades Hepáticas, PROMEP-SEP, México D.F., México; <sup>5</sup>Departamento de Biología Molecular en Medicina, Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México

### Resumen

El incremento en la prevalencia de la obesidad en México está generando también el aumento de varias enfermedades crónicas, entre ellas las relacionadas con el hígado. Datos experimentales muestran que es el tipo de lípido, más que el contenido de ellos, lo que marca la susceptibilidad al daño hepático. La sobrecarga de colesterol en el hígado conduce al agravamiento en el daño inducido por otros agentes tóxicos; sin embargo, poco se ha explorado con respecto al estado que guarda la protección celular, sobre todo aquella mediada por el NADPH oxidasa e inducida por el HGF. En el presente trabajo nos centramos en estudiar los efectos de la sobrecarga de colesterol en el proceso de protección mediado por la vía de HGF/NADPH oxidasa. Los resultados muestran que una dieta hipercolesterolémica indujo daño hepático y esteatosis en ratones. Los hepatocitos aislados de estos animales mostraron una sobreactivación de la oxidasa, pero no respondieron al efecto del HGF. La dieta hipercolesterolémica disminuyó la expresión de los componentes del NADPH oxidasa, lo cual se ve compensado por un incremento en la actividad. En conclusión, la sobrecarga de colesterol impide la protección hepática mediada por el sistema HGF/NADPH oxidasa.

**PALABRAS CLAVES:** Colesterol. Hepatocitos. Esteatosis. NADPH oxidasa. HGF.

### Abstract

The increment in the prevalence of obesity incidence in Mexico is leading to the increase in many chronic maladies, including liver diseases. It is well known that lipid-induced liver sensitization is related to the kind of lipid rather than the amount of them in the organ. Cholesterol overload in the liver aggravates the toxic effects of canonical liver insults. However, the status on the repair and survival response elicited by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and the

#### Correspondencia:

\*María Concepción Gutiérrez-Ruiz  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa  
Av. San Rafael Atlixco, 186  
Col. Vicentina, C.P. 09340, Iztapalapa  
México, D.F., México  
E-mail: mcgr@xanum.uam.mx

Este trabajo fue apoyado por el Conacyt #166042 y #131707.  
PROMEP-SEP # 913026-14612111.

Fecha de recepción en versión modificada: 05-06-2014  
Fecha de aceptación: 22-01-2015

*hepatocyte growth factor (HGF) is not completely understood. In the present, work we aimed to figure out the HGF/NADPH oxidase-induced cellular protection in the hepatocyte with a cholesterol overload. Our results show that a hypercholesterolemic diet induced liver damage and steatosis in mice. The hepatocytes isolated from these animals exhibited an increase in basal NADPH oxidase activity, although transcriptional levels of some of its components were decreased. No effect on the oxidase activity was observed in HGF treatments. The protective effect of HGF was abrogated as a result of cholesterol cellular overload, calculated by a survival assay. In conclusion, the cholesterol overload in hepatocytes impairs the HGF/NADPH oxidase-induced cellular protection.* (Gac Med Mex. 2015;151:456-64)

**Corresponding author:** María Concepción Gutiérrez-Ruiz, mcgr@xanum.uam.mx

**KEY WORDS:** Cholesterol. Hepatocyte. Steatosis. NADPH oxidase. HGF.

## Introducción

La obesidad representa el principal problema de salud pública en nuestra sociedad, ya que, al igual que la diabetes y el síndrome metabólico, son consideradas desórdenes pandémicos en países desarrollados<sup>1</sup>.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico; sin embargo, este desorden puede presentarse independiente de este padecimiento, ya que forma parte de la historia natural de muchas de las enfermedades hepáticas<sup>2</sup>.

A pesar de que se asume que el hígado graso es el resultado de la acumulación de triglicéridos (TG), el potencial tóxico de otros lípidos, como el colesterol, ha sido muy poco estudiado. En los últimos años, se han reportado algunos estudios experimentales de que la sobrecarga de colesterol representa, tal vez, el principal mediador tóxico en la NAFLD o la esteatohepatitis<sup>3,4</sup>. En humanos se ha visto que el colesterol libre se encuentra incrementado en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y se correlacionó con la activación de proteína unidora a elementos de respuesta a esteroides (SREBP-2), factor transcripcional que dirige la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol<sup>5</sup>.

El colesterol es un lípido con una importancia biológica indiscutible, forma parte fundamental de las membranas biológicas y es precursor de varias hormonas y de sales biliares; sin embargo, la pérdida en el balance de este lípido genera problemas que impactan en la salud, ya sea por falta o bien por exceso de él<sup>6</sup>.

Recientemente hemos publicado que una dieta alta en colesterol (HC) (2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio) altera el proceso reparador en el hígado mediado por el HGF<sup>4</sup>.

El HGF representa uno de los principales mediadores de hepatoprotección cuando interactúa con su receptor, el protooncogén c-Met; se inicia una cascada de señalización mediada por sistemas como PI3K/Akt, Stat3 o Erk, que activan sistemas que confieren sobrevivencia, mitogénesis, motogénesis y protección antioxidante<sup>7-9</sup>. Nuestro grupo de investigación ha venido caracterizando este último aspecto en los años recientes. Hemos reportado que el HGF es capaz de inducir la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa o la superóxido dismutasa (SOD), que confieren protección contra los efectos tóxicos inducidos por el metabolismo de etanol<sup>8</sup> o por los fármacos antifímicos rifampicina e isoniazida<sup>10</sup>. Por otro lado, hemos reportado que la ausencia de señalización de c-Met condiciona la gravedad de procesos fibrogénicos<sup>11</sup> y carcinogénicos<sup>12,13</sup> en estudios llevados a cabo en ratones con eliminación condicional de c-Met en el hígado.

Recientemente, hemos publicado que el HGF/c-Met regula sistemas prooxidantes, como el NADPH oxidasa, encontrando que el HGF ejerce un efecto bifásico en el sistema, estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tiempos cortos y reprimiéndolo transcripcionalmente en tiempos superiores a las 12 h de tratamiento con el factor de crecimiento. Esta regulación bifásica demostró en ambos casos ejercer respuestas protectoras y de sobrevivencia en hepatocitos<sup>14</sup>. De hecho, análisis transcriptómicos globales o microarreglos llevados a cabo por nuestro grupo han mostrado que la simple eliminación del receptor c-Met incrementa la actividad de NADPH oxidasa y el estrés oxidante por la pérdida del control de c-Met sobre la oxidasa<sup>12</sup>.

El NADPH oxidasa es un sistema multicomponente formado por subunidades membranales como las catalíticas NOX1-5 y p22; por otro lado, están las regulatorias que se encuentran en el citosol, como p47,

p67, entre otras, y que son reclutadas por las NOX y p22 para iniciar la producción de ROS, particularmente de anión superóxido<sup>15</sup>. Uno de los sistemas más conservados y distribuidos en prácticamente todos los tipos celulares es el sistema de NOX2, el cual requiere de la activación de p47 para una eficiente función. Se sabe que p47 es un regulador central en la actividad de la enzima y que es activado por cinasas como la proteína cinasa C, que a su vez es activada por el HGF/c-Met<sup>14</sup>.

Partiendo del conocimiento de que las diferentes formas de NADPH oxidasa se encuentran como proteínas integrales de membrana y de que una sobrecarga de colesterol puede afectar notablemente a las membranas celulares, en el presente trabajo nos hemos enfocado en el estudio del efecto regulador ejercido por el HGF en el sistema del NADPH oxidasa en hepatocitos con una sobrecarga celular de colesterol.

## Materiales y métodos

### Animales

En el presente estudio se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL6 de 8-12 semanas de vida. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación y el manejo de los mismos se hizo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a la *NIH guidelines for the care and use of laboratory animals*. Los animales estuvieron a una temperatura controlada (22 °C), ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h y un régimen de comida y agua de libre acceso. Se formaron dos grupos con 10 animales en cada uno. Los ratones, previo al inicio de la dieta, se dejaron en ayuno durante 12 h. El primer grupo fue alimentado durante 48 h con una dieta balanceada estándar (Chow), y el segundo recibió una dieta hipercolesterolémica consistente en la dieta estándar Chow suplementada con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio.

### Diseño experimental

Al término del tratamiento se extrajo sangre total de los animales de ambos grupos y se separó el suero para realizar pruebas bioquímicas de función hepática, así como para determinar el perfil de lípidos. El tejido hepático fue seccionado para ser fijado con paraformaldehído neutro al 4% y ser embebido en parafina para los estudios histológicos; otra parte fue congelada a -80 °C hasta su utilización.

### Histología

Se obtuvieron cortes de 7 µm de los tejidos en parafina y se llevaron a cabo tinciones rutinarias de hematoxilina y eosina.

### Pruebas bioquímicas y de función hepática

Las mediciones de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol y TG fueron analizadas por un método automatizado empleando el sistema Reflotron (Roche, Inc.).

### Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos

Otro grupo de animales se ocupó para el aislamiento de hepatocitos, los cuales se obtuvieron por el método de la doble perfusión con colagenasa, siguiendo el protocolo previamente reportado por Gómez-Quiroz, et al. en 2008<sup>16</sup>. Los hepatocitos fueron cultivados en cajas de Petri a una densidad de 250,000 cel/cm<sup>2</sup> en medio Williams E suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) e incubados en una atmósfera controlada (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). La monocapa de hepatocitos adherida a las 4 h fue lavada con *buffer* salino de fosfatos y el medio fue reemplazado por otro libre de SFB.

Los hepatocitos en cultivo se trataron con 50 ng/ml de HGF (Peprotech, EE.UU.) a diferentes tiempos (0.5, 1, 3, 6 y 12 h). Después del tratamiento con HGF las células se utilizaron para la determinación del contenido de lípidos o fueron lisadas para extraer proteína total para *Western blot*. Otro grupo de células se empleó para determinar la actividad del NADPH oxidasa.

### Determinación de colesterol libre con filipina

El contenido de colesterol en hepatocitos se determinó empleando la filipina (*filipin*) en hepatocitos aislados de ambos grupos siguiendo el protocolo reportado por Marí, et al.<sup>3</sup>.

### Determinación de ROS en hepatocitos

La determinación de ROS, particularmente del anión superóxido, se realizó de acuerdo a lo reportado previamente<sup>10</sup>.

## Western blot

El análisis del contenido de proteína se realizó por *Western blot* de acuerdo al protocolo reportado previamente<sup>17</sup>. Se utilizaron anticuerpos contra NOX2, p47 y Nrf2, todos ellos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. La normalización de la carga se realizó con antiactina (NeoMarkers, Fremont, CA).

## Determinación histológica de lípidos neutros

La determinación de los lípidos neutros se realizó por medio de la técnica del aceite rojo O como se ha reportado previamente<sup>4</sup>.

## Actividad del NADPH oxidasa

La actividad de la enzima se realizó por la determinación del anión superóxido en un sistema con inhibición del NADPH oxidasa de acuerdo a lo reportado por Pescatore, et al. en 2012<sup>18</sup>.

## Ensayo de viabilidad

La viabilidad se determinó empleando el estuche comercial CCK-8 (Dojindo, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 5,000 cel/pozo en placas de 96 pozos, posteriormente se les retiró el medio y se suplementó con uno fresco libre de suero.

Las células Chow y HC se trataron con antimicina A (AA) (15  $\mu$ M) durante 12 h, en presencia o no de HGF (50 ng/ml). Adicionalmente, otro grupo de células fue pretratado con difenil iodonium (DPI), un inhibidor de NADPH oxidasa (10  $\mu$ g/ml) 30 min previo al tratamiento con HGF, posteriormente se agregó la AA.

## Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó empleando el estuche comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce-Thermo Scientific, Inc.), basado en la técnica del ácido bicinonínico siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Análisis estadístico

Los datos están representados como el promedio  $\pm$  error estándar en al menos tres experimentos independientes. La comparación entre grupos se realizó por medio de la prueba de *analysis of variance* de una vía

con una prueba *post hoc* de Bonferroni usando el programa informático GraphPad Prism 5 para Mac OS X. Las diferencias se consideraron significativas con una  $p < 0.05$ .

## Resultados

Al término de los dos días de tratamiento los animales no mostraron cambios significativos con respecto a su comportamiento, peso total y del hígado (datos no mostrados). Al realizar la inspección del hígado se notó una coloración pálida en el de los animales que se alimentaron con la dieta HC, tal y como hemos reportado previamente<sup>4</sup>.

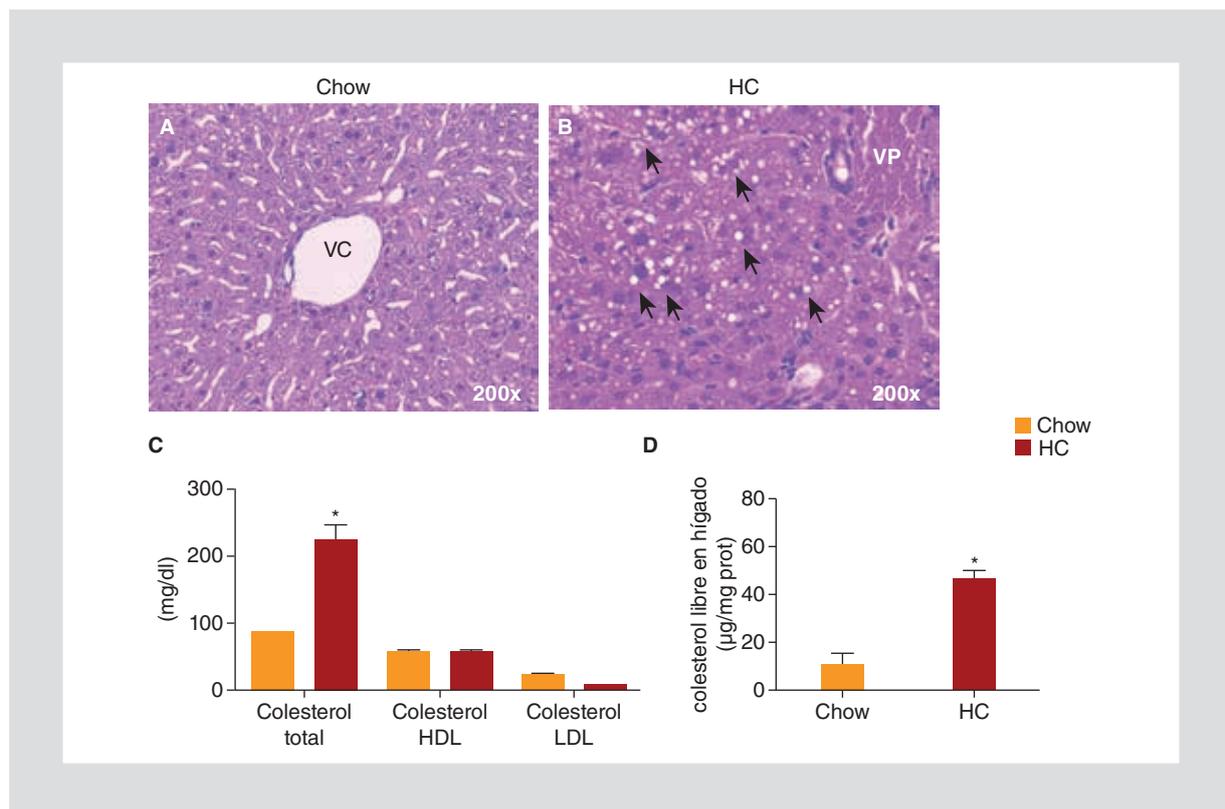
Con la finalidad de determinar el fenotipo esteatótico en los animales alimentados con la dieta HC, se realizó una tinción rutinaria de hematoxilina y eosina. La figura 1 B muestra claramente una esteatosis, particularmente microvesicular en comparación con los animales alimentados con la dieta balanceada Chow (Fig. 1 A).

Se realizó un análisis del perfil lipídico en suero en los animales, encontrando el colesterol total (CL) y los TG elevados (Fig. 1 C), sin cambios significativos en HDL y en LDL; igualmente, el CL se encontró elevado en tejido hepático en los animales con HC (Fig. 1 D) respecto a los animales Chow.

El daño en el hígado fue evidenciado por el incremento significativo en las actividades de las enzimas AST, ALT y LDH en los animales HC con respecto a los Chow.

Posteriormente se aislaron los hepatocitos y se mantuvieron como cultivo primario. Con la finalidad de verificar que el proceso de aislamiento y cultivo no afectó a la sobrecarga lipídica tanto de colesterol como de lípidos neutros, se realizó una detección por microscopía del colesterol libre, usando filipina, un antibiótico natural que reconoce al hidroxilo del colesterol libre emitiendo fluorescencia, y por medio del aceite rojo O para los lípidos neutros. La figura 2 B muestra claramente que los hepatocitos de ratones HC presentan mayor fluorescencia con respecto a los Chow; el análisis fluorométrico se evidencia en la figura 2 C. De manera muy similar, los hepatocitos HC mostraron un incremento significativo en el contenido de lípidos neutros en comparación con los Chow (Figs. 2 E y F).

Previamente reportamos que el HGF ejerce un efecto bifásico, en hepatocitos primarios, sobre el NADPH oxidasa, incrementando su actividad a tiempos cortos de tratamiento y disminuyéndola a tiempos largos<sup>14</sup>.



**Figura 1.** La dieta HC induce esteatosis. Los hígados de animales alimentados con la dieta regular Chow o HC durante dos días fueron extraídos y preparados para un análisis de hematoxilina y eosina. **A:** sección de un hígado Chow. **B:** sección de un hígado HC. Las flechas indican gotas lipídicas. Imágenes representativas de al menos tres animales. Aumento original 200X. **C:** perfil lipídico. **D:** colesterol libre determinado por métodos automatizados. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus Chow.

Con la finalidad de evaluar si la sobrecarga de colesterol modifica este comportamiento, realizamos un ensayo en la actividad de la enzima determinando la generación de anión superóxido en presencia o ausencia de DPI, un inhibidor de la oxidasa, y de SOD, enzima dismutante del superóxido; la figura 3 muestra que los hepatocitos HC presentan un incremento significativo en la actividad basal (HC NT) en relación a las células no tratadas Chow; sin embargo, el HGF fue incapaz de modificar de alguna forma la actividad de la enzima.

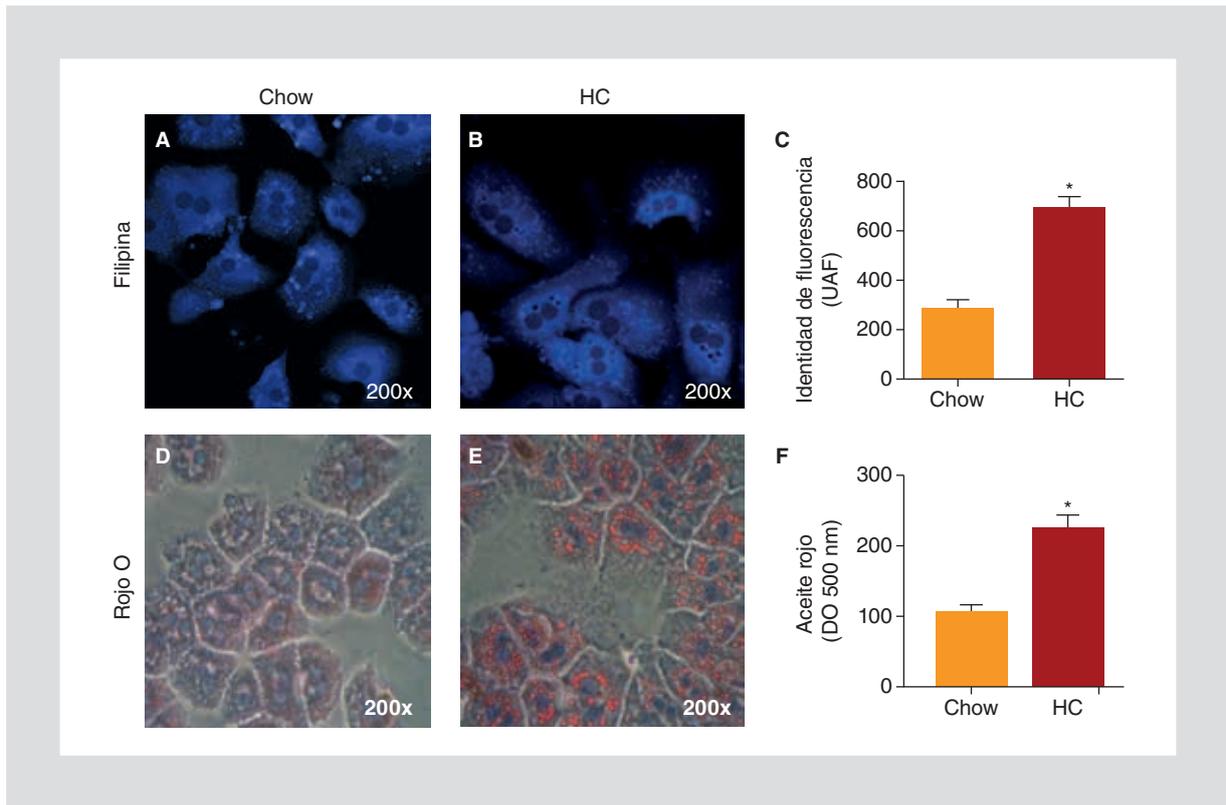
Un análisis en el contenido por *Western blot* de los principales componentes catalíticos (NOX2) y reguladores (p47) del sistema del NADPH oxidasa, así como del factor de transcripción que responde a NADPH oxidasa (Nrf2), fueron analizados por *Western blot*. En la figura 4 se observa el análisis densitométrico de estas proteínas y de los geles representativos (Fig. 4 D). Los datos muestran que lejos de tener un incremento transcripcional se observó una disminución significativa en las células HC NT con respecto al Chow NT. Transcripcionalmente el HGF

indujo una disminución a la 1 y 3 h de tratamiento en NOX2, en p47 a las 3 h y en Nrf2 a las 3 h con respecto al HC NT.

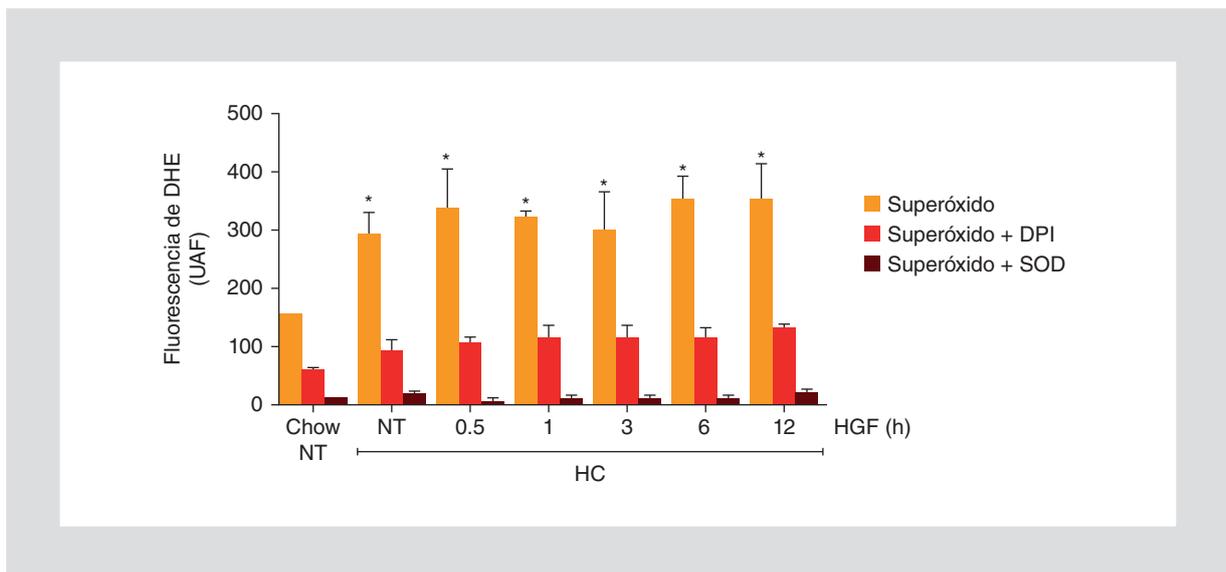
Finalmente, para determinar el estado protector que guarda el HGF en los hepatocitos HC se realizó un estudio de viabilidad con CCK-8. La figura 5 muestra que el HGF fue capaz de proteger ante los efectos prooxidantes de la AA, mientras que las células HC no mostraron efecto protector alguno mediado por el HGF. El inhibidor del NADPH oxidasa DPI abrogó la respuesta protectora del HGF observada en las células Chow sin efecto en las HC.

## Discusión

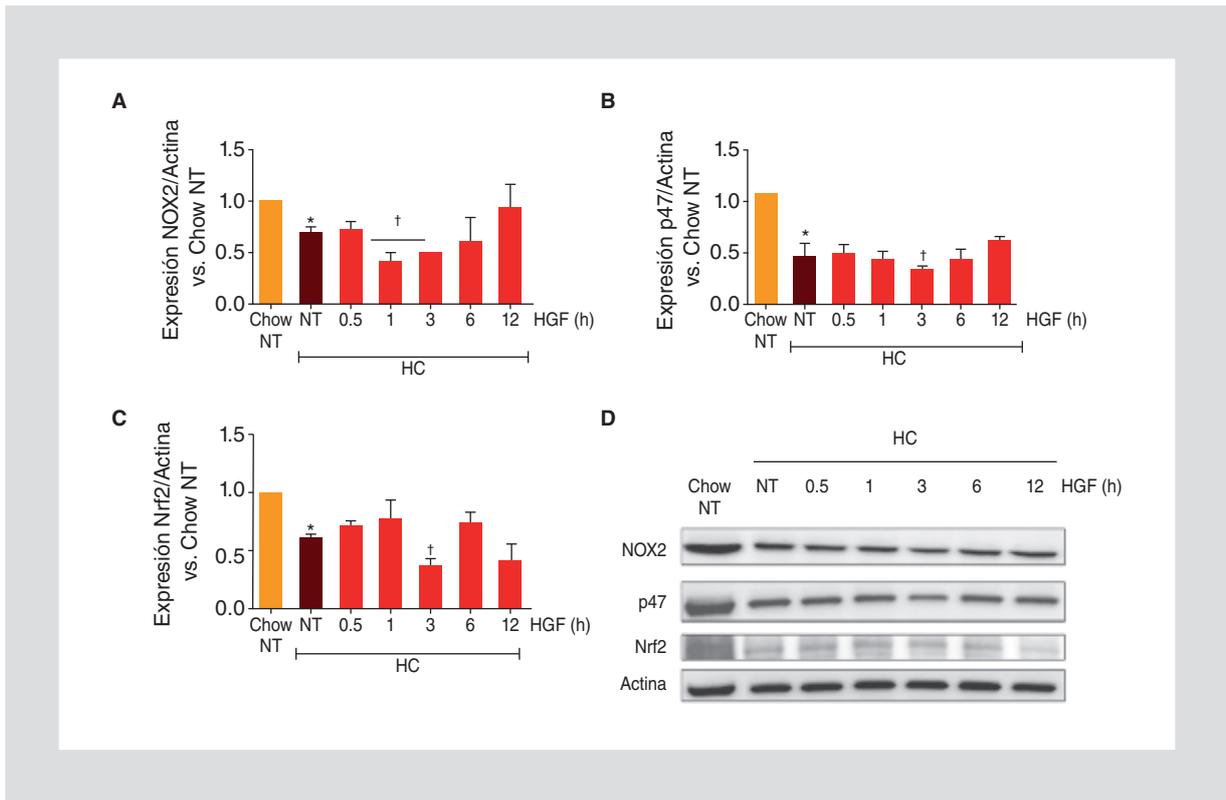
Se ha documentado ampliamente el grave problema que existe en México con la obesidad, particularmente infantil<sup>19</sup>, la cual está impactando en el ser humano no sólo en el sistema cardiocirculatorio o en el metabolismo, sino también a nivel hepático, donde se ha venido documentando su impacto en desórdenes como la NAFLD y NASH.



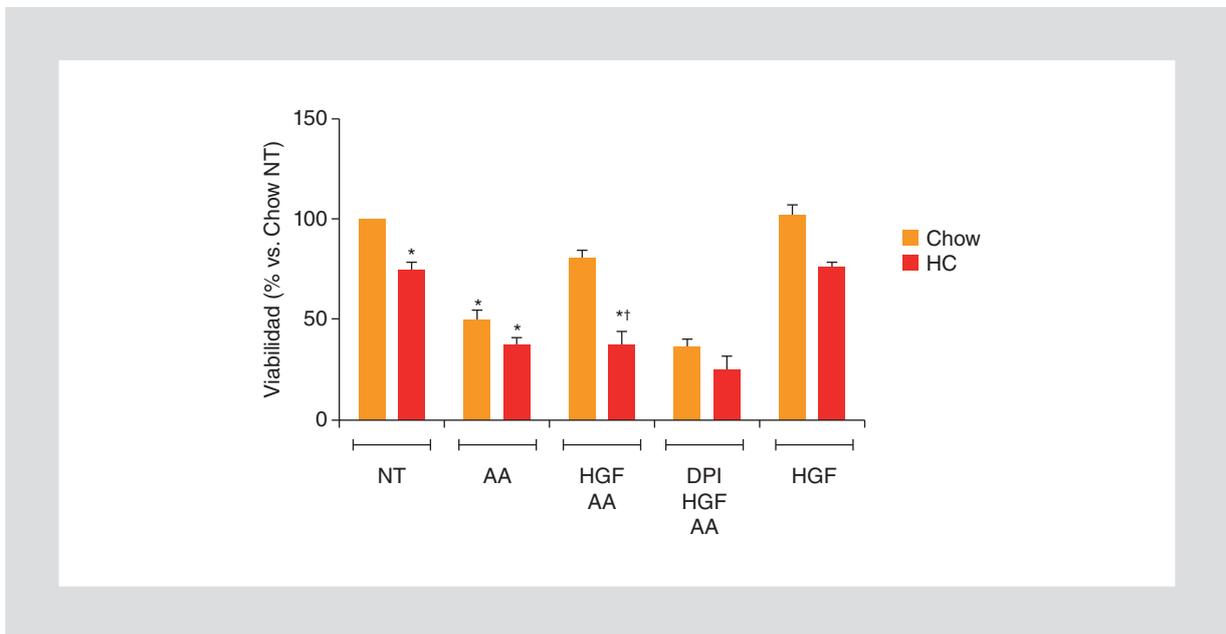
**Figura 2.** Contenido de colesterol y lípidos neutros en hepatocitos aislados y en cultivo. Los hepatocitos se aislaron por el método de la doble perfusión con colagenasa y se cultivaron en las condiciones especificadas en material y métodos. Se determinó la presencia de colesterol por medio de filipina en hepatocitos Chow (A) y en hepatocitos HC (B). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la filipina (C) se realizó con el software Image J. Los lípidos neutros se detectaron con la prueba de aceite rojo O en hepatocitos Chow (D) y en hepatocitos HC (E). Posteriormente se extrajo el aceite rojo y se cuantificó a 500 nm por espectrofotometría (F). Las fotografías se muestran a un aumento original de 200X. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM. UAF: unidad arbitraria de fluorescencia. \* $p < 0.05$  versus Chow.



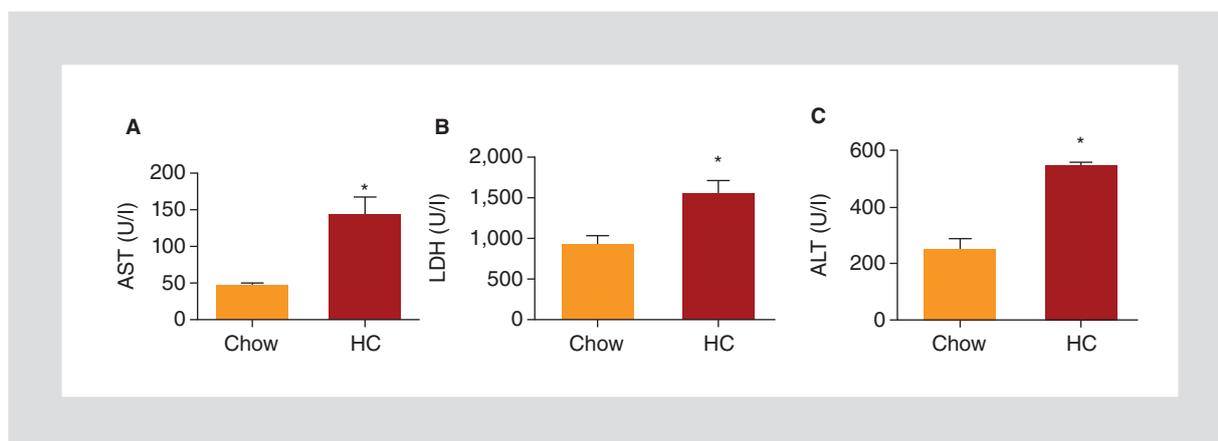
**Figura 3.** Actividad de NADPH oxidasa. Los hepatocitos fueron aislados de ratones Chow y de HC, se cultivaron y se trataron o no con 50 ng/ml de HGF durante los tiempos indicados. Se cuantificó la producción de anión superóxido de acuerdo a la técnica especificada en el apartado «Materiales y métodos» en presencia o no del inhibidor de NADPH oxidasa DPI o de la enzima SOD. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM de las UAF. \* $p < 0.05$  versus Chow.



**Figura 4.** Niveles de expresión por Western blot. La proteína total se aisló y se procedió a realizar el Western blot como se especifica en el apartado «Materiales y métodos»; se corrieron al menos tres experimentos independientes. Se reporta la gráfica del análisis densitométrico. **A:** NOX2. **B:** p47. **C:** Nrf2. **D:** geles representativos. La actina se usó como control de carga. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus Chow NT. † $p < 0.05$  versus HC NT.



**Figura 5.** Viabilidad celular. Tanto las células Chow como las HC fueron cultivadas en placas de 96 pozos y fueron tratadas o no con AA (15  $\mu$ M) durante 6 h, en presencia o no de HGF (50 ng/ml) o DPI (10  $\mu$ g/ml). La viabilidad al término de los tratamientos se determinó por medio del estuche comercial (kit) CCK-8 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las barras representan el promedio de cuatro experimentos independientes  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus Chow NT. † $p < 0.05$  versus Chow HGF+AA.



**Figura 6.** Determinación de pruebas de función hepática. **A:** AST. **B:** LDH. **C:** ALT. La determinación se llevó a cabo por métodos automatizados como se refiere en la sección «Materiales y métodos». Cada barra representa el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  versus Chow.

La Organización Mundial de la Salud ha dejado claro que los tres principales factores de riesgo para las enfermedades crónicas son el tabaquismo, la hipertensión y los niveles elevados de colesterol en plasma<sup>20</sup>. Algunos estudios han mostrado, particularmente en adolescentes y niños mexicanos, que los niveles de colesterol son muy elevados, ubicándolos como personas con un alto riesgo de padecer enfermedades crónicas en la etapa adulta<sup>21-23</sup>.

Se ha publicado que una dieta rica en colesterol genera un incremento en el contenido de este lípido en hepatocitos de animales de experimentación, mostrando que el hígado es más susceptible a estímulos citotóxicos mediados, por ejemplo, por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Esta sensibilización ejercida por los lípidos acumulados se presentó exclusivamente en animales con una sobrecarga de colesterol y no en aquéllos que recibieron una dieta que favorecía la sobrecarga de TG, pero no de colesterol, lo que confirma que es el tipo de lípidos, y no la cantidad, lo que determina el daño hepático<sup>3</sup>.

La dieta HC proporcionada a los animales mostró ejercer un efecto esteatogénico claro; las histologías mostradas en la figura 1 muestran el tejido hepático con esteatosis, particularmente microvesicular, mientras que los niveles en suero de colesterol libre están significativamente elevados con respecto a los animales con dieta Chow, sin cambios en HDL y LDL (Fig. 1 C). Estudios llevados a cabo en pacientes con esteatosis y NASH mostraron que el contenido de colesterol libre es mayor en NASH que en esteatosis, y esto correlacionó con la inducción del factor de transcripción SREBP-2<sup>5</sup>.

El daño en el hígado se evidenció por un incremento en las pruebas de función hepática (Fig. 6), las

cuales se elevaron significativamente en los animales alimentados con la dieta HC, lo cual es congruente con lo reportado previamente por Marí, et al.<sup>3</sup>, dejando patente una vez más que el contenido de colesterol se relaciona con la severidad en el daño hepático.

Con la finalidad de conocer directamente el efecto en el mecanismo de protección iniciado por el HGF y el NADPH oxidasa en los hepatocitos, aislamos hepatocitos de animales de ambos grupos y analizamos el contenido de lípidos. La figura 2 muestra que aun en cultivo los hepatocitos retienen la sobrecarga tanto de colesterol (Fig. 2 B) como de lípidos neutros (Fig. 2 E).

Procedimos a determinar la actividad del NADPH oxidasa en los hepatocitos HC. La figura 3 muestra que las células HC no tratadas presentan un incremento significativo en la actividad del NADPH oxidasa con respecto a las Chow no tratadas; sin embargo, a diferencia de lo encontrado previamente en hepatocitos Chow<sup>14</sup>, el HGF no mostró efecto alguno sobre dicha actividad en los hepatocitos HC. Clavijo-Cornejo, et al.<sup>14</sup> reportaron previamente un incremento en la actividad, desde los 5 min teniendo un pico máximo a los 30 min de tratamiento, decayendo la actividad hasta valores por debajo del control a las 24 h. Ambos efectos mostraron ser fundamentales para la protección ejercida por el HGF. El incremento temprano tendió a la activación de Nrf2, un factor de transcripción encargado de la expresión de proteínas antioxidantes y de fase II y III de detoxificación<sup>24-26</sup>, mientras que la represión transcripcional mediada por el HGF evitó la utilización de NADPH oxidasa por factores citotóxicos como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ . Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la sobrecarga de colesterol abrogó la activación de

NADPH oxidasa por el HGF. Así mismo, si bien la dieta por sí sola indujo la represión transcripcional de proteínas del sistema como NOX2, NOX4 y p47, el HGF no influyó en este efecto negativo (Fig. 4).

Interesantemente, los datos muestran un resultado compensador en el NADPH oxidasa, ya que si bien la dieta HC disminuyó su expresión, la actividad se encuentra elevada, lo que sugiere un claro efecto compensatorio.

Nuestro grupo ha caracterizado los efectos del HGF como factor hepatoprotector. Sabemos que la ausencia en la señalización de él condiciona a daño oxidante, apoptótico, fibrótico y carcinogénicos<sup>11-13,16</sup>, dejando claro lo indispensable que es la respuesta del HGF en la protección hepática. En el presente trabajo mostramos que la sobrecarga de colesterol impide la respuesta protectora del HGF, lo cual condicionó al daño oxidante (Fig. 5).

Los resultados sugieren fuertemente que en estados hipercolesterolémicos el HGF es incapaz de ejercer su respuesta protectora presentando al hígado vulnerable, particularmente ante retos prooxidantes como pueden ser la infección por el virus de la hepatitis B o C, el alcohol o procesos inflamatorios sistémicos. El control de los niveles hepáticos de colesterol libre se posiciona como un nuevo blanco de intervención terapéutica.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Conacyt #166042 y #131707. PROMEP-SEP # 913026-14612111 y por la Universidad Autónoma Metropolitana. Alberto G. López-Reyes es estudiante del doctorado en Biología Experimental de la DCBS, UAMI. Agradecemos a la unidad de microscopía confocal de la DCBS UAMI y al M en C Roberto Lazzarini por la adquisición y análisis del ensayo con filipina.

## Bibliografía

1. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nut Rev*. 2012;70(1):3-21.
2. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013;19(3):210-5.
3. Mari M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006;4(3):185-98.
4. Gutiérrez Ruiz MC, Domínguez Pérez M, Rodríguez González S, Nuno Lámbarri N, Licona Retama C, Gómez-Quiroz LE. [High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]. *Gac Med Mex*. 2012;148(3):236-42.
5. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballero J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and S1A expression in human NASH. *J Hepatol*. 2009;50(4):789-96.
6. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):125-38.
7. Thorgeirsson SS. The central role of the c-Met pathway in rebuilding the liver. *Gut*. 2012;61(8):1105-6.
8. Valdes-Arzate A, Luna A, Bucio L, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):424-30.
9. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(12):834-48.
10. Enriquez-Cortina C, Almonte-Becerril M, Clavijo-Cornejo D, et al. Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicol Sci*. 2013;135(1):26-36.
11. Marquardt JU, Seo D, Gomez-Quiroz LE, et al. Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):942-51.
12. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1582-95.
13. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, et al. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodimethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2007;67(20):9844-51.
14. Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, Lopez-Reyes A, et al. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*. 2013;95(6):1177-84.
15. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
16. Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283(21):14581-9.
17. Gomez-Quiroz LE, Paris R, Lluís JM, et al. Differential modulation of interleukin 8 by interleukin 4 and interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. *Liver Int*. 2005;25(1):122-30.
18. Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29290-300.
19. Fernández Cantón, Sonia B. MN, Yura A, Viguri Uribe R. Sobrepeso y obesidad en menores de 20 años de edad en México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011;68:79-81.
20. OMS. Dieta, Nutrición y Prevención de enfermedades crónicas. Informe de una consulta Mixta de Expertos OMS. 2003.
21. Roth GA, Fihn SD, Mokdad AH, Aekplakorn W, Hasegawa T, Lim SS. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. *Bull World Health Organ*. 2010;89(2):92-101.
22. González G, Fernández JD, Sánchez J, Rodríguez JJ, Quintero AG. Colesterolemia en adolescentes sexo femenino de morelos, México. *Revista Chilena de Nutrición*. 2005; 32(2):134-41.
23. Juárez-Muñoz IE, Anaya-Florez MS, Mejía-Arangure JM, et al. Niveles séricos de colesterol y lipoproteínas y frecuencia de hipercolesterolemia en un grupo de adolescentes de la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2006;63:162-8.
24. Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(1):57-65.
25. Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(1):37-42.
26. Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J*. 2006;395(3):599-609.