



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en un modelo murino de colestasis

T E S I S

Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Elsy Soraya Salas Silva

Comité Tutorial:

Directora de tesis: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Asesor: Dr. Marcelo Roma

Asesor: Dr. Nahum Méndez-Sánchez

Ciudad de México, 20 de Julio del 2016

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020". Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 584313

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

El jurado designado por la comisión académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada:

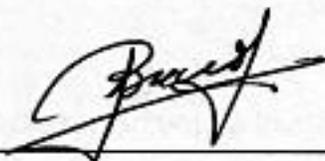
“Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en un modelo murino de colestasis”

Presentó

Biol. Exp. Elsy Soraya Salas Silva

El día 20 de Julio del año 2016

SINODALES



PRESIDENTA

Dra. Leticia Bucio Ortiz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Ciudad de México



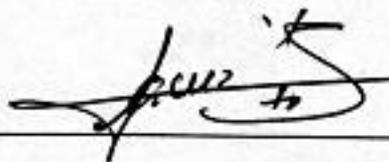
SECRETARIA

Dra. Denise Clavijo Cornejo
Laboratorio de Líquido Sinovial
Instituto Nacional de Rehabilitación
Ciudad de México



VOCAL

Dr. Benjamín Pérez Aguilar
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Ciudad de México



VOCAL

Dr. José Luis Gómez Olivares
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana
Ciudad de México

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA DE TESIS:

Doctora María Concepción Gutiérrez Ruíz

Profesor Titular C, Tiempo Completo

Laboratorio de Fisiología Celular

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR:

Doctor Marcelo Gabriel Roma

Profesor Adjunto e Investigador Principal del CONICET (Argentina)

Instituto de Fisiología Experimental

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad de Rosario, Argentina

mroma@fbioyf.unr.edu.ar

ASESOR:

Doctor Nahum Méndez-Sánchez

Investigador, Gastroenterólogo-Hepatólogo.

Departamento de Investigación Biomédica.

Fundación Clínica Médica Sur. México, D.F.

nmendez@medicasur.org.mx

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora de tesis, la doctora Conchita, primero por aceptarme en su laboratorio y por confiar en mí y asesorarme desde la licenciatura, porque cada que busqué ayuda me la brindó y por compartir sus conocimientos conmigo.

A mi director de tesis no oficial, el doctor Luis por estar ahí siempre que lo necesito, por impulsar mi proyecto, porque sin usted mi proyecto no sería lo que es, por hacerme ver las cosas de diferente manera y darme las herramientas para ser una buena científica, porque sus exigencias al final valen la pena.

Al doctor Marcelo, por todo, por su disposición y amabilidad para aceptarme en su laboratorio, por hacerme sentir como en casa, por siempre escucharme y apoyarme en todos los aspectos, por su excelente calidad humana, porque hacen falta científicos como usted, por brindarme sus amplios conocimientos, porque mi proyecto no sería lo mismo sin un experto en el tema como usted.

A mi asesor Nahum Méndez por aceptar formar parte de mi comité tutorial, por brindarme sus opiniones y conocimientos.

A la doctora Vero, Lety y Roxana, por ayudarme cada vez que lo necesité y por su siempre buena disposición.

A Mayra por ser parte fundamental de mi aprendizaje, pues no solo me enseñaste y explicaste técnicas, también me ayudaste a ampliar mi conocimiento.

A Denise y Natalia por todas sus enseñanzas y su disposición a ayudar.

A Benja, Nelly, Eli y Cristina por ser mis amigos y los momentos tan agradables que pasamos juntos, por hacer reír siempre.

A Paty por ser incondicional conmigo, porque en ti encontré más que una compañera, una amiga, gracias por todos los momentos que hemos pasado y los que nos faltan heeee.

Gracias por el apoyo de todos mis compañeros de laboratorio, Carolina, Roberto, Braulio, Nacho, Alejandro, Monse, Ricardo y Mayrel.

Quiero agradecer a todos mis amigos que de alguna u otra forma me apoyaron durante este proceso y siempre me dieron ánimos, Ulises, Sergio, Gaby, Yazmin, Ale, Montse, Gersson, Miriam, Andrés, Fabian, Nadia, Gibrán, Bety, Bea, Wen, Luis, Enrique y disculpan si se me pasa alguien.

A mis compañeros del IFISE, Romina, Nadia, Flor, Mar, Aine, Flavia, Alejo, Mauro, Guille, Dani y a todos los que me ayudaron cuando se los pedí, al igual que a todos los profesores, son excelentes personas, pero en especial a Valeria y Paula que desde el primer momento estuvieron al pendiente de mí y me ayudaron infinitamente hasta el grado de convertirse en mis amigas, muchas gracias de verdad.

Y por último pero no menos importante a Arturo, gracias por todos estos años de amistad y compañerismo, por apoyarme y estar conmigo en todo momento. Gracias por estos 7 años, eres mi mejor amigo y espero que lo sigas siendo muchos años más, gracias por todo, Te quiero mucho.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, Patricia Silva y Rafael Salas, por apoyarme en todo momento, en todos los aspectos. Gracias a ustedes soy la persona que soy y créanme que hicieron un buen trabajo. Espero seguir teniendo su apoyo en los proyectos siguientes, de verdad estoy muy agradecida por los padres que tengo y por la vida que me han dado, si no fuera por la educación y enseñanzas que me dieron no hubiera podido realizar lo que he logrado.

También a mi hermano Ulises Salas que ha sido pieza fundamental en este proceso, tú has sido mi amigo y mi cómplice, al igual que mis padres, siempre has estado para mí cuando te necesito.

Quiero que sepan que los AMO y que siempre han sido y serán lo que me da fuerza he impulsa adelante, no tengo más que decir que GRACIAS.

También agradezco a toda mi familia, abuelos, tíos, primos y sobrinos, pues siempre me han dado una palabra de aliento y los mejores deseos para seguir adelante en lo que hago.

RESUMEN

La colestasis es un síndrome asociado a una reducción total o parcial del flujo biliar que llega al duodeno, producto de un bloqueo mecánico que impide su paso a través de las vías biliares intra o extrahepáticas (colestasis obstructiva) o a alteraciones hepatobiliares de los mecanismos hepatocelulares o ductulales de formación de bilis (colestasis funcional).

Debido a su frecuente gravedad y las limitadas alternativas terapéuticas con que se cuenta, tanto en número como en eficacia, es necesario realizar estudios con moléculas potencialmente terapéuticas que permitan evitar o contrarrestar el daño ocasionado por esta patología. Tal es el caso del factor de crecimiento hepatocitos (HGF), el cual es un factor de crecimiento con potentes efectos antioxidantes, proliferativos, antiapoptóticos, y de motilidad, por mencionar algunos. Esto lo hace activando diversos factores de transcripción, como Nrf2, el cual regula el estado redox de la célula a través de sus genes blanco.

En el presente estudio, se evaluó la capacidad anticolestásica de HGF ante el daño por ANIT (un conocido modelo de colestasis), y se indagó la activación de Nrf2 como un posible factor clave en los efectos anticolestásicos de HGF.

Se observó que HGF tiene claros efectos anticolestásicos, ya que restableció los niveles séricos de las pruebas bioquímicas de integridad hepática e indujo una mejora en las lesiones histológicas hepáticas ocasionadas por ANIT. Esto se debe a que el HGF produjo un aumento en la expresión de transportadores basolaterales y canaliculares de exportación y enzimas antioxidantes que son activadas por Nrf2.

Nuestros resultados permiten proponer por primera vez a HGF como un agente anticoléctásico altamente eficiente.

ABSTRACT

Cholestasis is a condition associated with a full or partial reduction in the bile flow that reaches the duodenum, caused either by a mechanical blockage impeding the normal flow of bile through the intra- and extrahepatic bile ducts (obstructive cholestasis) or due to alterations on the hepatocellular or ductular mechanisms of bile formation (functional cholestasis).

Since it is an often a serious health condition with limited therapeutic options both in number and efficacy, it is necessary to carry out studies with potentially therapeutic molecules that could prevent or counteract the damage generated by this pathology. Such is the case of hepatocyte growth factor (HGF), a growth factor with powerful antioxidant, proliferative, anti-apoptotic and motility-stimulating effects, among others. To perform these effects, this growth factor requires activation of many transcription factors, including Nrf2, which regulates, through its target genes, the redox balance within the cell.

In this study, we evaluated the anti-cholestatic capacity of HGF to counteract the damage caused by ANIT (a well known model of cholestasis), and also the activation of Nrf2 as a putative key factor in the anti-cholestatic HGF effect.

We observed that HGF has clear anti-cholestatic effects, because serum biochemical markers of liver integrity were improved, and liver histological ANIT injury decreased. This could be explained because this growth factor produced an enhancement in the

expression of basolateral and canalicular efflux transporters and of antioxidant enzymes induced by Nrf2.

Our results allow us to propose HGF as a highly efficient anti-cholestatic agent for the first time.

ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Generalidades.....	1
1.2	Morfología y organización hepática.....	1
1.3	El hepatocito.....	2
1.4	Canalículo biliar	3
1.5	Transportadores ABC	4
1.6	Colangiocitos.....	5
1.7	Colestasis	6
1.8	α -Naftil-isotiocianato.....	7
1.9	Estrés oxidante en colestasis	9
1.10	Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	11
1.11	Nrf2	13
2	Antecedentes	15
3	Justificación.....	16
4	Pregunta de investigación.....	17
5	Hipótesis	17
6	Objetivo general.....	17
7	Objetivos particulares	17
7.1	Diseño experimental	18
7.2	Materiales y métodos.....	19
7.2.1	Pruebas de funcionalidad hepática.....	19
7.2.2	Análisis histológico	19
7.2.3	Inmunodetección de proteínas en fase sólida (Western-Blot).....	20
7.2.4	Reacción en cadena de polimerasas (qRT PCR)	21
7.2.5	Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).....	22
7.2.6	Análisis estadístico.....	23

8	Resultados.....	24
9	Discusión	32
10	Conclusión.....	42
11	REFERENCIAS	44

1 INTRODUCCIÓN

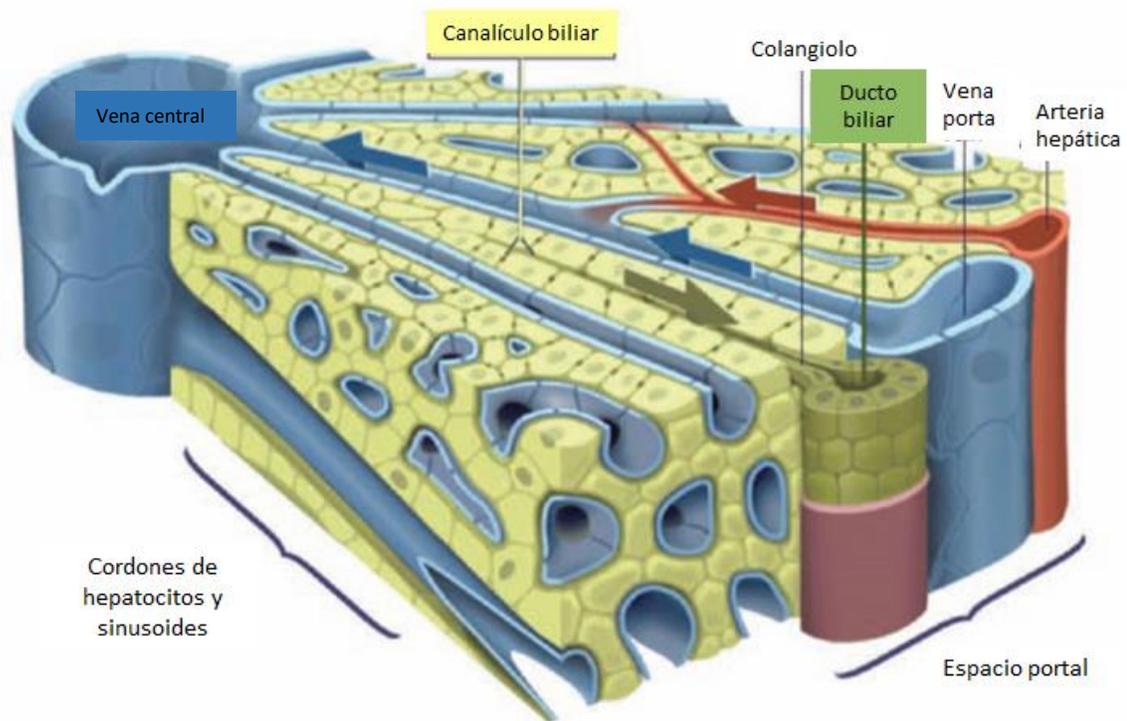
1.1 GENERALIDADES

El hígado desempeña funciones que se requieren para mantener la homeostasis del organismo, tal es el caso de la regulación que ejerce sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos, bilirrubina, la síntesis de proteínas, ácidos biliares y hormonas. También, es el órgano donde se almacenan múltiples sustancias como la glucosa en forma de glucógeno, la vitamina B12, la vitamina A, el hierro y el cobre, entre otras. Otra de sus funciones importantes es la de biotransformar agentes xenobióticos, la fagocitosis de bacterias, el balance ácido-base y diversas funciones inmunorreguladoras (1).

1.2 MORFOLOGÍA Y ORGANIZACIÓN HEPÁTICA

Un concepto útil para entender la organización estructural del hígado es el del lobulillo hepático. La sangre circula desde las vénulas portales hasta la periferia, atravesando los sinusoides hepáticos hasta llegar a la vena central. Las vénulas portales, los conductos biliares terminales y las arteriolas hepáticas se disponen formando una triada o espacio portal, como se observa en la Figura 1 (2). Los sinusoides hepáticos, llevan la sangre mezclada de las ramas terminales de la vena porta hasta la vena central para sintetizar las sales biliares. El parénquima hepático está conformado por un 78% de hepatocitos, 2.1% de macrófagos hepáticos (células de Kupffer), 2.8% de células endoteliales y 1.4% de células estelares (1).

Lobulillo hepático



Modificada de Treyer et al., 2013

Figura 1. Representación del lobulillo hepático y dirección del flujo sanguíneo y biliar.

1.3 EL HEPATOCITO

Los hepatocitos constituyen el principal tipo celular del hígado, y pueden ser consideradas como las células efectoras clave, debido a que la mayoría de las funciones hepáticas son realizadas por éstas (3). Dichas células se encuentran polarizadas, con dominios luminales separados por uniones estrechas de los dominios laterales, dedicados a la adhesión célula-célula, y de los dominios basales, que interactúan con la matriz extracelular subyacente. Los hepatocitos se distinguen de otros epitelios no estriados por su organización multipolar. Cada hepatocito

cuenta con un estrecho lumen de canalículos biliares, y tiene múltiples superficies basales que enfrentan el revestimiento endotelial (4).

1.4 CANALÍCULO BILIAR

Los dominios canaliculares de los hepatocitos se desarrollan en el perímetro de las células, en los sitios de contactos laterales célula-célula, a través de las uniones estrechas al igual que los dominios apicales del hepatocito (Figura 2). El canalículo puede ser compartido con más de una célula vecina, y puede rodear todo el perímetro del hepatocito. *In vivo*, el tamaño canalicular es relativamente pequeño en comparación con el alcanzado en los sistemas modelo de cultivo de tejidos hepáticos. Representa el 13% del área total de la superficie de los hepatocitos. Un aspecto notable de la estructura canalicular es su alta tasa de recambio, que ha sido estimada en un 10% por minuto para la hemimembrana exterior, presumiblemente debido al hecho de que la liberación de vesículas de fosfolípidos de la membrana canalicular es la fuente principal de los fosfolípidos liberados en la bilis (4).

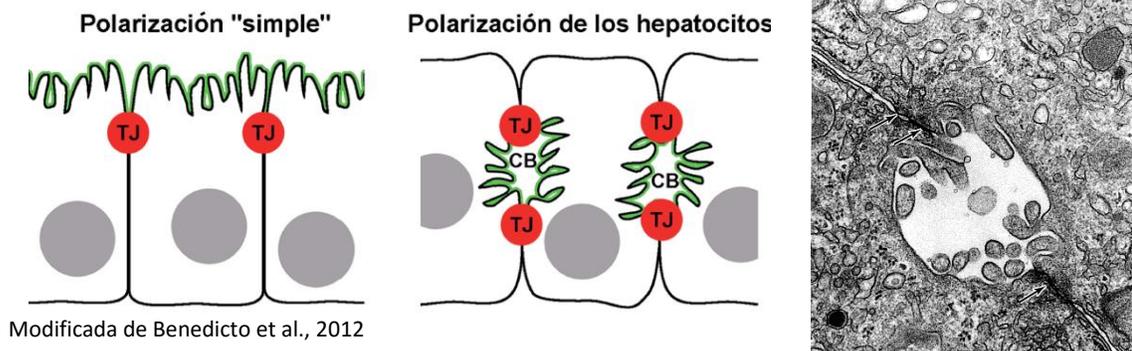


Figura 2. Representación gráfica y por microscopía electrónica de transmisión del canalículo biliar, el cual se encuentra sellado por uniones estrechas. TJ, "tight junctions"; CB, canalículo biliar.

El hepatocito expresa sistemas de transporte diferenciales en sus dominios de membrana plasmática. Estos transportadores desempeñan un papel clave en la transferencia de solutos y agua desde el sinusoides y la sangre, lo que contribuye a la formación de bilis y la excreción biliar de muchos xenobióticos (5).

1.5 TRANSPORTADORES ABC

La bilis es una mezcla compleja que incluye sales biliares, fosfolípidos de membrana (como la fosfatidilcolina), colesterol y varias toxinas endobióticas y xenobióticas. Cada uno es excretado a través de la membrana canalicular del hepatocito por diferentes transportadores ABC ("ATP-binding cassette"). Las sales biliares son esenciales para la emulsificación de la grasa dietaria y vitaminas lipofílicas, necesarias para su digestión y absorción. Se sintetizan a partir del colesterol en el hepatocito por medio de la enzima CYP7A1 y se secretan por la bomba de exportación de sales biliares (BSEP o Abcb11), que impulsa el flujo de bilis y es el punto de partida para la circulación enterohepática (6).

Los principales transportadores con los que cuenta el hepatocito en particular, son los que pertenecen a la familia de proteínas multidrogo-resistentes (MDR/Mdr) y a la familia de proteínas asociadas a las multidrogo-resistentes (MRP/Mrp) (5). Estos transportadores tienen diferentes localizaciones dependiendo de la función que realicen, es decir si son de captación o de excreción (Figura 3).

Por lo tanto, estos transportadores son el principal factor determinante en la capacidad general del tejido hepático para secretar la bilis y para desintoxicarlo de endo y xenobióticos (7).

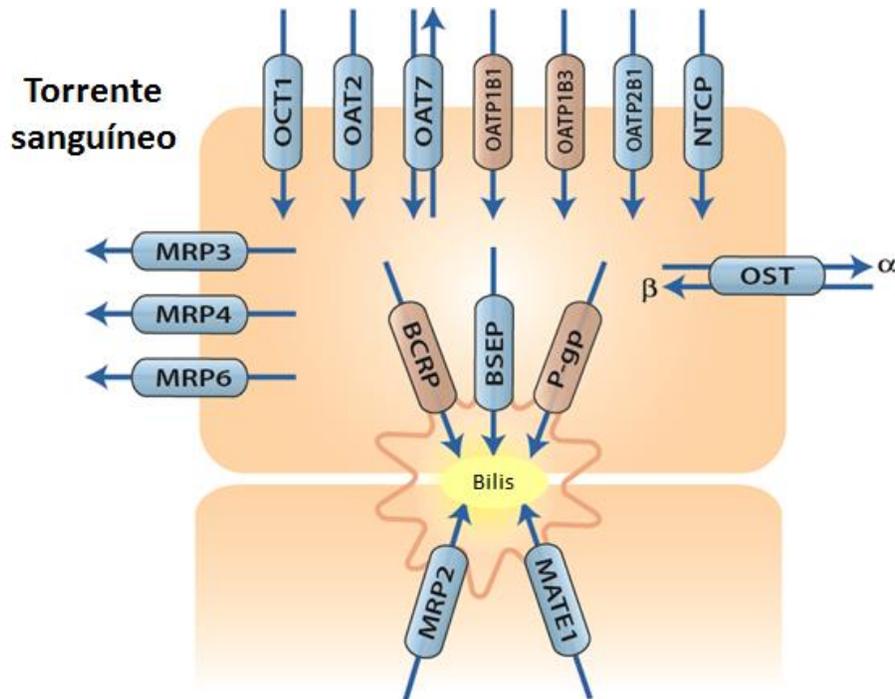


Figura 3. Canalículo biliar y localización de transportadores dependiendo de su función.

1.6 COLANGIOCITOS

El árbol biliar es un complejo de redes tridimensionales de conductos tubulares de varios tamaños y propiedades, el cual está formado por colangiocitos. Los colangiocitos son una población altamente dinámica y heterogénea de células epiteliales. Su función fisiológica es modificar la composición de la bilis que es transportada a lo largo del árbol biliar. Las modificaciones de la bilis ocurren a través

del transporte coordinado de iones, solutos, y agua a través de las caras apical y basolateral del colangiocito (8).

1.7 COLESTASIS

Debido a sus múltiples funciones, el hígado es altamente susceptible a daño pro-oxidante inducido por condiciones patológicas. El estrés oxidante es una característica común en muchas hepatopatías, como el daño por isquemia-reperfusión, hepatectomía parcial o trasplante de hígado, así como por virus, tóxicos, hepatitis, esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica, patologías por acumulación de metales pesados y colestasis (7).

La literatura indica que un desafío oxidante afecta la maquinaria secretora de los hepatocitos al afectar el flujo biliar endógeno y de xenobióticos (7). La colestasis es una enfermedad donde la secreción normal y el flujo de la bilis desde los hepatocitos al árbol biliar y, en última instancia, a los órganos digestivos, se altera, lo que resulta en la acumulación excesiva de los componentes de la bilis en el hígado y suero, causando daño en el tejido hepático. Puede ocurrir por acumulación de toxinas o por mutaciones genéticas en los transportadores donde los hepatocitos pierden su capacidad de transportar y excretar los diferentes componentes de la bilis al espacio canalicular, o, alternativamente, a partir de una obstrucción física el flujo de bilis se presenta fuera del tejido hepático (4). Algunas de las enfermedades asociadas a la mutación de transportadores canaliculares es la colestasis intrahepática familiar obstructiva (PFIC) 1, 2 y 3, por mutación en los transportadores ATP8B1, ABCB11 y ABCB4 respectivamente, por mencionar algunas (6).

Los hepatocitos colestásicos intentan limitar la acumulación intracelular de ácidos biliares induciendo su exportación basolateral (9), a través de transportadores ABC (7).

1.8 α -NAFTIL-ISOTIOCIANATO

Un modelo de colestasis muy utilizado es el que se produce en roedores a los que se les administra α -naftil-isotiocianato (ANIT) en forma *subaguda* (48 h o más de exposición al tóxico) (10). ANIT requiere de pasos metabólicos para ejercer su efecto colestásico. ANIT es detoxificado en el hepatocito por su conjugación con el glutatión (GSH). El complejo ANIT-GSH es transportado por Mrp2 a la bilis, donde ANIT se disocia del GSH. La liberación de ANIT daña progresivamente a las células epiteliales de los conductos biliares debido a su reciclaje a través de ciclos repetidos de conjugación con GSH y subsecuente excreción biliar, causando colangitis con fibrosis periductular y estenosis oclusiva de los conducto biliares intrahepáticos (colangitis esclerosante) (11, 12). ANIT causa también muerte de hepatocitos y colangiocitos por necrosis y apoptosis tanto por acción tóxica directa, como indirectamente a través de la generación de inflamación intensa asociada a la infiltración de neutrófilos alrededor de los hepatocitos y los conductos biliares, el estado inflamatorio lleva a la producción de especies reactivas del oxígeno, que puede también provocar la muerte de hepatocitos y colangiocitos, con la correspondiente formación de debris celular obstructiva (13), a lo cual se adiciona la muerte celular por el efecto necrótico y proapoptótico de los ácidos biliares retenidos por el proceso obstructivo (14). Finalmente, ANIT causa, a partir de las 7 horas de

administrado *in vivo*, un aumento de la permeabilidad paracelular, con regurgitación de los componentes biliares en el sistema vascular a través de las uniones estrechas intercelulares, lo cual contribuye a la disipación del gradiente osmótico canalicular que impulsa la formación de la bilis (15).

Además de estos mecanismos subagudos de colestasis, el ANIT puede también provocar colestasis *aguda*, a través de efectos tóxicos directos sobre los hepatocitos. Cuando se administra a hígados aislados y perfundidos, provoca un descenso del flujo biliar a partir de los 35 min de la infusión, debido a alteraciones hepatocanaliculares que afectan la excreción de ácidos biliares, sin alteraciones aparentes de su captación ni de su retención canalicular (permeabilidad paracelular normal), ni evidencia alguna de obstrucción biliar (16).

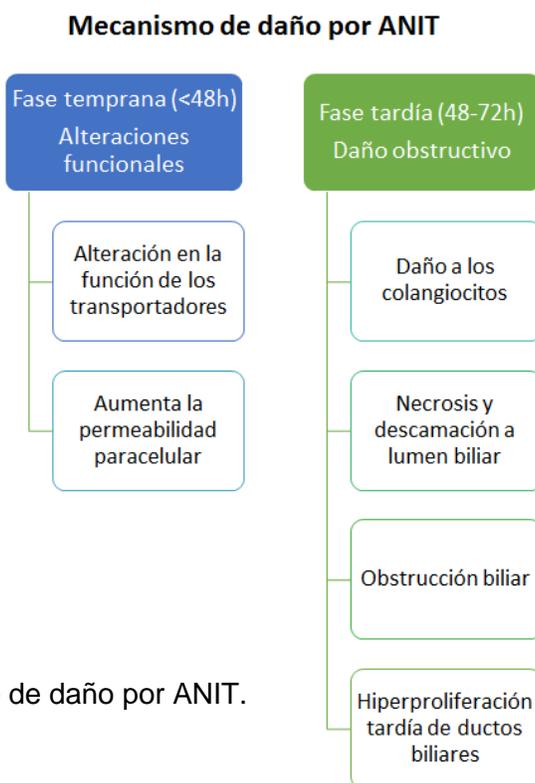
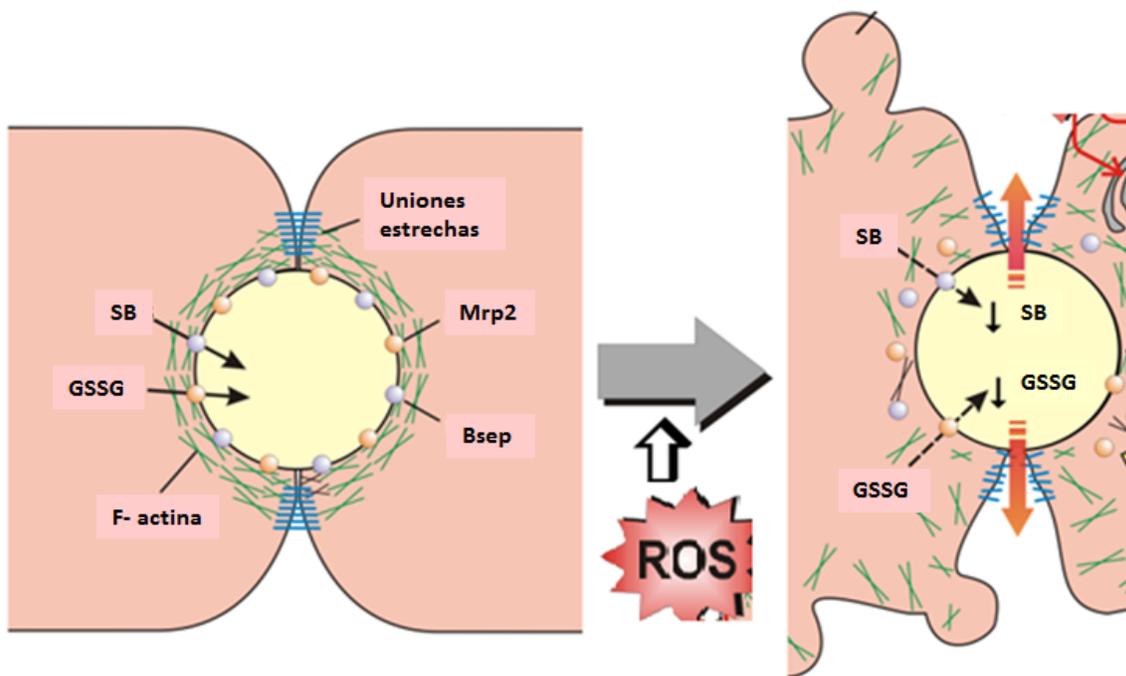


Figura 4. Mecanismo de daño por ANIT.

1.9 ESTRÉS OXIDANTE EN COLESTASIS

Hay evidencia de que el estrés oxidante inducido de forma aguda es colestásico, mediante la descripción de los mecanismos subyacentes a la insuficiencia de excreción de los hepatocitos, incluyendo la desorganización del citoesqueleto de actina y sus consecuencias más notables, es decir, el deterioro de las uniones estrechas y la internalización endocítica de transportadores canaliculares, relevantes para la formación de la bilis (5, 7) (Figura 5).

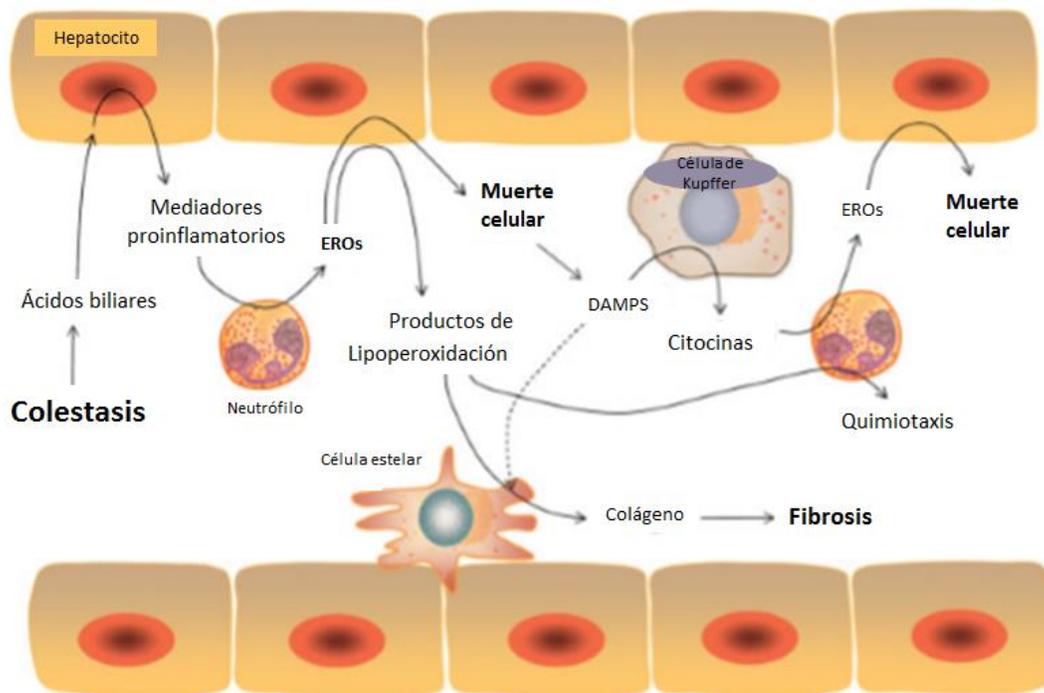


Modificada de Roma et al., 2008

Figura 5. Internalización de transportadores debido a la presencia de estrés oxidante.

SB, Sales biliares; GSSG, Glutatión

También, el daño tisular inicial generado por el estrés oxidante estimula el reclutamiento de células inflamatorias que producen más especies reactivas de oxígeno, que a su vez provocan oxidación de proteínas, lipoperoxidación, activación de células estelares (lo que eventualmente podría ocasionar fibrosis) y muerte celular (17) (Figura 6). Estudios han demostrado la presencia de estrés oxidante en los hígados de humanos con colestasis. Se ha demostrado *in vitro* que los ácidos biliares producen la muerte de los hepatocitos por mecanismos que dependen de las especies reactivas de oxígeno (18).



Modificada de Copple Bryan L. et al., 2010.

Figura 6. Daño hepático producido por colestasis.

EROs, Especies reactivas de oxígeno; DAMPs, Moléculas patrón asociadas a daño molecular

1.10 FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF)

El daño al hígado desencadena un proceso de reparación inmediato, el cual es mediado por algunas citocinas observadas en colestasis, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) β -1, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α (19) y factores de crecimiento, dentro de los cuales se destaca el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Este factor es producido por las células estelares y endoteliales (20, 21), y ejerce sus funciones a través de su receptor anclado a la membrana, llamado c-Met, siendo un receptor con actividad de tirosina-quinasa (2, 21). Como se muestra en la Figura 7, la unión del ligando al receptor lleva a la autofosforilación de las tirosinas 1230, 1234 y 1235, localizadas dentro del bucle de activación del dominio catalítico con actividad de quinasa de tirosina. Adicionalmente, la fosforilación de los residuos 1313, 1349 y 1356 le generan un sitio de anclaje (“docking site”) para el reclutamiento de proteínas adaptadoras o ejecutoras de la transducción de señales. Particularmente, la fosforilación en la tirosina 1313 genera un sitio de unión preferido por la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), mientras que en el sitio de unión multisustrato de las tirosinas 1349, y 1356, se activan proteínas como Shc, Src, Gab1, Grb2, SHP2, fosfolipasa C- γ (PLC- γ), entre otras (22), involucradas en la iniciación de la señalización intracelular (20, 23).

La respuesta antioxidante del HGF, y sus otras funciones canónicas como la proliferación, anti-apoptosis y la mitogénesis, se desencadenan por la interacción de HGF a su receptor c-Met. Más pruebas han demostrado que la abrogación de la

señalización de c-Met, por interferencia génica del receptor conduce a la progresión o agravamiento de manifestaciones patológicas asociadas al estrés oxidante, en particular la fibrosis, la apoptosis mediada por receptores de muerte y la hepatocarcinogénesis inducida por productos químicos; en todos los casos, ratones inactivados génicamente (KO) para c-Met exhibieron estrés oxidante, incluso en ausencia de cualquier otro estímulo (24).

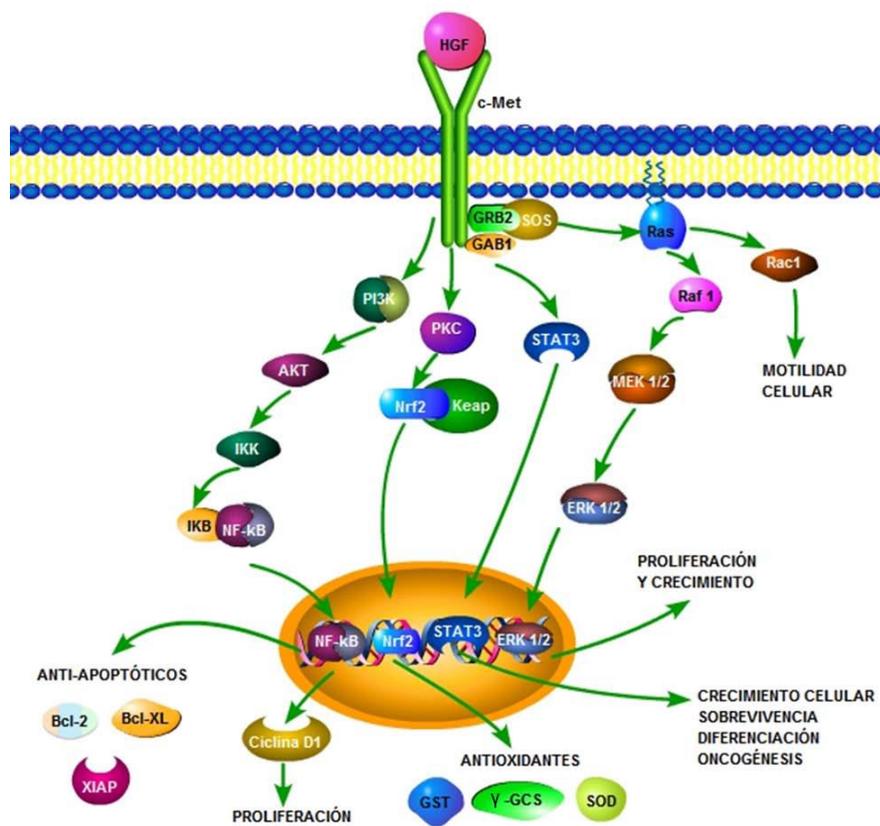
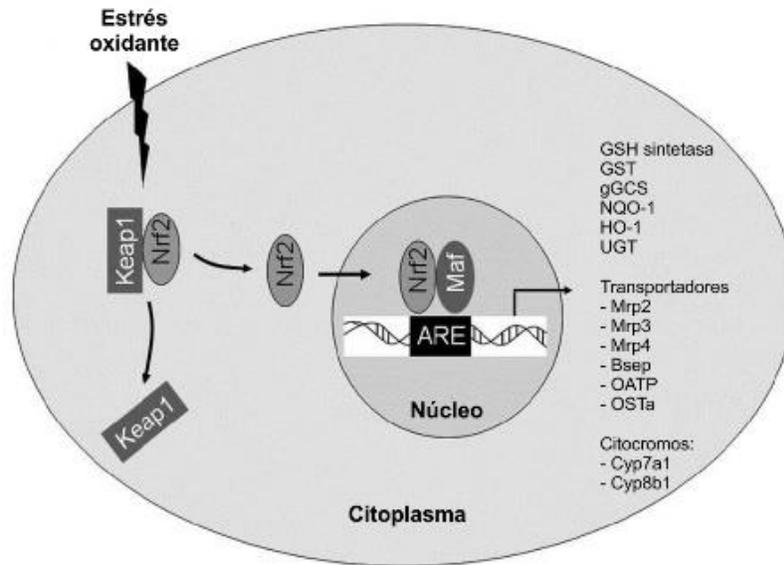


Figura 7. Vía de señalización del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)
(Tomado de Palestino-Domínguez et al., 2012)

1.11 NRF2

La vía de HGF/c-Met puede controlar el estrés oxidante regulando el estado redox basal de la célula. Esto se demostró en ratones KO para c-Met, donde la pérdida de este receptor en el hígado causó una desregulación de genes involucrados en la respuesta antioxidante. Entre ellos, se encuentra el factor de transcripción Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2), que regula en el hígado la expresión de una amplia gama de genes antioxidantes y citoprotectores, como los que codifican a la NADPH deshidrogenasa, quinona 1 (NQO1), la gama-glutamil cistein sintetasa (γ -GCS), la glutatión S-transferasa (GST), la hemo-oxigenasa 1 (HO1), y la uridinadifosfato glucuroniltransferasa (UGT), transportadores como Mrp2, Mrp3, Mrp4, Bsep, OATP, OST α , y otras enzimas como Cyp7a1 y Cyp8b1 (25, 26).

En condiciones normales, Nrf2 reside en el citoplasma, formando un complejo inactivo con su inhibidor Keap1, una proteína adaptadora para la ligasa Cullin3 que media la degradación proteosomal de Nrf2. Después de un estímulo mediado por especies reactivas de oxígeno, residuos de cisteína específicas en Keap1 se oxidan, liberando a Nrf2 que migra al núcleo para iniciar la transcripción de enzimas antioxidantes de fase II, involucradas en síntesis de glutatión y de fase III, involucradas en la detoxificación, como los transportadores ABC (26).



Modificada de Lee et al., 2012

Figura 8. Genes blanco del factor de transcripción Nrf2

En resumen, la colestasis, resulta de la falla en el flujo biliar, la cual se origina por distintas causas, ya sea por defectos en las proteínas transportadoras ubicadas en la membrana del canalículo biliar o por impedimento mecánico al flujo de bilis. Esto origina daño al hígado, el cual inducirá la liberación de HGF, el cual activa Nrf2, y éste, sus genes blancos para generar la respuesta antioxidante a través de la inducción de enzimas antioxidantes, y enzimas de detoxificación de fase I (citocromos), de fase II (conjugación) y de fase III (transportadores de exportación), para así contrarrestar el daño oxidante.

2 ANTECEDENTES

Nrf2 induce la expresión de GST y a transportadores hepatocelulares como Mrp2, Mrp3, Mrp4, y BCRP (7). La expresión de Mrp2 inducida por Nrf2 incrementa la excreción de sales biliares y componentes conjugados con glutatión, como hidroperóxidos de ADN y lípidos. Además, Nrf2 constituye un sistema de defensa contra el estrés oxidante generado en el hígado por modelos experimentales tanto de colestasis extrahepática como intrahepática. Nrf2 es necesario para la regulación al alza de las bombas basolaterales de eflujo de sales biliares que contrarrestan los efectos deletéreos de la acumulación hepatocelular de sales biliares en la colestasis, como parte de la respuesta adaptativa contra esta condición (7).

Nuestro grupo demostró que HGF/c-Met desencadenan vías de señalización que llevan a la activación de Nrf2, incluyendo la fosforilación de este factor de transcripción Nrf2 mediada por PKC y la oxidación de cisteínas en Keap1 (represor de Nrf2) debido a la generación de ERO generadas principalmente por la NADPH oxidasa. La respuesta mediada por Nrf2 aumenta la expresión de enzimas implicadas en la transformación, la desintoxicación y el transporte de xenobióticos; así como proteínas relacionadas con la defensa antioxidantes, incluyendo genes como: NQO1, GSH y γ -GCS (26).

HGF/cMet induce vías de señalización importantes para la reparación tisular en colestasis. Giebeler y colaboradores demostraron que ratones KO para cMet fueron más susceptibles al daño hepatocelular y a la fibrosis inducida por una ligadura completa de conducto biliar común (27).

El grupo del Dr. Yeh TH demostró que la pérdida específica de β -catenina (proteína de las uniones estrechas) en el hígado conduce a una morfología defectuosa del canalículo biliar, defectos en la secreción biliar y colestasis intrahepática. Sus resultados establecen el papel crítico de β -catenina en la fisiología biliar (28).

3 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas son una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Varias de ellas cursan con colestasis, condición que puede surgir de diversas causas, tanto congénitas como adquiridas, repercutiendo en la funcionalidad del hígado y agravando el daño generado por agentes tóxicos potenciales detoxificados por el hígado.

Recientemente, se han llevado a cabo estudios con factores de crecimiento con la finalidad de reparar o prevenir el daño causado por la colestasis. Tal es el caso del HGF, que se prevé pueda actuar como agente protector ante el daño colestásico, ya que se ha reportado que disminuye la acumulación tóxica de ácidos biliares que agrava y perpetúa el daño colestásico inicial (29). Por esto, es importante conocer los mecanismos moleculares que están involucrados en la protección del daño inducidos por el HGF, a través de la activación de factores de transcripción que censan el estado redox celular como Nrf2.

4 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Ejerce HGF/c-Met un efecto anti-colestásico ante el daño inducido por ANIT?

5 HIPÓTESIS

El HGF activará al factor Nrf2 que inducirá a una respuesta anti-colestásica mediada por la expresión de sus genes blanco, particularmente antioxidantes y de fase III de detoxificación.

6 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta anticolestásica ejercida por el HGF, y mediada por Nrf2, en un modelo murino de colestasis.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar fisiológica e histológicamente el efecto anticolestásico ejercido por la señalización del HGF/c-Met
- Evaluar la activación del factor de transcripción Nrf2 con una temporalidad que permita sustentar un mecanismo de protección anticolestásico, acorde a la progresión del daño por ANIT.
- Determinar la expresión de los genes blanco de Nrf2 con relevancia en colestasis y con funciones antioxidantes y de fase III.

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron ratones de la cepa CD1, de entre 8 y 12 semanas de edad. Los animales se dividieron al azar en 4 grupos experimentales: 1) animales no tratados o control (NT), 2) animales tratados con ANIT por vía intragástrica (60 mg/kg) (11), 3) animales tratados con ANIT+HGF (10 µg/kg, por vía intravenosa pasadas 24 h de la administración de ANIT) y 4) un grupo control tratado solo con HGF.

48 h después de la administración del ANIT, se realizó la eutanasia de los animales de los cuales se obtuvo suero para pruebas de funcionalidad hepática y tejido para histologías, Western blot, qRT PCR y EMSA como se muestra en la figura 9.

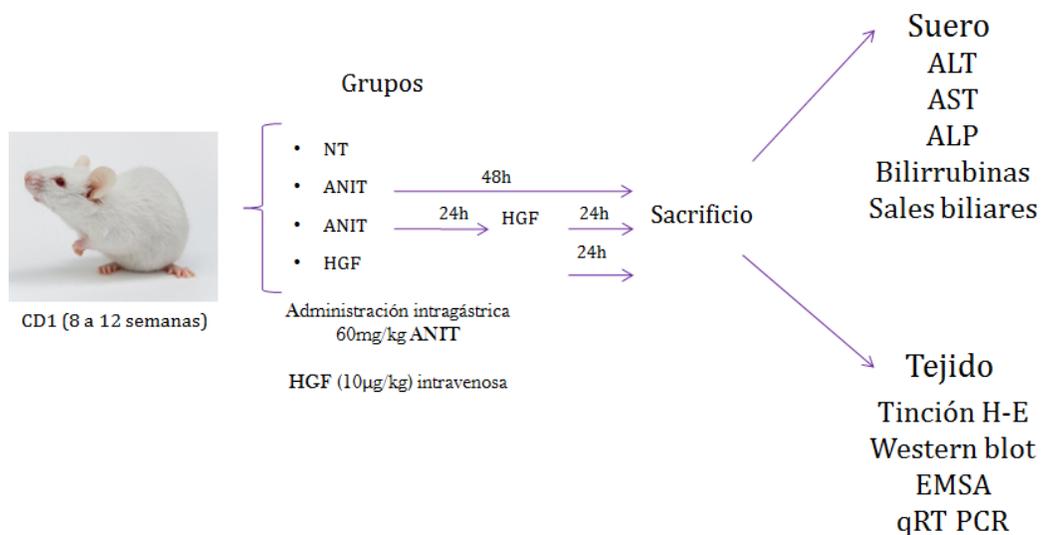


Figura 9. Diseño experimental

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Pruebas de funcionalidad hepática

Los ratones fueron sometidos a narcosis utilizando avertina (2,2,2-tribromoetanol, Sigma, EUA), ip. Al momento del sacrificio, realizada por dislocación cervical, se colectó la sangre de la vena cava superior, y se centrifugó a 1600 X g durante 10 min a 4° C, para obtener el suero. Se emplearon tiras reactivas comerciales (Roche, Alemania) para determinar marcadores de daño hepático como aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), bilirrubinas y sales biliares, utilizando el equipo Reflotron (Roche Diagnostics, Francia).

7.2.2 Análisis histológico

La histología se realizó por tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E). Para ello, los portaobjetos conteniendo los cortes de hígado incluidos en parafina se introdujeron 10 min a la estufa a 60° C. Las secciones de tejido hepático fueron desparafinadas durante 10 min en xilol, y gradualmente se hidrataron en alcoholes del 100% al 70% durante 5 min, seguido de agua durante otros 5 min. Después, se colocaron en hematoxilina de Harris durante 5 min. Consecutivamente, se hizo un lavado de estos en agua durante 5 min, se sumergieron en HCl-EtOH al 96% hasta la aparición de un color rojizo, después se sumergieron en agua amoniacal (200 ml de agua destilada con 3-4 gotas de amoníaco) hasta que apareció un color azul. Luego, se volvió a lavar con agua corriente durante 2 min y con agua destilada otros 2 min y, enseguida,

se colocaron los portaobjetos en eosina alcohólica durante 2 min. Posteriormente, se deshidrataron durante 1 min en solución de etanol de diferente concentración pasando del etanol de 70% al absoluto, hasta llegar al xilol. Al finalizar, se montaron con Dako Cytomation.

7.2.3 Inmunodetección de proteínas en fase sólida (Western Blot)

Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido hepático (de cada grupo), y se homogenizaron en 1ml de Phosphate Buffered Saline) PBS. Posteriormente, se centrifugaron a 8 900 X g durante 1 min, a 4° C. El sobrenadante se eliminó, y la pastilla celular se resuspendió en 300µl de amortiguador de lisis T-PER (Pierce Chemical, EUA) con mezcla de inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Roche, Francia). Se incubó en hielo durante 15 min, y después se centrifugó a 17 000 X g durante 10 min a 4° C. El sobrenadante se recuperó, y se guardó a -20° C en alícuotas, hasta realizar el análisis.

La proteína se cuantificó colorimétricamente utilizando el estuche comercial BCA (Pierce Chemical, E.U.A.), el cual está basado en la reacción de Biuret o del ácido bicínico con el fin de conocer qué cantidad de proteína se deposita en los pozos del gel. La curva patrón, se realizó con albúmina sérica de bovino. Una vez que la proteína se depositó en cada pozo, se realizó la separación electroforética de la proteína en geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1%, usando un voltaje de 120 V durante 90 min. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF durante 90 min a 120 V, en un sistema transblot (Biorad, EUA). La membrana se bloqueó con leche descremada al

5% en TBS (Tris-Buffered Saline)-Tween (TBST) durante 1 h, en agitación constante. Para la detección de cada proteína de interés, la membrana se incubó con anticuerpos específicos (GPx y catalasa) durante toda la noche, en agitación constante a 4° C. Transcurrido ese tiempo, se lavaron 2 veces en TBST por 10 min, y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en una solución de albúmina en TBST por 90 min. Después, se lavaron 2 veces por 10 min en TBST, y una vez con TBS por 5 min. Se detectaron con 1 ml de sustrato luminiscente (SuperSignal West Pico Substrate, Pierce, EUA). Las bandas se cuantificaron por densitometría, usando el fotodocumentador Gel logic 1500 (Kodak, EUA) (Towbin et al., 1992).

7.2.4 Reacción en cadena de polimerasas (qRT PCR)

El ARN total se extrajo del tejido, usando el reactivo de Trizol (Invitrogen). El ARN aislado fue tratado con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase) para evitar la contaminación con ADN genómico. La amplificación de RT-PCR de un solo paso se llevó a cabo con el PCR cycler Rotor-Gene Q system (Qiagen, Australia). El RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) en tiempo real se llevó a cabo usando el Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, E.U.A.), con 300 nM de oligonucleótidos sentido y antisentido y 250 ng/μl de ARN para un volumen final de 10 μl por reacción. Las condiciones del qRT-PCR fueron las siguientes: 10 min a 55° C y 5 min a 95° C, seguido por 40 ciclos de PCR por 5 seg a 95° C para la desnaturalización, 10 seg a 60° C para la alineación y extensión.

Los resultados fueron expresados en relación con la expresión de la proteína ribosomal 15 (rps15), usado como gen de referencia. La cuantificación relativa se realizó usando el software REST-08 (Relative Expression Software Tool 2008). Después de 40 ciclos de amplificación, se analizó la curva para verificar el producto correcto por su temperatura específica (Tm).

Gen	Primer	Temp/Ciclos	Tamaño
abcb11/Bsep	GGCTTGCTACAGATGCTTCC GCCAAAAAGGGGAAGAAGAC	64°/35	157 bp
abcc2/Mrp2	CTGAGTGCTTGGACCAGTGA CCCACAGTCACCATCCTCTT	66°/35	379 bp
abcc3/Mrp3	CCCTGCTCCTGTCTTCTTTG GCTGAGAGGATCTTGAACG	59°/35	177 bp
Slc10a1/ntcp	TTACTGGCTACCTCCTCCCT GGGGAAGGTGACATTGAGGA	56°/35	162 bp
cyp7a1	GGCATTGGACACAGAAGCA ATACATCCCTTCGGTGACCC	60°/35	196 bp
rps15	TTGAGAAAGGCCAAAAAGGA GTGCTTCACGGGTTTGTAGG	58°/35	207 bp

Tabla 1. Secuencia de cebadores y condiciones de amplificación.

7.2.5 Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo se realizó con el estuche comercial Light Shift Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific #20148, E.U.A.) siguiendo las especificaciones del fabricante.

El tejido se homogenizó, y se le agregó buffer de lisis. A continuación, se centrifugó a 1470 X g por 5 min a 4° C, se obtuvo el botón nuclear y se resuspendió en buffer de extracción y de nuevo se centrifugó a 15 500 X g por 10 min a 4° C.

Se preparó un gel de poliacrilamida de 4-6% en TBE al 0.5X, y se pre-corrió de 30 a 60 min a 100 V. Para las reacciones, se descongelaron los reactivos en hielo y se prepararon de acuerdo a la tabla que contiene el kit (estos reactivos son específicos

para las proteínas de interés, en este caso Nrf2), dejándose a temperatura ambiente por 20 min. Después, se agregaron 5 µl de amortiguador 5X por cada 20 µl de reacción, homogenizando a la mezcla con una pipeta. A continuación, se cargaron los pozos del gel con 20 µl de la muestra preparada, y se dejaron correr a 100 V hasta $\frac{3}{4}$ del gel. Mientras las muestras corrían en el gel, la membrana de nylon se remojó en TBE 0.5 X durante 10 min. Una vez que el gel corrió y se tuvo lista la membrana, se llevó a cabo la transferencia de la misma manera que un Western blot. Una vez que se tuvo la transferencia en la membrana, se realizaron lavados a la membrana. Para detectar las proteínas que se marcaron, se utilizaron reactivos especiales del kit.

7.2.6 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos por triplicado, usando tejido de al menos 3 animales de experimentación de forma independiente. Los datos fueron reportados con el promedio \pm error estándar (EE). Para la comparación de medias de diferentes grupos, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por la prueba de Tukey. Se empleó el programa Grand Pad Prism. El nivel de significancia fue de $p \leq 0.05$.

8 RESULTADOS

En los animales administrados con ANIT, se observó hepatomegalia, cambio de coloración y rigidez en el hígado, hipertrofia vesicular y de color verde oscuro, así como ictericia y una ligera enteritis. Por su parte, los animales ANIT+HGF y los NT muestran similitudes en morfología (Figura 10).

Los niveles séricos de los marcadores bioquímicos de funcionalidad hepática se incrementaron significativamente en los animales administrados con ANIT. Sin embargo, los niveles de estas pruebas se restablecieron a niveles similares a los normales, es decir como los animales NT, en los ratones que recibieron HGF (Figura 11). Se observó, también una disminución considerable en los niveles de sales biliares en suero en los ratones ANIT+HGF en comparación con los ratones ANIT. Del mismo modo, el tratamiento con HGF llevó a valores normales los niveles en bilirrubina total y directa, en comparación con el grupo ANIT.

Las tinciones de H-E mostraron que el tejido de los ratones ANIT+HGF presentó un menor número de zonas necróticas, así como de menor tamaño. Por otro lado disminuyó considerablemente el infiltrado inflamatorio que rodeaba estas zonas en los ratones que solo recibieron el ANIT (Figura12).

Como se puede observar, en la Figura 13, el tratamiento con HGF muestra una tendencia a inducir la expresión de algunos transportadores de exportación, específicamente los relacionados a la exportación al torrente sanguíneo para su posterior excreción alternativa renal, tal como es el caso de Mrp3 (Figura 13C).

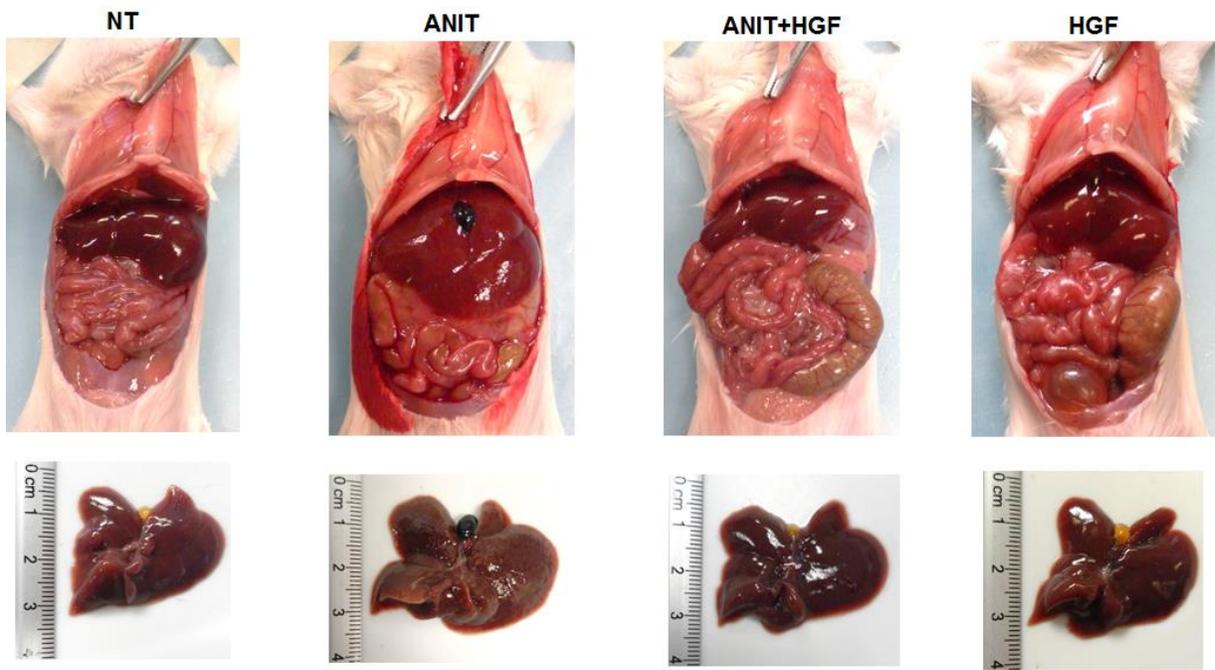


Figura 10. Cambios macroscópicos en el hígado por daño inducido por ANIT.

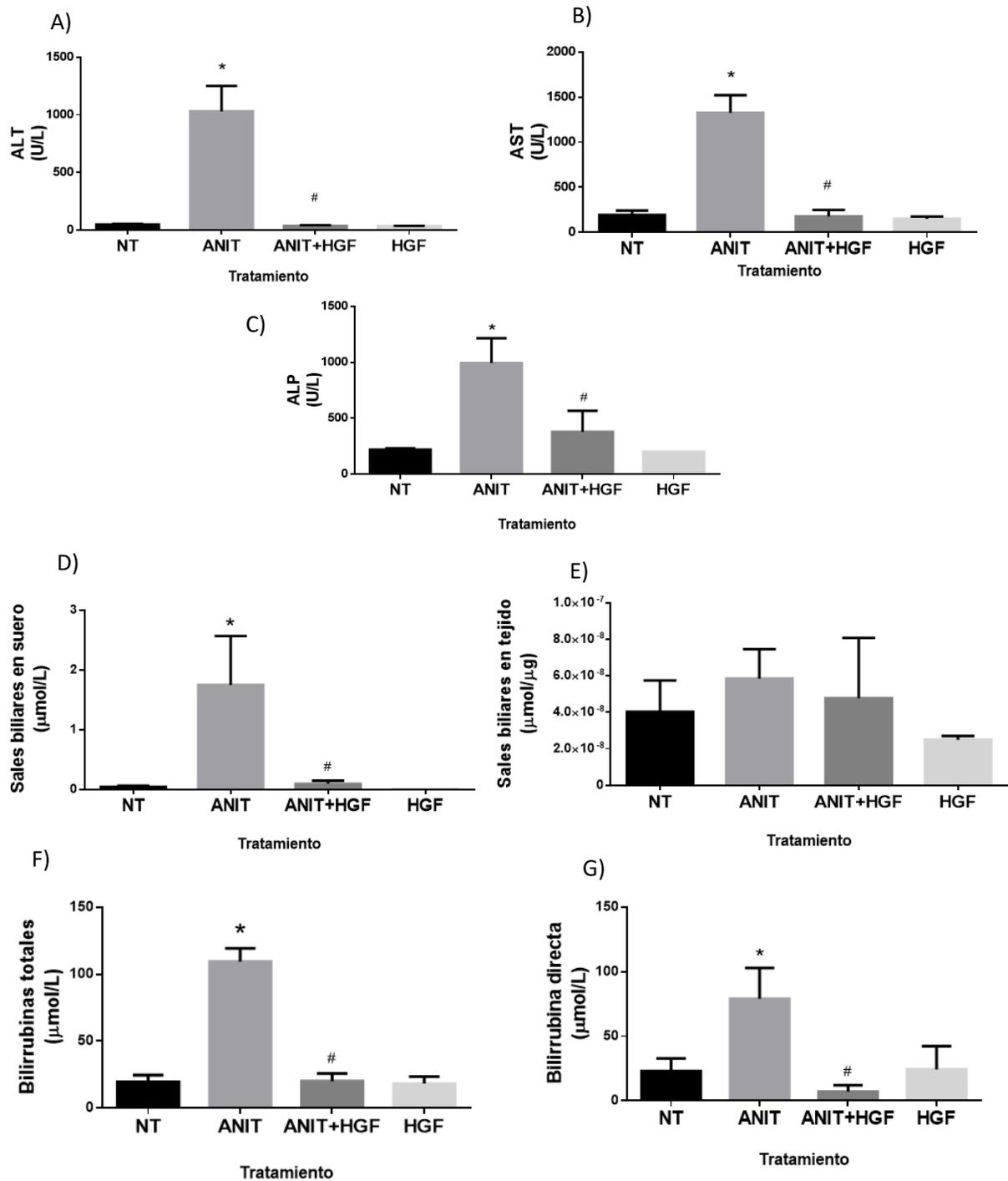


Figura 11. Pruebas bioquímicas. A) ALT, B) AST, C) ALP, D) y E) contenido de sales biliares en suero y tejido y F) y G) contenido de bilirrubinas totales y directas, * $p < 0.05$ vs. NT, # $p < 0.05$ vs. ANIT y + $p < 0.05$ vs. HGF.

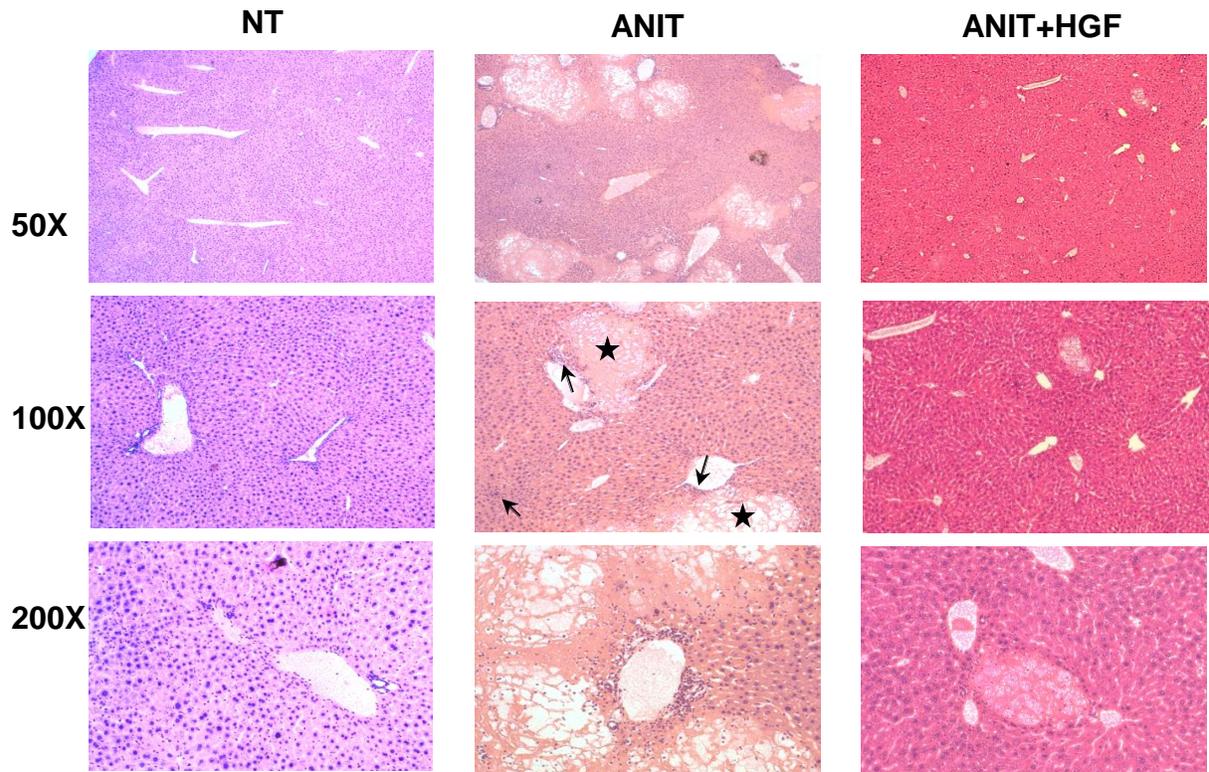


Figura 12. Histologías por tinción con H-E. El tratamiento con HGF disminuye las zonas necróticas causadas por ANIT. Tinciones de H-E del tejido de los ratones tratados con ANIT y HGF. Las estrellas negras indican zonas con necrosis, las flechas muestran infiltrado inflamatorio.

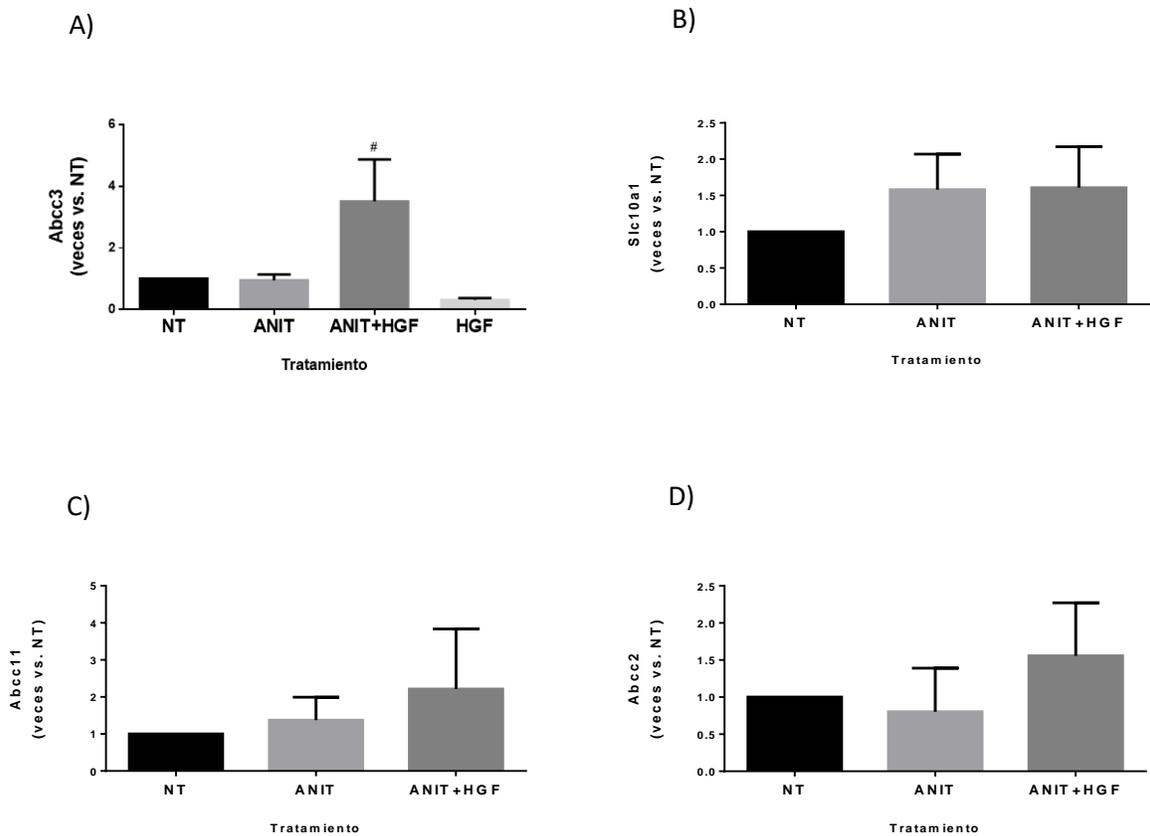


Figura 13. Expresión de transportadores ABC. A) Abcc3 (Mrp3) transportador basolateral de eflujo, B) Slc10a1 (NTCP) Transportador de captación de sales biliares, C) Abcc11 (Bsep) y D) Abcc2 (Mrp2) transportadores canaliculares, por PCR en punto final y tiempo real, * $p < 0.05$ vs. NT, # $p < 0.05$ vs. ANIT.

En la figura 14A, se puede observar la activación de Nrf2 en hígado de ratones que fueron tratados con HGF a distintos tiempos (0.25, 0.50, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h). Nrf2 se activa desde los 15 min de tratamiento con HGF, teniendo su pico máximo de activación a la hora, para después disminuir y volver a aumentar su activación a las 24 h. Una vez que se tuvieron los tiempos de activación de Nrf2, se prosiguió a evaluar la expresión de algunos blancos de Nrf2, tal como el transportador ABC Mrp3, el cual parece tener aumento en su expresión a partir de las 3 horas (Figura 14B), manteniéndose hasta las 24 horas de exposición a HGF.

También, se estimó el contenido de enzimas antioxidantes inducidas por Nrf2 después del tratamiento con HGF, tal es el caso de GPX1/2 y catalasa, y se observó que el pico máximo de contenido de estas proteínas se encontraba a las 3h después del tratamiento con HGF (Figura 14C).

Para evaluar a qué tiempo se establecía el daño colestásico en los ratones, se administró el ANIT a los animales, y se sacrificaron a diferentes tiempos (12, 24, 36 y 48 h). Después del sacrificio, se observó que, a las 36 h (Figura 15A), el daño se había establecido, debido a que los animales presentaban ictericia, el hígado tenía cierta rigidez, la presencia de lesiones comenzaba a aparecer, aumentaba en el tamaño y coloración vesicular, y los niveles de ALP comenzaron a elevarse (Figura 15B).

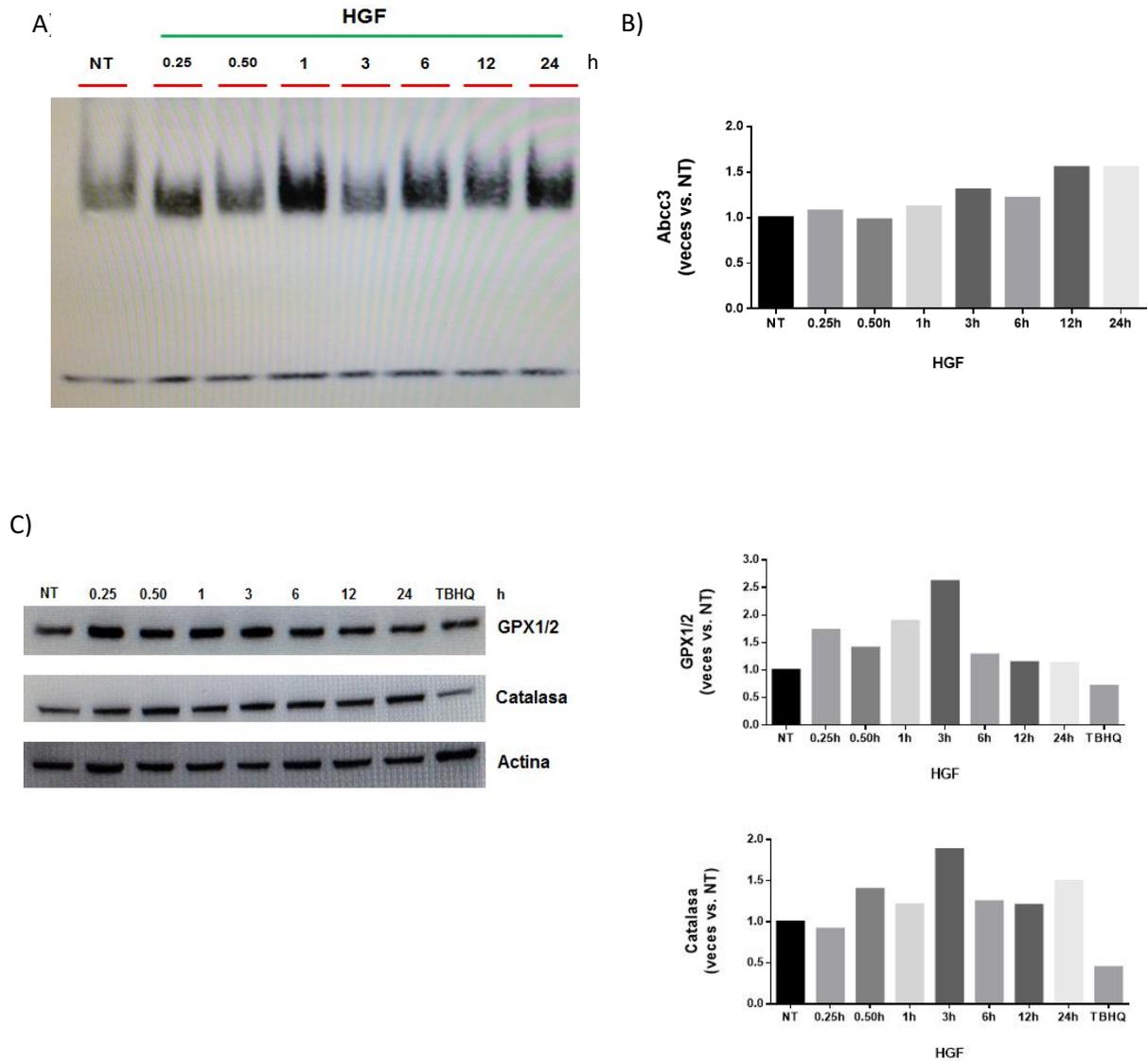
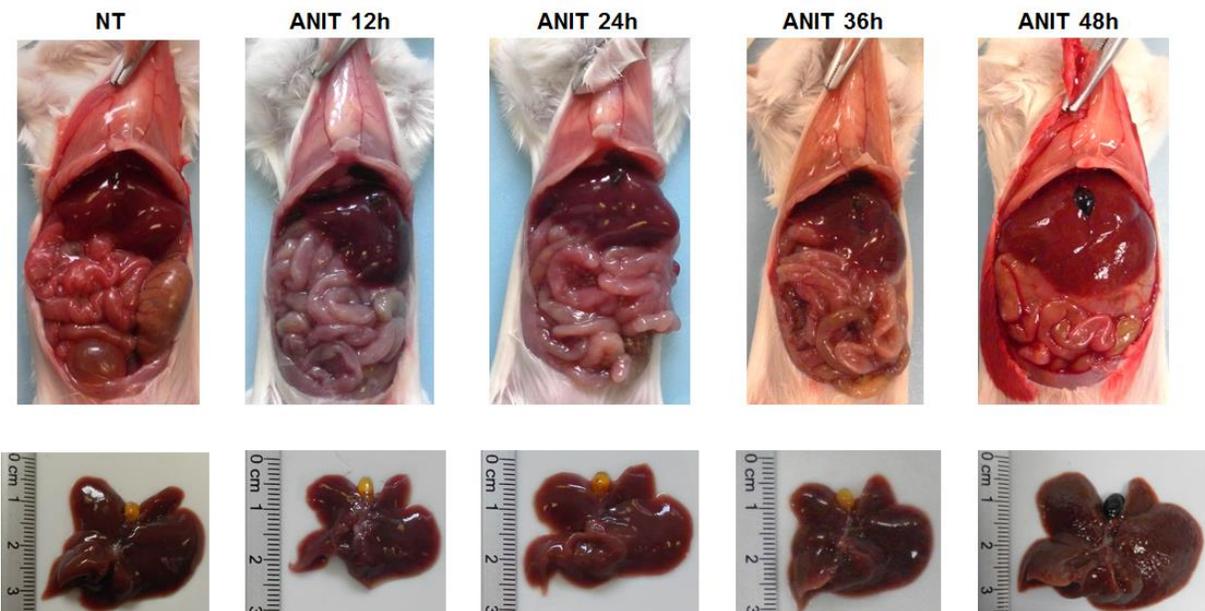


Figura 14. Activación de Nrf2, inducida por HGF a diferentes tiempos de exposición. A) EMSA para Nrf2, B) PCR en tiempo real de Abcc3 y C) Western blot de enzimas antioxidantes inducidas por Nrf2 y su respectiva densitometría. Terbutil hidroperóxido (TBHQ)

A)



B)

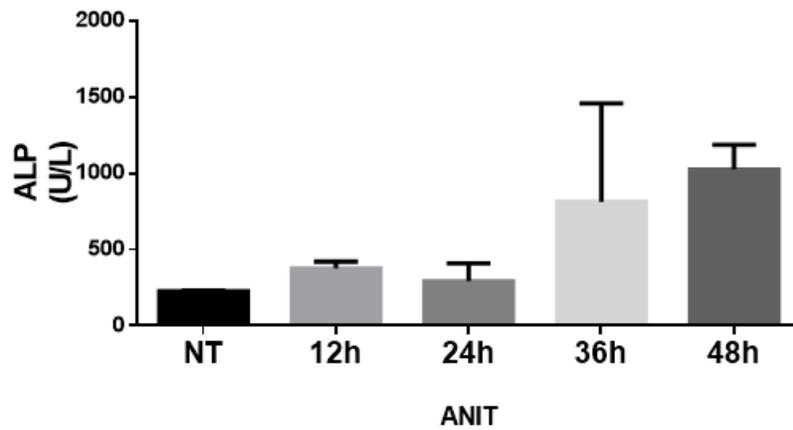


Figura 15. Establecimiento del daño colestásico por ANIT a diferentes tiempos de exposición. A) Cambios macroscópicos del hígado y B) Niveles de ALP en suero.

9 DISCUSIÓN

Se ha mostrado que el HGF ejerce efectos protectores en diversas hepatopatías, como fibrosis (30), carcinogénesis (31), daño por fármacos (32), entre otras. En el presente trabajo, nos enfocamos a dilucidar, si el HGF ejerce efectos protectores en un modelo de colestasis.

La presentación a nivel hepático y sistémico de los efectos tóxicos del ANIT que observamos en nuestro estudio están en concordancia con lo antes reportado (11, 13).

Los animales tratados con ANIT a nivel macroscópico presentaron ictericia, colecistitis, rigidez del hígado y cambio de coloración, hepatomegalia y una ligera enteritis, claros signos de colestasis (2). Con respecto a las pruebas de funcionalidad hepática como ALT y AST, pudimos observar una elevación en los niveles de estas en los ratones que recibieron ANIT, lo que sugiere alteración en la integridad de la membrana plasmática y muerte celular por necrosis (1, 33), lo que lleva a la liberación de estas enzimas al torrente sanguíneo. De la misma manera, ALP, que es una enzima de membrana plasmática altamente inducible por sales biliares y removible por sus efectos detergente (1, 3), cuyos niveles séricos se encontraron elevados en los animales dañados, pero esta elevación se restableció una vez que se administró HGF, como claramente se observa en las figura 11 A), B) y C). Estos resultados evidencian los efectos colestásicos del ANIT, capaces de ocasionar, en algún momento desde que se establece el daño, la acumulación intrahepática de

sales biliares por falla secretora de los mismos, así como la capacidad de HGF de prevenir dicho efecto. Dado que la ALP es sintetizada tanto por los hepatocitos como por los colangiocitos, la elevación sérica de ésta no nos da información precisa acerca de la localización del daño inducido por ANIT; por lo que resultaría interesante evaluar los niveles de la γ -glutamyl transpeptidasa (γ GT), enzima específica de colangiocitos (1, 3), y así corroborar que el daño por ANIT, se está estableciendo tanto a nivel del parenquima como de los conductos biliares, como ya se ha reportado en la rata (33, 34). Otros marcadores bioquímicos de colestasis que se evaluaron fueron los niveles de sales biliares contenidas en tejido y en suero a las 48 h de administrado el ANIT. Lo que se observó fue que, en el tejido, parece no haber cambio en los niveles de sales biliares contenidas en este; los ratones que fueron dañados presentaron un ligero aumento de éstas que no llegó a ser significativo, lo cual podría ser explicado por algún mecanismo de adaptación del órgano para eliminar el exceso de sales biliares y no almacenarlas en tejido hepático a través de su exportación hacia la sangre (35), como lo indica los valores elevados de sales biliares en suero. Ni una disminución de su captación (vía Ntcp), ni un eflujo aumentado eflujo hacia la sangre vía Mrp3 parece ser la causa, ya que sus expresiones no se vieron modificadas solo por ANIT (ver Figuras 13 A y B). Alternativas posibles incluyen otros transportadores basolaterales capaces de mediar el eflujo activo a sangre, tales como OST α /Osat β , Mrp4 o Mrp6 (35). Medir la expresión de ellos daría información más concreta de su importancia relativa en la exportación al torrente sanguíneo de componentes retenidos por la falla secretora (36).

Al recibir HGF, los niveles de sales biliares en suero se redujeron hasta niveles iguales a los controles; sugiriendo, en cambio, activación temprana de mecanismos adicionales que exacerben la aumentada exportación de sales biliares, ya sea canalicular o basolateral (36), explicando así el menor daño necrótico en los animales tratados con HGF y la disminución en los niveles de ALP en plasma. En concordancia con esto, se observó que los niveles de bilirrubinas (totales y directa) presentaron incremento en los animales que solo recibieron el ANIT, en concordancia con trabajos previos (11, 13) y, de la misma forma que las pruebas anteriores, HGF restableció los niveles de éstas, lo que confirmaría que los sistemas de exportación basolateral antes mencionados, la mayoría de los cuales tienen afinidad tanto para sales biliares como para bilirrubina (35), podrían estar activados. Nuestros resultados demuestran un marcado aumento de expresión de Mrp3 en los animales tratados con ANIT+HGF, lo cual sustenta a Mrp3 como un probable sistema de eflujo basolateral que podría haber sido activado tempranamente por HGF vía Nrf2, impidiendo, al favorecer la excreción renal de sales biliares y bilirrubina, la acumulación de esos compuestos en suero en el grupo ANIT+HGF. En efecto, en roedores, Mrp3 es un activo transportador de una gran variedad de sustratos, incluyendo sales biliares como de bilirrubina conjugada (37). Incluso, Mrp3 ha sido también propuesto como un posible mecanismo de detoxificación de bilirrubina no conjugada, por su alta homología con Mrp1, un importante exportador de este compuesto a sangre (38). Tanto las sales biliares endógenas (39) como la bilirrubina (38), particularmente en su forma no conjugada (apolar), son sustancias altamente citotóxicas, llevando a muerte celular por necrosis y apoptosis a través de diversos

mecanismos (disfunción mitocondrial con generación de estrés oxidativo, desorganización de la membrana plasmática y lisis, estrés del retículo endoplásmico, entre otros efectos). También, podría haber contribuido a reducir los niveles séricos y tisulares de estos compuestos, una mejora de la expresión de los transportadores de excreción a bilis de sales biliares conjugadas con taurina (BSEP) o de bilirrubina conjugada y glucurónidos/sulfatos de sales biliares (Mrp2). Efectivamente, estos transportadores canaliculares presentaron una tendencia a aumentar su expresión una vez que se administró HGF, lo cual se tendría que confirmar con el aumento en el número de animales analizados, para tener mayor certeza del aumento en estos transportadores, un hecho esperado considerando que estos transportadores son blancos de Nrf2, y suponiendo que Nrf2 sea activado por HGF (7, 25). Sin embargo, habría que evaluar qué tan benéfica resulta la inducción en la expresión de estos transportadores, teniendo en cuenta que (11, 33), ANIT daña predominantemente a las células ductulares (11, 34), y considerando la naturaleza mixta (funcional y obstructiva) del modelo (33), y el hecho de que lo que estamos produciendo es una colestasis sub-aguda, donde existe daño hepático con inicios de daño obliterativo ductular, la excreción de bilis canalicular favorecida por el aumento de estos transportadores podría resultar riesgosa para la integridad de las vías biliares intrahepáticas, en vista del incremento en la presión luminal que podría conducir a infartos biliares, como se comprobó en otro modelo de colangitis esclerosante por KO del transportador Mdr2 (40). Es por esto que resultaría más beneficioso que el transporte basolateral (36) y no el canalicular haya sido la ruta emergente preferencial del mecanismo anti-colestásico del HGF.

Por lo tanto, la protección conferida por HGF contra la acumulación tisular de estos compuestos, ya sea por impedimento del establecimiento del cuadro colestásico, como por favorecer la exportación a sangre de estas sustancias una vez establecido el mismo, podría ser un factor clave en la mejora histológica observada en el grupo ANIT+HGF comparado con ANIT solo.

En efecto, en las tinciones de H-E, son claras las zonas necróticas ocasionadas por el ANIT, como bien está establecido que este tóxico ocasiona (11, 13, 33), debido al efecto detergente de las sales biliares contenidas en el hepatocito, así mismo por la reacción inflamatoria que esto genera, el estallido de especies reactivas de oxígeno (17), y la inducción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (19, 33, 41). Estas lesiones, si bien se encontraban también en los animales que fueron tratados 24 h después de ANIT con HGF, disminuyeron considerablemente en tamaño y número, sustentando entonces fuertemente al HGF como agente protector (20, 32).

Asociado al daño hepatocelular con muerte celular, se desencadenan mecanismos de reparación tisular espontáneos, que dependen en gran medida de la capacidad de los hepatocitos remanentes para regenerar y reemplazar las células muertas o poco funcionales (42). En los animales expuestos a ANIT, este proceso resulta claramente insuficiente para evitar que se desarrollen zonas necróticas. Sin embargo, HGF por sus propiedades como factor de crecimiento, podría potenciar este proceso de modo de hacer sustentable la integridad hepática aún bajo condiciones favorables a la muerte celular, como ocurre en colestasis. Un factor clave que mediaría la capacidad

de HGF para favorecer la regeneración tisular es la vía de señalización dependiente de ERK que este factor de crecimiento evoca (ver figura 6) (43). La isoforma ERK2 favorece la regeneración a través de controlar la entrada en fase síntesis del ADN del hepatocito (44). Por su parte, ERK1 regula la sobrevivencia del hepatocitos, haciéndolo más resistente ante estímulos pro-apoptóticos (44). Por lo tanto, ambas isoformas pueden actuar en forma complementaria para proteger contra la agresión tisular, tanto reparando el tejido dañado por ANIT como protegiendo primariamente de dicho daño. En concordancia con esto, se han descrito efectos anti-apoptóticos y proliferativos del HGF que podrían ser de relevancia en diversas hepatopatías (20, 30, 45).

Además de estos mecanismos de protección del HGF, el infiltrado inflamatorio que presentaron los tejidos dañados (17) no se encontró en los ratones ANIT+HGF, sugiriendo al HGF, también podría actuar un posible agente inmunomodulador, como se sugirió previamente (46). En concordancia con esta posibilidad, se han descrito funciones citoprotectoras de HGF mediante la inducción apoptosis dependiente de caspasas en las células inmunes humanas (47). El tratamiento de células dendríticas con HGF reduce la capacidad de inducir la generación de células Th1 inflamatorias (48). Además, estudios han demostrado que la administración *in vivo* de HGF protege contra enfermedades autoinmunes, tales como la encefalomiелitis autoinmune experimental y la artritis inducida por colágena, a través de la estimulación de células T reguladoras que producen citoquinas inmunosupresoras (49).

Una vez que se comprobó que el HGF tiene efectos anti-colestásicos debido a la capacidad de reparar el daño causado por ANIT, nos dimos a la tarea de evaluar la activación de Nrf2 en hígado de ratones tratados con HGF a diferentes tiempos por medio de un ensayo de retardo de movilidad electroforética, con el fin de observar a qué tiempo se encuentra la mayor activación de Nrf2 inducida por HGF.

Nuestros resultados muestran que la activación de Nrf2 se presentó desde los 15 min, teniendo su pico máximo a la hora, como se reportó anteriormente (26). La activación de este factor de transcripción, se observó también a las 24 h. Sin embargo, esta tardía activación se podría deber a señales secundarias al efecto del HGF, considerando que la activación de los factores de transcripción se da en lapsos de tiempo muy cortos (20, 26). Con esto, confirmamos que HGF activa a Nrf2, permitiendo su translocación al núcleo (22).

Este dato es de suma importancia, ya que se puede observar la temporalidad de la activación de este factor de transcripción debido al HGF sin la variable del agente colestásico, y con esto, tener una noción de a qué tiempo se están llevando a cabo los mecanismos anti-colestásicos del HGF, ya sea de prevención (generación de resistencia a que se produzca el daño), protección (acción simultánea impidiendo el daño) o reversión (reparación del daño una vez establecido).

A continuación, se evaluó la expresión de Mrp3 en los hígados de ratones tratados con HGF a diversos tiempos, para así confirmar que la expresión de este transportador coincidiera con el tiempo de activación del factor de transcripción, presentación primaria del evento seguido de la expresión de transportadores y

síntesis de proteínas. Efectivamente, los eventos se presentaron subsecuentes, pues la activación de Nrf2 se presentó desde los 15 min a 1 h, mientras que Mrp3 comenzó a elevar su expresión a partir de las 3 h, teniendo un aumento constante con el transcurso del tiempo. Esto corrobora el aumento de los niveles de este transportador a las 48 h, como previamente se mostró (Figura13). De forma similar, se sondeó el contenido de GPX1/2, blanco de Nrf2, y catalasa, otra proteína de defensa antioxidante, encontrándose que el contenido de estas proteínas tiene su pico máximo a las 3 h, para después volver a bajar su contenido, debido posiblemente a que a ese tiempo están llevando a cabo su función antioxidante. Resultados similares se encontraron en cultivo primario de hepatocitos tratados con HGF a diversos tiempos, donde a las 3 h inicia el aumento en el contenido de catalasa (24).

De la misma forma que se evaluaron estos blancos de Nrf2, resultaría interesante observar algunos otros blancos, como otros transportadores, ya sea de captación, y exportación canalicular y basolateral, así como, el contenido de enzimas de fase II (GST, UGT) o antioxidantes (HO1, GCS), por mencionar algunas, para así tener mayor certeza que los efectos anti-colestásicos de HGF se deben también al aumento de la expresión de estas proteínas, y no solo de Mrp3.

Una vez que se tuvo la temporalidad de acción de HGF, se hizo lo mismo con la exposición a ANIT, con la finalidad de relacionar los tiempos en que se comienza a inducir toda la maquinaria protectora mediada por HGF con el punto máximo de daño ocasionado por ANIT. Lo que se observó es que, a las 36 h de exposición a ANIT, el

daño colestásico ya está establecido, lo que podemos clasificar como colestasis aguda, dado el tiempo y la dosis (33). Esto se comprobó por los signos macroscópicos que los animales presentaban, como ictericia, enteritis, colecistitis, hepatomegalia y protusiones hepáticas, así como aumento en los niveles de ALP. Por lo tanto, si consideramos que a los ratones ANIT+HGF se les administra HGF 24 h después del tratamiento con ANIT, podemos inferir que HGF está impidiendo que se establezca el daño colestásico; pues como se ha mostrado, HGF induce la activación de Nrf2 a tiempos tempranos. De acuerdo a este esquema temporal, se concluye que HGF *prevendría* el daño ocasionado por ANIT, el cual lleva 36 h en producirse, cuando los mecanismos anti-colestásicos de ANIT, particularmente la inducción de Mrp2, ya está establecida.

En resumen, en una línea del tiempo (Figura 16), donde el tiempo 0 corresponde a la administración de ANIT para luego dejarlo actuar durante 48 h, el establecimiento del daño se daría alrededor de las 36 h. El tratamiento con HGF se da 24 h después de la agresión con ANIT, tiempo al cual el daño ya está en curso como previamente se ha reportado (33), aunque no completamente establecido. Dado que HGF activa a Nrf2 muy rápidamente (desde los 15 min), para tener su pico máximo de activación a la hora y, subsecuentemente, inducir a las 3 h sus genes blanco (maquinaria antioxidante, transportadores basolaterales de exportación), HGF evitaría que el daño por ANIT complete su curso, por lo que, posiblemente, HGF esté actuando como un escudo preventivo ante el daño colestásico.

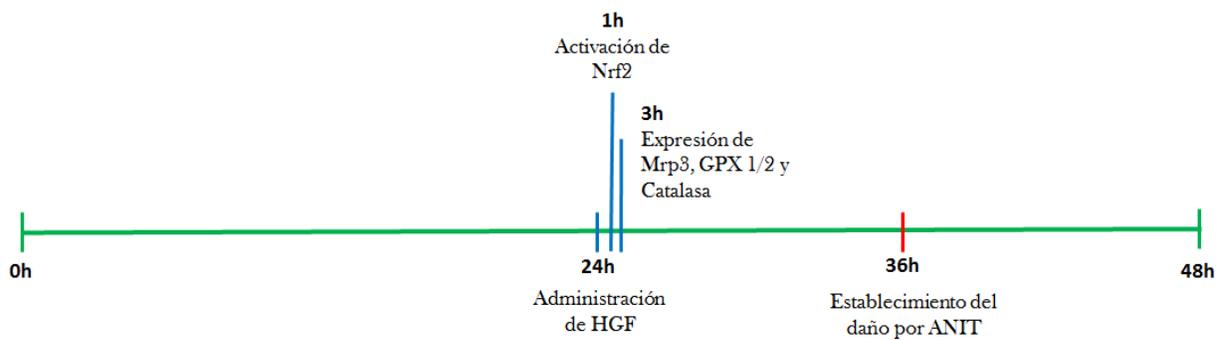


Figura 16. Línea del tiempo de daño por ANIT y protección/repación de HGF. La línea verde representa las 48 h de tratamiento de ANIT, siendo la línea roja el establecimiento del daño y las azules el tratamiento de HGF y el inicio de sus efectos inductores.

10 CONCLUSIÓN

A lo largo de este trabajo, se evaluaron diversas moléculas involucradas en la respuesta al daño inducido por ANIT, y otras tantas relacionadas con los efectos de HGF, así como la respuesta ante la combinación de los dos tratamientos.

Nuestros datos muestran claros efectos anti-colestásicos de HGF en el modelo murino de colestasis producido por ANIT, siendo la activación de Nrf2 inducida por el factor de crecimiento un posible mediador de dicho efecto protector. En particular, el aumento de la expresión de bombas exportadoras basolaterales inducidas por HGF y mediadas por Nrf2 contribuiría a reducir los niveles de sales biliares y bilirrubina, explicando la disminución de los niveles séricos de los marcadores bioquímicos de daño hepático y la atenuación del daño histológico. A esto último, podría contribuir también las reconocidas propiedades proliferativas, antioxidantes, anti-apoptóticas e inmunomoduladoras del HGF; las tres primeras contribuirían a la prevención del daño celular, mientras que la última contribuiría a la reparación de dicho daño. La potencialidad del HGF para activar mecanismos de reparación ante el daño tisular producido por ANIT es menos probable que juegue un rol en nuestro esquema temporal de administración de ANIT y HGF, la respuesta curso-temporal indica que el daño por ANIT se establecería posteriormente al tiempo al cual HGF ejerce la activación de sus genes blanco, por lo que sus propiedades anti-colestásicas estarían relacionadas con su capacidad para prevenir que el daño colestásico se establezca.

Nuestro estudio ha puesto de relevancia un aspecto novedoso del HGF como agente anti-colestásico. Si bien, resta establecer las vías de señalización por las cuales se llevan a cabo sus mecanismos hepatoprotectores, así como el papel que juega su efecto inmunomodulador en la disminución del infiltrado inflamatorio en colestasis, nuestros resultados nos permiten postularlo como un punto de intervención terapéutica en enfermedades colestásicas.

11 REFERENCIAS

1. Kuntz E, & Kuntz, H. Hepatology principles and practice.: Springer; 2006.
2. Isselbacher K. BE, Wilson J., Martin J., Fauci A. & Kasper D. Harrison Principios de Medicina Interna. 13^a, editor1994.
3. Arias I. AH, Boyer J., Cohen D., Fausto N., Shafritz D. & Wolkoff A. The Liver Biology and Pathobiology. 1st, editor2009.
4. Treyer A, Musch A. Hepatocyte polarity. Compr Physiol. 2013;3(1):243-87.
5. Roma MG, Crocenzi FA, Mottino AD. Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease. World J Gastroenterol. 2008;14(44):6786-801.
6. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. J Pathol. 2012;226(2):300-15.
7. Roma MG, Sanchez Pozzi EJ. Oxidative stress: a radical way to stop making bile. Ann Hepatol. 2008;7(1):16-33.
8. Tabibian JH, Masyuk AI, Masyuk TV, O'Hara SP, LaRusso NF. Physiology of cholangiocytes. Compr Physiol. 2013;3(1):541-65.
9. Fickert P, Krones E, Pollheimer MJ, Thueringer A, Moustafa T, Silbert D, et al. Bile acids trigger cholemic nephropathy in common bile-duct-ligated mice. Hepatology. 2013;58(6):2056-69.
10. Becker BA, Plaa GL. Quantitative and temporal delineation of various parameters of liver dysfunction due to alpha-naphthylisothiocyanate. Toxicol Appl Pharmacol. 1965;7(5):708-18.

11. Tanaka Y, Aleksunes LM, Cui YJ, Klaassen CD. ANIT-induced intrahepatic cholestasis alters hepatobiliary transporter expression via Nrf2-dependent and independent signaling. *Toxicol Sci.* 2009;108(2):247-57.
12. Yang P, Chen P, Wang T, Zhan Y, Zhou M, Xia L, et al. Loss of A(1) adenosine receptor attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice. *Toxicol Sci.* 2013;131(1):128-38.
13. Kodali P, Wu P, Lahiji PA, Brown EJ, Maher JJ. ANIT toxicity toward mouse hepatocytes in vivo is mediated primarily by neutrophils via CD18. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;291(2):G355-63.
14. Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U. Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis.* 2010;42(6):409-18.
15. Krell H, Metz J, Jaeschke H, Hoke H, Pfaff E. Drug-induced intrahepatic cholestasis: characterization of different pathomechanisms. *Arch Toxicol.* 1987;60(1-3):124-30.
16. Kossor DC, Handler JA, Dulik DM, Meunier PC, Leonard TB, Goldstein RS. Cholestatic potentials of alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT) and beta-naphthylisothiocyanate (BNIT) in the isolated perfused rat liver. *Biochem Pharmacol.* 1993;46(11):2061-6.
17. Copple BL, Jaeschke H, Klaassen CD. Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. *Semin Liver Dis.* 2010;30(2):195-204.
18. Gonzalez-Sanchez E, Perez MJ, Nytofte NS, Briz O, Monte MJ, Lozano E, et al. Protective role of biliverdin against bile acid-induced oxidative stress in liver cells. *Free Radic Biol Med.* 2016.

19. Makino H, Shimizu H, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, et al. Changes in growth factor and cytokine expression in biliary obstructed rat liver and their relationship with delayed liver regeneration after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol.* 2006;12(13):2053-9.
20. 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.
21. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene.* 1994;9(1):49-57.
22. Palestino-Domínguez M. C-CD, Gutiérrez-Ruíz M. C., Gómez-Quiroz L. E. El Factor de Crecimiento de Hepatocitos y su Receptor c-Met en la Protección contra el Daño Hepático Producido por el Alcohol. *Revista de educación Bioquímica.* 2012.
23. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell.* 1994;77(2):261-71.
24. Dominguez-Perez M, Nuno-Lambarri N, Clavijo-Cornejo D, Luna-Lopez A, Souza V, Bucio L, et al. Hepatocyte Growth Factor Reduces Free Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7960386.
25. Weerachayaphorn J, Mennone A, Soroka CJ, Harry K, Hagey LR, Kensler TW, et al. Nuclear factor-E2-related factor 2 is a major determinant of bile acid

homeostasis in the liver and intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(9):G925-36.

26. Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, Lopez-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(6):1177-84.

27. Giebeler A, Boekschoten MV, Klein C, Borowiak M, Birchmeier C, Gassler N, et al. c-Met confers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice. *Gastroenterology*. 2009;137(1):297-308, e1-4.

28. Yeh TH, Krauland L, Singh V, Zou B, Devaraj P, Stolz DB, et al. Liver-specific beta-catenin knockout mice have bile canalicular abnormalities, bile secretory defect, and intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 2010;52(4):1410-9.

29. Song KH, Ellis E, Strom S, Chiang JY. Hepatocyte growth factor signaling pathway inhibits cholesterol 7 α -hydroxylase and bile acid synthesis in human hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46(6):1993-2002.

30. 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 CCl₄ exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):942-51.

31. 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(20):9844-51.

32. 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(1):26-36.

33. Dahm LJ, Ganey PE, Roth RA. 9.25 - α -Naphthylisothiocyanate A2 - McQueen, Charlene A. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier; 2010. p. 571-9.

34. Kossor DC, Meunier PC, Handler JA, Sozio RS, Goldstein RS. Temporal relationship of changes in hepatobiliary function and morphology in rats following alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT) administration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993;119(1):108-14.

35. Keppler D. Cholestasis and the role of basolateral efflux pumps. *Z Gastroenterol.* 2011;49(12):1553-7.

36. Keppler D. The roles of MRP2, MRP3, OATP1B1, and OATP1B3 in conjugated hyperbilirubinemia. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(4):561-5.

37. Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch.* 2007;453(5):661-73.

38. Bellarosa C, Bortolussi G, Tiribelli C. The role of ABC transporters in protecting cells from bilirubin toxicity. *Curr Pharm Des.* 2009;15(25):2884-92.

39. Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci.* 1999;14:24-9.

40. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology*. 2002;123(4):1238-51.
41. Tjandra K, Sharkey KA, Swain MG. Progressive development of a Th1-type hepatic cytokine profile in rats with experimental cholangitis. *Hepatology*. 2000;31(2):280-90.
42. Chanda S, Mehendale HM. Hepatic cell division and tissue repair: a key to survival after liver injury. *Mol Med Today*. 1996;2(2):82-9.
43. Hammond DE, Carter S, Clague MJ. Met receptor dynamics and signalling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2004;286:21-44.
44. Guegan JP, Fremin C, Baffet G. The MAPK MEK1/2-ERK1/2 Pathway and Its Implication in Hepatocyte Cell Cycle Control. *Int J Hepatol*. 2012;2012:328372.
45. Valdes-Arzate A, Luna A, Bucio L, Licona C, Clemens DL, Souza V, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):424-30.
46. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med*. 2014;12:260.
47. Maraldi T, Beretti F, Guida M, Zavatti M, De Pol A. Role of hepatocyte growth factor in the immunomodulation potential of amniotic fluid stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(6):539-47.
48. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006;108(5):1435-40.

49. Benkhoucha M, Santiago-Raber ML, Schneiter G, Chofflon M, Funakoshi H, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor inhibits CNS autoimmunity by inducing tolerogenic dendritic cells and CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6424-9.