



UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Estudio de la regeneración hepática bajo una dieta hipercolesterolémica.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Biol. Exp. Natalia Nuño Lámbarri

Comité tutorial

Director: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Co-director: Dr. José Carlos Fernández-Checa

ASESORES: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez-Ruiz

Dr. Julio Morán Andrade

México, D.F 30 de Septiembre del 2011

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F

lega@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR

Dr. José Carlos Fernández Checa.

Hospital Clinic I Provincial. España, Barcelona

checa229@yahoo.com

ASESORA

Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz.

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F

mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Julio Eduardo Roque Moran Andrade.

Instituto de Fisiología Celular.

Universidad Autónoma de México. México, D.F

jmoran@ifc.unam.mx

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 y en el Centro Esther Koplowitz (CEK) Barcelona España, bajo la codirección del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz y la codirección del Dr. José Carlos Fernández Checa.

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

El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I 309-1) pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad de CONACyT PIFOP-CONACyT-SEP y cuenta con el apoyo del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con clave C/PFPN-2002-35-32.

Fondo Sectorial de Investigación SEP-CONACyT CB-2006-1-60181 y CONACyT con número de becario/CVU 234219/288846.

Para la estancia en Barcelona Natalia Nuño Lámbarri contó con la beca de la Fundación Carolina de Formación permanente.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE

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

SECRETARIO

Dr. José Carlos Fernández Checa.
Hospital Clinic I Provincial. España, Barcelona
checa229@yahoo.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

VOCAL

Dr. Eduardo Montalvo Jave
Profesor de Cirugía. UNAM
Jefe del Servicio de Cirugía General. Unidad 304.
Hospital General de México
montalvoeduardo@hotmail.com

Los miembros del jurado de designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA BAJO UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA" con fecha 30 de septiembre del 2011.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

SECRETARIO

Dr. José Carlos Fernández Checa

VOCAL

Dr. José Luis Gómez Olivares

VOCAL

Dr. Eduardo Montalvo Jave

AGRADECIMIENTOS

El esfuerzo y optimismo dedicado a lo largo de los años de estudio, son el fruto de la gente que creyó en mi persona, apoyándome en todo sentido, dándome la mano a través de la educación. Es por ello que este trabajo está dedicado a las personas que a lo largo de mi vida me han dado la formación de ser persona.

A mi director de tesis Luis Enrique Gómez Quiroz quien tuvo que ver con la puesta a punto de este trabajo, haciéndose cargo de una responsabilidad a la altura de su grandeza.

A Concepción Gutiérrez Ruíz quien me abrió las puertas a un campo desconocido y me llevó de la mano en el camino.

A José Carlos Fernández Checa y a Carmen García Ruíz por mostrarme una nueva manera de ver el mundo, por recibirme calurosamente en un país desconocido y por sus valiosas aportaciones al trabajo.

Al Doctor Julio Morán Andrade por su participación en la realización de esta tesis.

A los miembros de mi comité evaluador José Luis Gómez Olivares y Eduardo Montalvo Jave por los valiosos comentarios a este trabajo.

A mis compañeras del laboratorio de Fisiología Celular, Mayra, Denise, Marcela, Nelly, Karina, Sandra, Cristina e Ileana por su apoyo incondicional.

A mis compañeras de trabajo catalanas Anna, Nuria, Raquel y Susana por su paciencia, comprensión y gran amistad.

A mis padres que incondicionalmente me han brindado su apoyo y me han enseñado que con disciplina y tenacidad uno puede alcanzar sus sueños.

A mis hermanos que tras el paso de los años me han enseñado a ser una mejor persona.

Por último pero no menos importante a mi pareja Fernando Feres quien ha llegado a revolucionar mi vida y me ha permitido aprender de el, siendo una fuente de inspiración.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD)	2
Hipercolesterolemia	4
Regeneración hepática.....	6
Ciclo celular	7
Células progenitoras hepáticas	9
El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met.....	10
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES	11
HIPÓTESIS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Materiales	13
Diseño experimental	13
Hepatectomía parcial.....	14
Determinación de colesterol por Oftaldialdehido	14
Aislamiento de hepatocitos.....	15
Ensayo de herida-cicatriz.....	17
Extracción y cuantificación de proteína	17
Inmunoblot	18
Histología	19
Tinción Hematoxilina & Eosina	19
Determinación de triglicéridos por tinción de aceite rojo O.....	19
Determinación de ácidos biliares totales (ABT)	20
Análisis estadístico	20
RESULTADOS	22
La dieta hipercolesterolémica incrementa el contenido de colesterol en el tejido hepático y en los hepatocitos en cultivo primario.....	22

La dieta hipercolesterolémica favorece la lipogénesis.	25
<i>La dieta hipercolesterolémica afecta la regeneración hepática</i>	25
<i>La esteatosis inducida por la dieta HC afecta el ciclo celular</i>	32
<i>Proliferación de células ovas</i>	32
<i>La dieta hipercolesterolémica induce una hipertrófia en los hepatocitos</i>	37
<i>Efecto del HGF en hepatocitos de ratones HC</i>	37
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	52
REFERENCIAS.....	53

INTRODUCCIÓN

Enfermedad del hígado graso no-alcohólico (NAFLD)

La esteatosis no alcohólica o enfermedad del hígado graso no-alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés) es la más común de las enfermedades hepáticas crónicas en el mundo occidental tanto en adultos (Musso et al. 2009) como en niños (Loomba et al. 2009), teniendo una prevalencia superior al 30% en población adulta en general. Se considera que la etnicidad y los factores genéticos afectan la prevalencia de la enfermedad, encontrando un valor del 45% entre la población hispánica (Musso et al. 2009). Sin embargo, a la fecha la historia natural de esta enfermedad no está completamente comprendida.

La NAFLD es una enfermedad asintomática y reversible, sin embargo, puede derivar en un espectro de patologías hepáticas, variando desde una simple esteatosis en su forma más benigna, hasta una cirrosis, la forma más agresiva, que es la patología hepática que más muertes produce, teniendo a la esteatohepatitis no-alcohólica (NASH) como una lesión de severidad intermedia (Jou et al. 2008).

NAFLD se define como la infiltración de grasa en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol y se caracteriza predominantemente por la presencia de esteatosis hepática macrovesicular. En NASH, además de la esteatosis, se presenta un daño y muerte de hepatocitos, así como un infiltrado de células inflamatorias al hígado. El daño hepático relacionado con NASH generalmente lleva a la fibrosis hepática. Así, la progresión de NAFLD a NASH incrementa el riesgo de desarrollar cirrosis. La NAFLD

progresar lentamente, en años o décadas a NASH, cirrosis o hepatocarcinoma, por lo que la historia natural de la enfermedad es difícil de determinar en un tiempo corto.

La esteatosis hepática macrovesicular se caracteriza por la acumulación de triglicéridos (TG), lo cual ocurre como resultado de un desbalance entre la producción y el recambio. Los TG son formados por la esterificación de un glicerol con moléculas de ácidos grasos libres (FFA). La poza neta de FFA disponible para la síntesis de triglicéridos depende del balance entre la formación y utilización de los FFA. La NAFLD se desarrolla cuando la toma y síntesis de FFA excede a la oxidación y re-secreción al torrente sanguíneo. Los mecanismos que potencialmente contribuyen a la acumulación de grasa en el parénquima hepático es por tanto el resultado de un metabolismo anormal de ácidos grasos que puede incluir:

- Incremento de la lipogénesis hepática (DNL)
- Transporte excesivo de FFA al hígado que provienen del tejido adiposo y de la dieta, comparado con los que el órgano puede metabolizar
- Desacoplamiento de la eliminación de FFA a través de la oxidación y secreción por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Se ha reportado que el 59% de los TG hepáticos derivan de los FFA del tejido adiposo, 26% de DNL y el 15% de las grasas de la dieta en NAFLD (Donnelly et al. 2005). La tasa de secreción de VLDL en NAFLD es inadecuada para la disponibilidad de TG incrementada en el hígado: mientras la tasa de secreción de VLDL-TG en sujetos sanos crece linealmente con la disponibilidad de TG

hepáticos, en pacientes con NAFLD alcanza una estabilización al tiempo que la infiltración de TG excede en un 10%(Fabbrini et al. 2008). Así el incremento de la toma de FFA derivados del tejido adiposo, un inapropiado incremento de la DNL y una exportación inadecuada de los TG son los responsables de una acumulación de grasa en el NAFLD.

Hipercolesterolemia

Mientras en la literatura se asume que la NAFLD es el resultado de la acumulación de triglicéridos, es importante reconocer el potencial patogénico de otros lípidos. La acumulación de FFA, TG y colesterol pueden coexistir en la esteatosis hepática. El colesterol es un lípido con gran importancia biológica, y durante la hipercolesterolemia experimental se ha encontrado una esteatosis hepática considerable (Wu et al. 2007). Una de las respuestas celulares más generales de la sobrecarga de colesterol es la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en ingles), las cuales pueden disparar una respuesta inflamatoria. Se ha reportado que las ratas sometidas a una dieta enriquecida con colesterol (4%) incrementan 10 veces el contenido de colesterol a nivel hepático y 3 veces el contenido de triglicéridos. El colesterol libre no sufre cambios, por lo que consideran que el exceso de colesterol se está almacenando en forma esterificada (Wu et al. 2007). El grupo del Dr. Fernández Checa(Marí et al. 2006) reporta datos muy interesante analizando el tipo de lípido, más que la cantidad del mismo, que determina la susceptibilidad del hígado graso de progresar a NASH. Los resultados muestran que el colesterol en el hígado inducido por la dieta HC, pero no los FFA o los TG, es clave en "la primera agresión",

debido a que promueve la sensibilización ante estímulos citotóxicos mediados por TNF- α o Fas, sobre todo por la implicación de una disfunción mitocondrial, en donde la depleción del glutatión (GSH) mitocondrial y el incremento en el estado oxidante juegan un papel relevante, lo cual podría generar NASH.

La lipogénesis es la vía metabólica que permite la conversión de un exceso de hidratos de carbono en ácidos grasos, que son en última instancia esterificados con glicerol 3-fosfato para formar triglicéridos. La actividad de la vía lipogénica depende fuertemente de las condiciones nutricionales. Las actividades enzimáticas lipogénicas son controladas por mecanismos post-traduccionales, pero el control principal se encuentra a nivel transcripcional.

La proteína de unión al elemento regulatorio de esteroides 1c (SREBP-1c) ha sido identificada como mediadora de los efectos transcripcionales de la insulina y la glucosa en la expresión génica glucolítica y lipogénica. Las SREBPs se sintetizan como precursores inactivos unidas a las membranas del retículo endoplásmico (ER) y por lo tanto deben someterse a una acción proteolítica para liberar a su dominio N-terminal, que constituye al factor de transcripción maduro.

Los animales alimentados con una dieta alta en colesterol muestran un aumento selectivo en el ARNm y proteínas nucleares de SREBP-1c, induciendo la expresión de genes lipogénicos específicos, así como elevadas índices de lipogénesis. La proteína SREBP-1c genera ácidos grasos, necesarios para la formación de ésteres de colesterol, amortiguando la concentración de colesterol (Ferré & Foufelle 2010).

Regeneración hepática

Tanto en animales como en humanos, el hígado tiene una capacidad única de regular su crecimiento y masa. Esta propiedad es particularmente notable porque los hepatocitos raramente se dividen, normalmente se encuentran arrestados en la fase del ciclo celular G₀ (Fawcett 1995; Diehl 2005; Delgado-Coello et al. 2011).

Varios factores pueden provocar disminución en la masa hepática, por ejemplo, la remoción quirúrgica para eliminar tumores o para realizar un trasplante, pérdida celular causada por daño químico o muerte celular ocasionada por virus. (Diehl 2005) Por lo general, la regeneración hepática se estudia mediante la realización de un procedimiento quirúrgico que elimina 2/3 partes de la masa del hígado en los roedores (ratas y ratones), una técnica conocida como la hepatectomía parcial de 2/3 partes (PHX) (Mitchell & Willenbring 2008).

Durante la regeneración tisular los hepatocitos son las primeras células que entran en la síntesis de ADN sometiéndose a una primera etapa de síntesis (que lleva a cabo un 60% de los hepatocitos) culminando aproximadamente a las 36 h en ratones. Un segundo porcentaje menor de células entran en una segunda ronda de la síntesis de ADN, así estableciendo el número original de los hepatocitos. La proliferación de las células epiteliales biliares se produce un poco más tarde que los hepatocitos. Cabe destacar que la sustitución de la masa hepática perdida es mediada a través de la proliferación de hepatocitos adultos

maduros, además de otros tipos de células hepáticas(N Fausto 2000; Michalopoulos 2007; Dorrell & Grompe 2005).

Ciclo celular

El proceso de regeneración se considera como una serie de pasos que comprenden una señal de inicio, una fase de preparación, seguida de una fase de progresión, otra fase de ciclo celular y una fase final de frenado. La hepatectomía parcial genera una señal de inicio, seguida de una fase de preparación, las cuales actúan en las células arrestadas en G₀, haciendo una transición a la fase G₁, la cual puede ser alargada antes de que las células pasen los puntos de restricción y estén comprometidas a entrar en la fase S. Para la progresión de G₁ a S es necesario pasar el punto de restricción, después del cual las células están comprometidas a completar el ciclo celular. Después de la fase S le sigue la fase G₂ y después la mitosis (M), resultando en una división celular. Las células repetirán el ciclo celular hasta que la masa hepática se restablezca acorde a un tamaño apropiado del cuerpo(Mangnall et al. 2003).

La ciclina D1 es el factor crítico para la progresión a través de la fase tardía G₁ en los hepatocitos, lo cual sugiere que esta proteína está implicada en la regulación de la proliferación. La disminución en la proliferación se asocia con una disminución en la expresión de la ciclina D1. El aumento de la ciclina D1 da como resultado la activación de los complejos ciclina D1/cdk4 y ciclina D1/cdk6(Albrecht & Hansen 1999).

Conforme la abundancia del complejo ciclina D1/cdk4 aumenta durante la progresión de la fase G1, estos complejos secuestran a las proteínas inhibidoras de cdks, tales como p21 y p27, las cuales disminuyen la concentración de inhibidores "libres" de cdks, capaces de prevenir la activación del complejo ciclina A/cdk2(Albrecht & Hansen 1999). La activación de cdk2 juega un papel esencial en la transición de la fase G1-S y se asocia a las ciclinas E y la ciclina A. El inhibidor p21 se encuentra aumentado en las células que están en proliferación y parece jugar un papel importante en la gobernación de la progresión del ciclo celular(Albrecht et al. 1998).

Células progenitoras hepáticas

Cuando la capacidad de proliferación de los hepatocitos está comprometida debido a un daño, la regeneración depende de las células progenitoras o también llamadas células ovals(Nelson Fausto & Campbell 2003). El principio general que subyace a la activación de células progenitoras se basa en una combinación de una lesión hepática permanente y la incapacidad de los hepatocitos para proliferar en respuesta a los daños(Tolosa et al. 2011). En la enfermedad de hígado graso no alcohólico, la proliferación de hepatocitos parece estar inhibida por el estrés oxidativo. Bajo estas condiciones, la aparición y activación de las células ovals son un marcador de la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, las células progenitoras hepáticas parecen jugar un papel importante en la resistencia a los efectos de las enfermedades hepáticas más comunes y graves(Dorrell & Grompe 2005). Se han utilizado varios

marcadores para identificar estas las células ovales, tales como OV-6, Tu-1, CD34, c-kit, Sca-1 y la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM)(Tolosa et al. 2011).

El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés Hepatocyte Growth Factor), ejerce sus funciones a través de su receptor anclado a la membrana llamado c-Met que es un receptor tirosina cinasa. Una vez que se une el ligando se lleva a cabo una dimerización de c-Met, y varias tirosinas son fosforiladas. Dentro del dominio de la tirosina cinasa, dos de las tirosinas son los principales sitios de autofosforilación cuando estos sitios son mutados experimentalmente se abate su actividad biológica(Longati et al. 1994). Fuera del dominio de la cinasa, dos sitios de autofosforilación en la región C-terminal son responsables del reclutamiento de varias proteínas involucradas en la iniciación de la señalización intracelular(Ponzetto et al. 1994).

El HGF es muy importante para la progresión del ciclo celular durante la regeneración hepática. Se ha demostrado que la señalización generada por HGF es esencial para la entrada al ciclo celular después de una hepatectomía parcial(Nelson Fausto et al. 2011).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de una dieta hipercolesterolémica en el proceso de reparación y regeneración hepática.

OBJETIVOS PARTICURALES

- Determinar el efecto en la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial en ratones alimentados con una dieta hipercolesterolémica.
- Estudiar la expresión de las principales proteínas del ciclo celular en el hígado de animales alimentados con una dieta hipercolesterolémica y sometidos a una hepatectomía parcial.
- Identificar el involucramiento de células ovas en el proceso de regeneración hepática en animales alimentados con una dieta hipercolesterolémica y sometidos a una hepatectomía parcial, empleando marcadores moleculares de este tipo celular.
- Determinar la activación de c-Met, y sus efectos en la reparación, en hepatocitos de ratones alimentados con una dieta hipercolesterolémica.

HIPÓTESIS

Los niveles elevados de colesterol en las células hepáticas, generados por el consumo de una dieta hipercolesterolémica afectarán la regeneración del órgano y el proceso de transducción de señales del HGF y su receptor c-Met en hepatocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Todos los reactivos usados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich de México excepto cuando se indique lo contrario.

Diseño experimental

Para el presente estudio se usaron ratones de la cepa C57BL/6 con un rango de edad entre las 8 y 12 semanas de nacidos.

La dieta hipercolesterolémica (HC) compuesta por 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio (Dyets Inc) fue producida tomando como base la dieta estándar para roedores chow (Purina Inc), misma que fue usada en el estudio como dieta control, tal como ha sido reportado por Mari et al. (2004).

Los ratones fueron dejados en ayuno por 12 horas previo al inicio de la dieta HC la cual fue dejada por 48 horas. Los animales control fueron igualmente dejados por 12 horas en ayuno y posteriormente fueron alimentados con la dieta chow por 48 h. En todo momento los animales tuvieron libre acceso a agua.

En el caso de los animales sometidos a la hepatectomía parcial, una vez recuperados del procedimiento quirúrgico siguieron recibiendo la dieta HC o chow, según el caso por el tiempo indicado hasta el momento de su sacrificio.

Los ratones se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos y bajo cuidados especificados en el manual de procedimientos de la Universidad

Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y la guía para cuidados y uso de animales de laboratorio establecido por el NIH (Bethesda, MD, USA) hasta el día de su sacrificio previa anestesia con isofluorano al 2%

Hepatectomía parcial

La hepatectomía parcial se hizo acorde a lo reportado por Mitchell y Willenbring (2008). Brevemente, los ratones fueron anestesiados con isofluorano al 2% y un flujo de oxígeno de 2 litros /minuto. Posteriormente se desinfectó el área abdominal con etanol al 70%. A continuación se hizo una incisión abdominal tanto de la piel como muscular (aproximadamente 3 cm). Se puso una sutura 4-0 en la base del lóbulo lateral izquierdo (cerca del hilio hepático) y se anudó fuertemente lo más cerca posible de la base del lóbulo, después se utilizaron micro tijeras para cortar el lóbulo que se anudó previamente. Consecutivamente se hizo el segundo nudo en el lóbulo medio del hígado y después se cortó igual que el lóbulo izquierdo. A continuación se suturó el peritoneo con una sutura de 5-0. Después de haber cerrado el abdomen se colocó betadina en el área que rodea la sutura y se puso al ratón en una cama térmica para su recuperación.

Determinación de colesterol por Oftaldialdehído

En una caja Petri de 10 cm de diámetro se sembraron hepatocitos como se indicó anteriormente. Posteriormente se añadieron 200µl de amortiguador de fosfatos (PBS) para raspar las células, se agregaron 200µl de EtOH-KOH 33%, se vortexeo 1 minuto y se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Después se añadieron 200µl de agua MQ y 400µl de hexano grado HPLC, esto se vortexeó

por 1 minuto y se dejó reposar 1 minuto, tres veces cada paso. A continuación se centrifuga durante 2 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Se colectaron 200µl de los 400µl de hexano en un tubo eppendorf nuevo y se puso a secar en speed vac por 45 minutos. En seguida se añadieron 200µl de isopropanol y se vortexearon por 3 minutos y se centrifugaron 2 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron por una columna Bonda pak c/8 10µm WATERS WAT 027324 con un disolvente compuesto por Isopropanol, Acetonitrilo : H₂O MQ (60:30:10) y se leyó a una absorbancia de 200nm a un flujo de 1ml/min.

Inmunofluorescencia con filipina para determinar el contenido de colesterol

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente, después se lavó tres veces con PBS, al terminar se bloquearon con BSA al 1% en PBS + saponina al 0.2% por 15 minutos, posteriormente se lavaron dos veces con PBS. A continuación se colocó la Filipina (1/100) + BSA 0.1% en PBS por 60 minutos a temperatura ambiente, al finalizar se hicieron 3 lavados con PBS y las muestras se montaron con Dako Cytomation.

Aislamiento de hepatocitos

Para la obtención de hepatocitos de ratón se usó la técnica de doble perfusión con colagenasa (Papeleu et al. 2006). Se emplearon ratones macho de 8 a 12 semanas de edad. Se anestesiaron intraperitonealmente con 0.7 ml de avertina. La superficie abdominal se limpió con etanol al 70% y se realizó una incisión en el abdomen y tórax para dejar expuesto el hígado y corazón. La vena

cava inferior se anudó con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones; por el atrium del corazón se introdujo un catéter Abbocath 22G que estaba acoplado a un equipo de perfusión y se cortó la vena porta para abrir la circulación. Como primer paso, el hígado se perfundió con aproximadamente 30 ml de Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , y que además contenía HEPES 10 mM, pH 7.4, y EGTA 75 mM. . En el segundo paso de la perfusión se utilizaron 50 ml de una solución de colagenasa tipo I al 0.05% en medio Williams y HEPES 10 mM, pH 7.4. La perfusión se llevó a cabo a una temperatura de 37 °C. Después el hígado se removió y se colocó en una caja de Petri 10 cm de diámetro con 50 ml de medio Williams frío suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico y antimicótico (medio de adhesión). El hígado se disgregó utilizando 2 pipetas estériles de 1 ml y se obtuvo una solución con células hepáticas dispersas que se pasaron por un filtro con poros de 100 μm de tamaño. La solución filtrada se centrifugó a 45 g durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión frío para posteriormente mezclarse suavemente con una solución de Percoll con solución Hanks 10X, se centrifugó a 170 g durante 15 min a 4 °C para obtener un pellet compuesto de hepatocitos viables. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesión frío. Para determinar la viabilidad se realizó un conteo con azul de tripano en un contador automático Vi-Cell (Beckman Coulter). La viabilidad celular siempre fue superior al 95%. Las células viables se sembraron a una densidad de 254,000 células/cm² y se mantuvieron en incubación por 4 h a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se cambió el medio a uno sin

suero y se dejó el cultivo toda la noche, al día siguiente se cambió el medio por uno fresco y se procedió a los tratamientos con 50 ng/ml de HGF a diferentes tiempos.

Ensayo de herida-cicatriz

En una caja Petri de 6 cm de diámetro, se sembraron hepatocitos como se indicó anteriormente. Con una punta de pipeta de 200µl se raspó la monocapa de cultivo celular haciendo tres líneas paralelas y una perpendicular. Las células fueron lavadas dos veces con medio de cultivo para eliminar las células despegadas y se agregó medio Williams sin Suero Fetal Bovino (SFB) para después poner tratamientos de HGF 50ng/ml. Se tomaron fotografías a diferentes tiempos utilizando una cámara digital acoplada a un microscopio invertido Axiovert 25 (Carl Zeiss, Alemania).

Extracción y cuantificación de proteína

Se tomó aproximadamente 100 mg de tejido hepático y se homogenizó en 1ml de PBS, posteriormente se centrifugó a 8900 g durante 1 minuto a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el botón celular se resuspendió en 300µl de amortiguador de lisis T-PER (Pierce Chemical, USA) con mezcla de inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Roche). Se incubó en hielo durante 15 minutos y después se centrifugó a 17000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se guardó a -20°C en alícuotas hasta ser cuantificadas.

La proteína se cuantificó colorimétricamente utilizando el estuche comercial BCA (Pierce Chemical), basado en la reacción de Biuret ó del ácido bicincónico. Como curva patrón se utilizó albúmina sérica de bovino.

Inmunodetección de diversas proteínas

Se realizó la separación electroforética de 100µg de 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, USA). La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween (TBST) durante 1 hora en agitación constante. Para la detección de cada proteína de interés, la membrana se incubó con anticuerpos específicos (ver Tabla 1) durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces en TBST por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en una solución de albúmina en TBST por 90 min. Después se lavó 2 veces por 10 min on TBST y 1 vez con TBS por 5 min. Se detectó con 1ml de sustrato luminiscente (SuperSignal West Pico Substrate, Pierce, USA), las bandas se cuantificaron por densitometría usando el fotodocumentador Gel logic 1500 (Kodak, USA).

Tabla 1 Anticuerpos empleados en Western Blot				
	Anticuerpo	Peso molecular kDa	Anticuerpo secundario	Marca
1	Actina	43	Ratón	Santa Cruz, sc-130301
2	Cdk2	34	Conejo	Santa Cruz, sc-748
3	Cdk4	34	Conejo	Santa Cruz, sc-749
4	Cdk6	40	Conejo	Santa Cruz, sc-7181
5	Clclina A	54	Conejo	Santa Cruz, sc-751

6	Ciclina D1	37	Conejo	Santa Cruz, sc-753
7	Ciclofilina A	18	Conejo	Cell Signaling #2175
8	EpCAM	40	Ratón	Cell Signaling #2929
9	Keratina 19	40	Ratón	Cell Signaling #4558
10	p-Met (Tyr1349)	131	Conejo	Santa Cruz, sc-34086
11	p21	21	Conejo	Santa Cruz, sc-756
12	p27	27	Conejo	Santa Cruz, sc-756
13	PCNA	36	Ratón	Cell Signaling #2586
14	SREPBI	125	Conejo	Santa Cruz, sc-8984

Histología

Hematoxilina-Eosina

Los portaobjetos conteniendo los cortes de hígado incluidos en parafina se introdujeron 10 minutos a la estufa a 60°C. Las secciones de tejido hepático fueron desparafinadas por 10 minutos en xilol y gradualmente se hidrataron en alcoholes del 100 al 70 % por 5 minutos acabando con agua otros 5 minutos. Después se colocaron en Hematoxilina de Harris por 5 minutos, consecutivamente se hizo un lavado de estos en agua por 5 minutos, se continuó sumergiéndolos en HCl-EtOH96% hasta que apareció 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. Se volvió a lavar con agua corriente durante 2 minutos y con agua destilada otros 2 minutos. En seguida se colocaron los portaobjetos en Eosina alcohólica 2 minutos. Posteriormente se deshidrataron por un minuto en cada etanol, pasando del etanol de 70% al absoluto hasta llegar al xilol, al terminar se montó con Dako Cytomation.

Determinación de triglicéridos por tinción con Aceite Rojo O

Las células fueron sembradas en placas de 12 pozos (Costar, USA), después se les cambió el medio de adhesión por medio W+AB/AM. Las células se cultivaron en este medio toda la noche para permitir que se adhirieran completamente. Al día siguiente se retiró el medio y se lavaron 2 veces con PBS, (Sigma, USA). Para fijar las células se agregaron 0.4 ml de paraformaldehído al 2.5% (PFA, Sigma) durante 1 h. Se retiró el PFA y se lavó con PBS. Se tiñeron con 0.4 ml de aceite rojo O al 0.2% (Sigma, USA) durante 4 h. Se lavaron las células 4 veces con H₂O desionizada y se dejaron secar toda la noche.

Determinación de ácidos biliares totales (ABT)

Los ácidos biliares totales (TBA) se determinaron en el tejido hepático, usando un estuche de TBA de Diazyme (San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 100 mg de tejido hepático congelado, después se homogenizó en 1 ml de amortiguador de fosfatos salino con los inhibidores de proteasas y de fosfatasa (Pierce, Rockford, IL). Las muestras fueron centrifugadas a 100,000X g a 4°C, los sobrenadantes fueron sometidos a la determinación de TBA.

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó al menos por triplicado usando al menos 3 animales de experimentación. Los datos fueron reportados como 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 empleo el programa NCSS. El nivel de significancia fue de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

La dieta hipercolesterolémica incrementa el contenido de colesterol en el tejido hepático y en los hepatocitos en cultivo primario

Con la finalidad de corroborar la sobrecarga de colesterol en el hígado de los ratones, después de haber sido alimentados por 48 horas con una dieta hipercolesterolémica (2% de colesterol, 0.5% de colato de sodio, HC), se determinó el contenido de colesterol en el tejido hepático.

La figura 1 muestra que los hígados de ratones alimentados con la dieta HC presentan un incremento significativo el contenido de colesterol (8 veces) con respecto a los ratones alimentados con la dieta balanceada (chow), demostrando que efectivamente la dieta HC aumenta la carga de colesterol en el hígado.

Por otro lado, se determinó si el cultivo de hepatocitos derivados de ratones HC afectaba el contenido de colesterol. La figura 2 muestra que los hepatocitos en cultivo mantienen elevado el contenido de colesterol, el cual se observo por microscopia confocal utilizando a la filipina como fluoróforo específico para detectar el colesterol libre. La figura 3B y 3D muestran un alto contenido de lípidos en los hepatocitos HC, mientras, que en la figura 2B se puede observar que las células HC presentaron más fluorescencia confirmando la sobrecarga de colesterol.

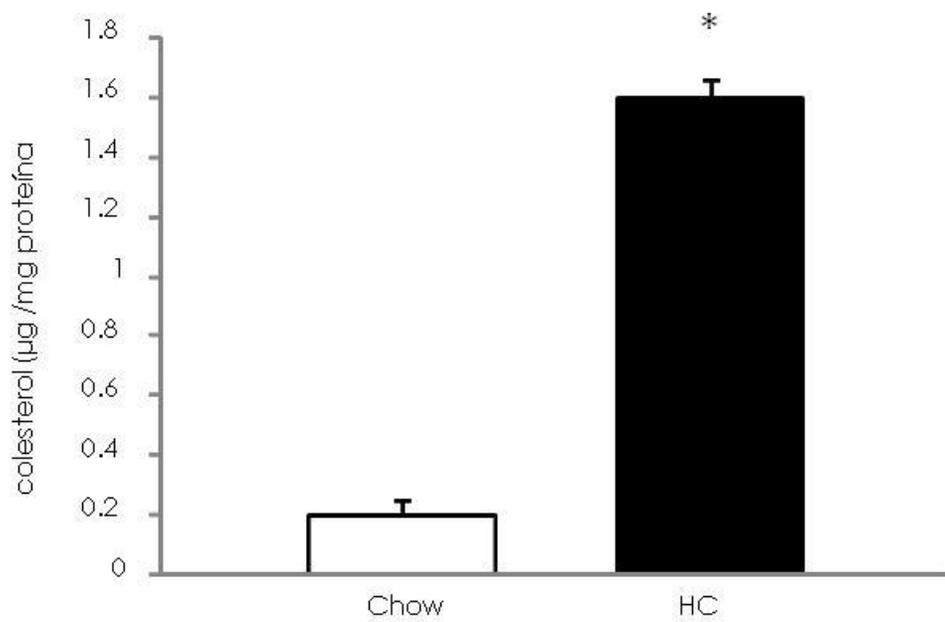


Figura 1. Contenido de colesterol en tejido hepático. Determinación de colesterol en tejido hepático en animales sometidos a una dieta equilibrada (chow) e hipercolesterolémica (HC) por dos días. Las columnas representan el promedio de tres experimentos independientes llevado a cabo por triplicado \pm DE. * $p \leq 0.05$ vs. la dieta chow.

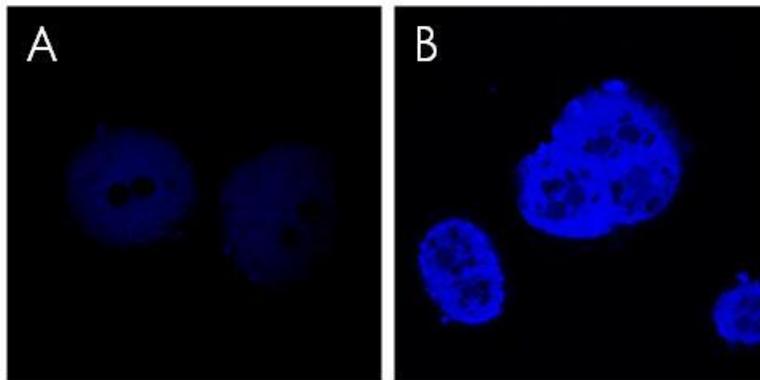


Figura 2. Inmunofluorescencia para la detección del colesterol en hepatocitos. A) Hepatocitos de ratones alimentados con la dieta chow. B) Hepatocitos de ratones alimentados con la dieta hipercolesterolémica. Las células fueron fijadas y tratadas con filipina como se indica en material y métodos. Aumento original 200X. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

La dieta hipercolesterolémica favorece la lipogénesis.

Previamente Marí et al. reportaron que ratas sometidas a la dieta HC desarrollan esteatosis hepática, con la finalidad de determinar si los ratones presentan el mismo efecto realizamos una tinción con aceite rojo O (ORO) el cual se muestra en las figuras 4A y 4B. El tejido hepático proveniente de los ratones alimentados con la dieta HC presentaron una esteatosis microvesicular (Figura 4B) en comparación con el tejido de ratones alimentados con la dieta control o chow (Figura 4A). Para explicar el incremento en la producción de lípidos realizamos un Western blot de la proteína SREBP1, factor de transcripción con actividades lipogénicas. La figura 4C muestra que los ratones HC presentan una sobreactivación de SREBP1 (6.5 ± 0.9 veces con respecto al chow) relacionándose con el aumento en el contenido de lípidos.

La dieta hipercolesterolémica afecta la regeneración hepática.

Con la finalidad de conocer el impacto que tiene la sobrecarga de colesterol en la regeneración hepática se realizó una serie de hepatectomías parciales removiendo dos terceras partes del hígado en ratones sometidos a la dieta HC. Los ratones fueron sacrificados a los días 1, 3, 7, 10 y 15 posterior al proceso quirúrgico. La figura 5 muestra el aspecto general del hígado entre los ratones chow y HC, destacando la coloración del órgano tornándose pálido en los ratones HC debido a la esteatosis generada por la dieta, mientras que los chow presentan el color característico de un hígado sano. Los ratones HC a partir del día 7 muestran un hígado de mayor tamaño en comparación con los ratones Chow, llegando a doblar el tamaño al día 15. La tabla 2 presenta el peso total y

del hígado a los días de sacrificio, mostrando que los ratones chow van incrementando el cociente peso del hígado entre el peso corporal al paso de los días llegando a los niveles del NT, sin embargo en los ratones HC el cociente se observa incrementado significativamente a partir del día 7 alcanzando aproximadamente el doble de tamaño al día 15.

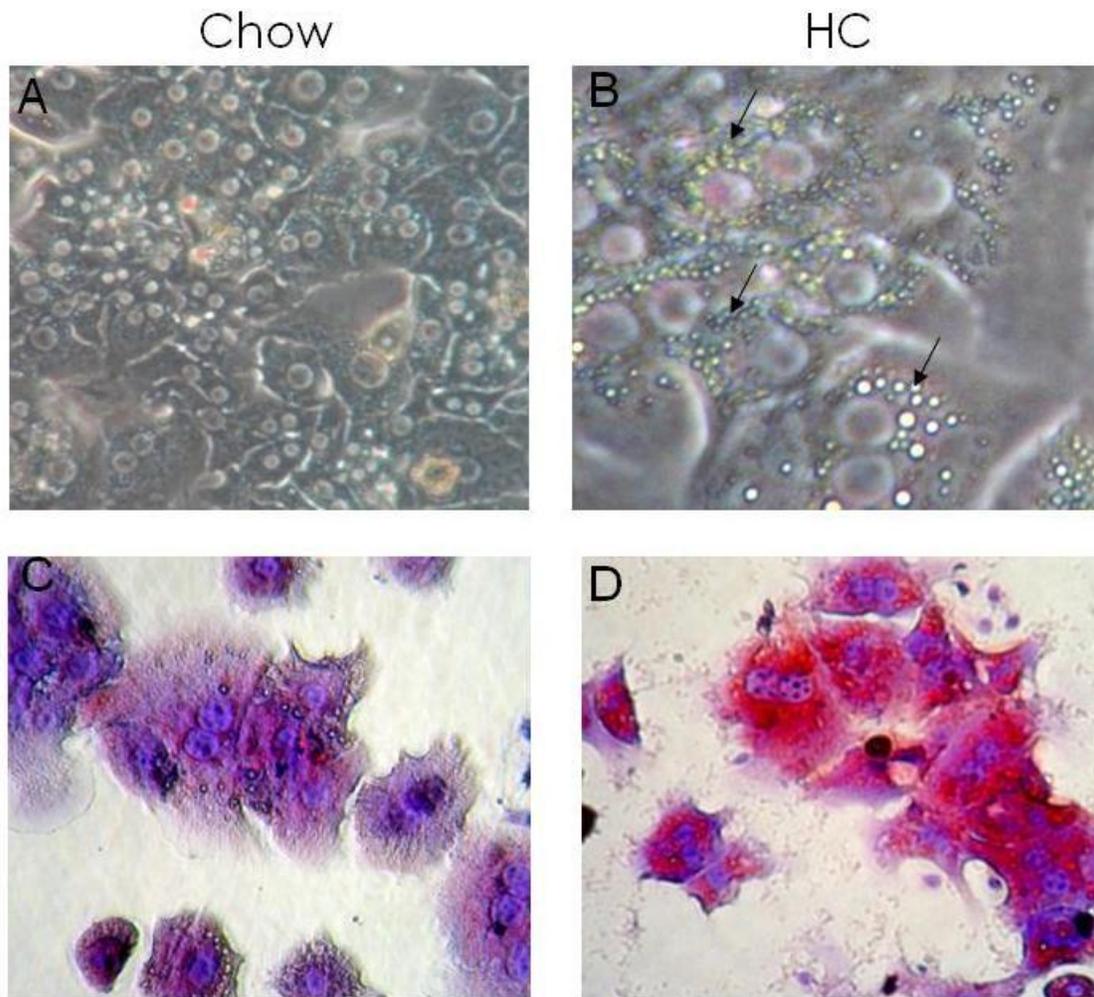


Figura 3. Esteatosis en hepatocitos en cultivo primario. Microscopía en campo claro A) Hepatocitos de ratones con la dieta chow B) Hepatocitos de ratones con la dieta HC. Tinción con aceite rojo O, C) Hepatocitos de ratones con la dieta chow. D) Hepatocitos de ratones con la dieta HC. Aumento original 200X. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

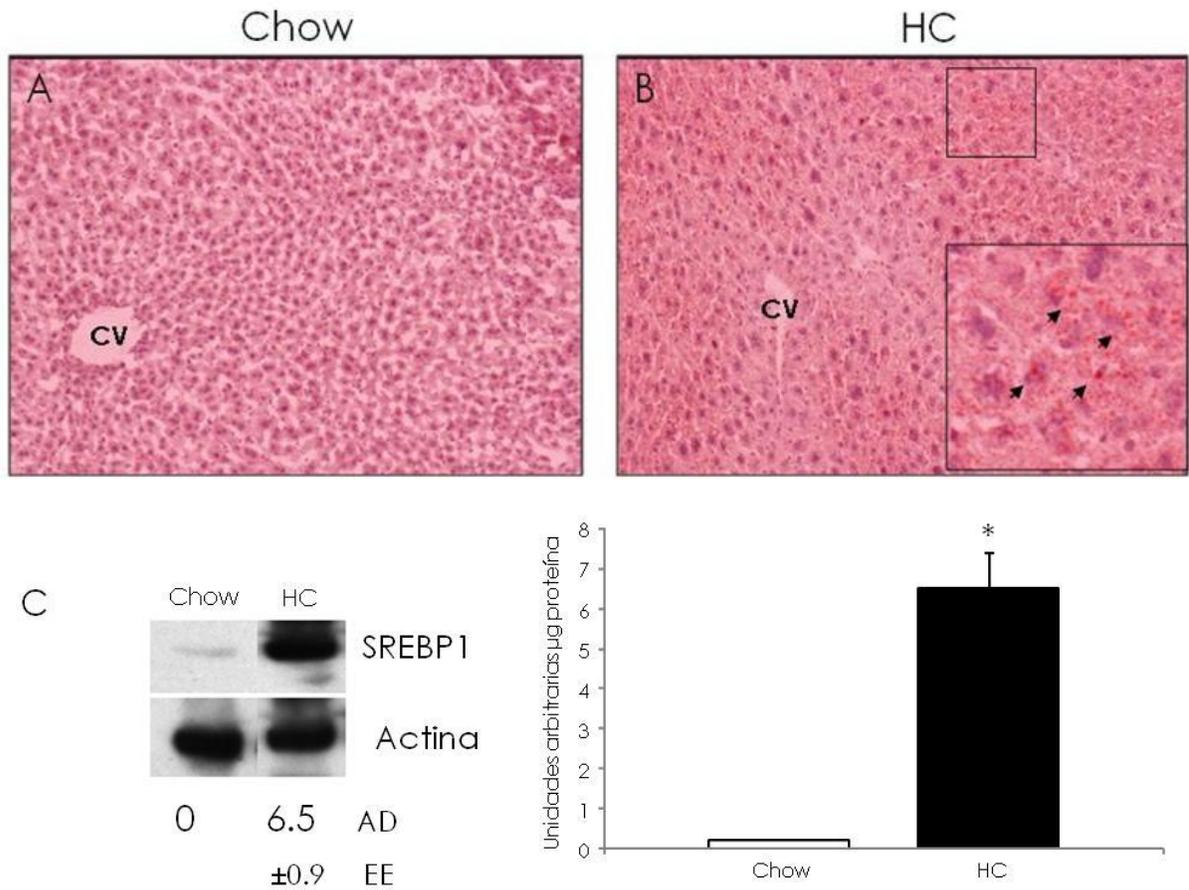


Figura 4. Esteatosis en tejido hepático. Cortes histológicos de A) hígados de ratones chow y, B) hígados de ratones alimentados con dieta HC, fueron procesados por medio de la técnica de aceite rojo O para detectar lípidos. Aumento original 200X. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. C) Imagen representativa del análisis por Western blot de la activación del factor de transcripción SREBP1 en hepatocitos chow y HC. Las columnas representan el promedio densitométrico de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs chow.

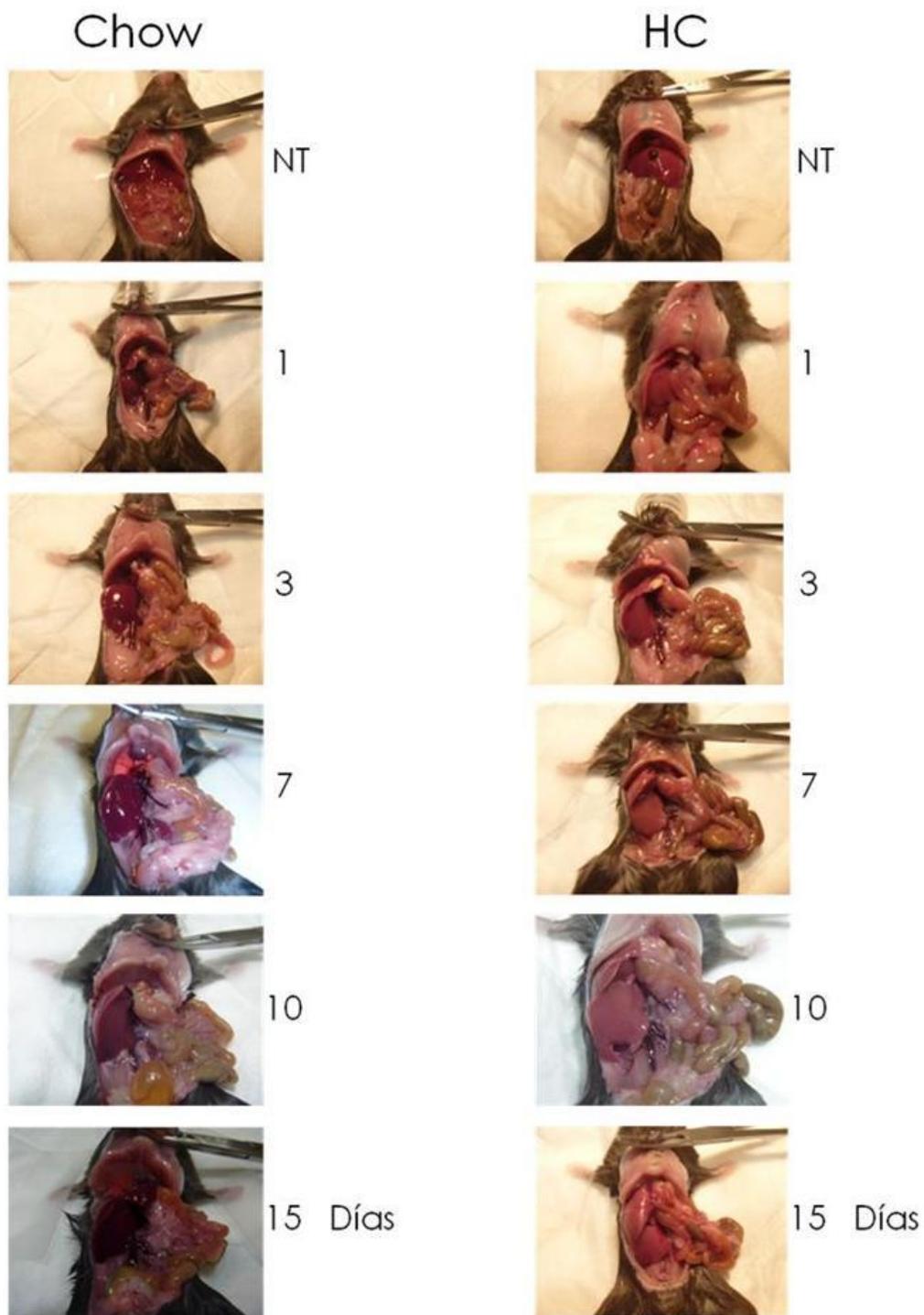


Figura 5. Estado macroscópico de los hígados en regeneración. Las imágenes son representativas de 3 procedimientos llevados a cabo de manera independiente.

	Días	Peso corporal	Peso Hígado	Cociente Total/hígado	EE
Chow	sham	22.19	1.08	4.86	0.547
	1	21.39	0.76	3.57	0.300*
	3	19.26	0.76	3.92	0.136
	7	22.98	0.90	3.90	0.559
	10	21.67	1.04	4.81	0.187
	15	24.06	1.18	4.91	0.440
HC	sham	21.07	1.02	4.6	0.469
	1	20.41	0.77	3.78	0.135
	3	20.50	0.92	4.46	0.931
	7	19.91	1.42	7.15	0.373 &#
	10	19.28	1.31	6.81	0.099 &#
	15	20.78	1.75	8.47	0.551 &#

Tabla 2. Valores del peso corporal, del hígado y cociente de ambos valores en los ratones sometidos a la hepatectomía parcial. Los ratones fueron pesados, sacrificados y el hígado se extrajo para ser pesado. Los valores muestran el promedio \pm el error estándar (EE) de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratón chow sham. & $p \leq 0.05$ vs ratón HC sham. # $p \leq$ vs ratón chow al mismo día de hepatectomía.

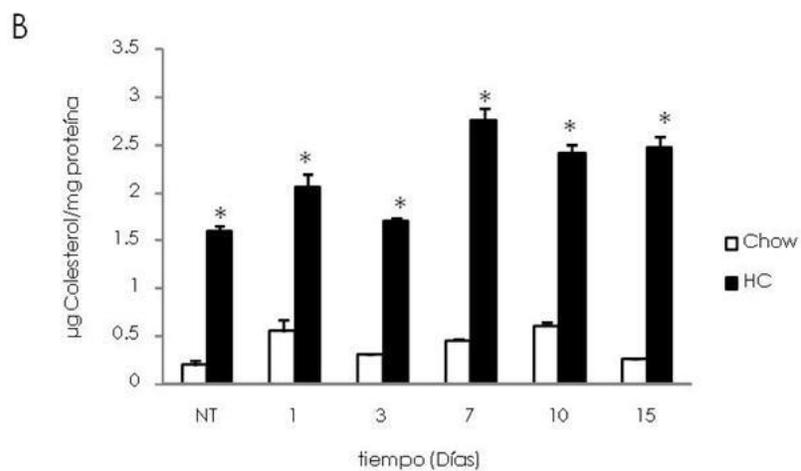
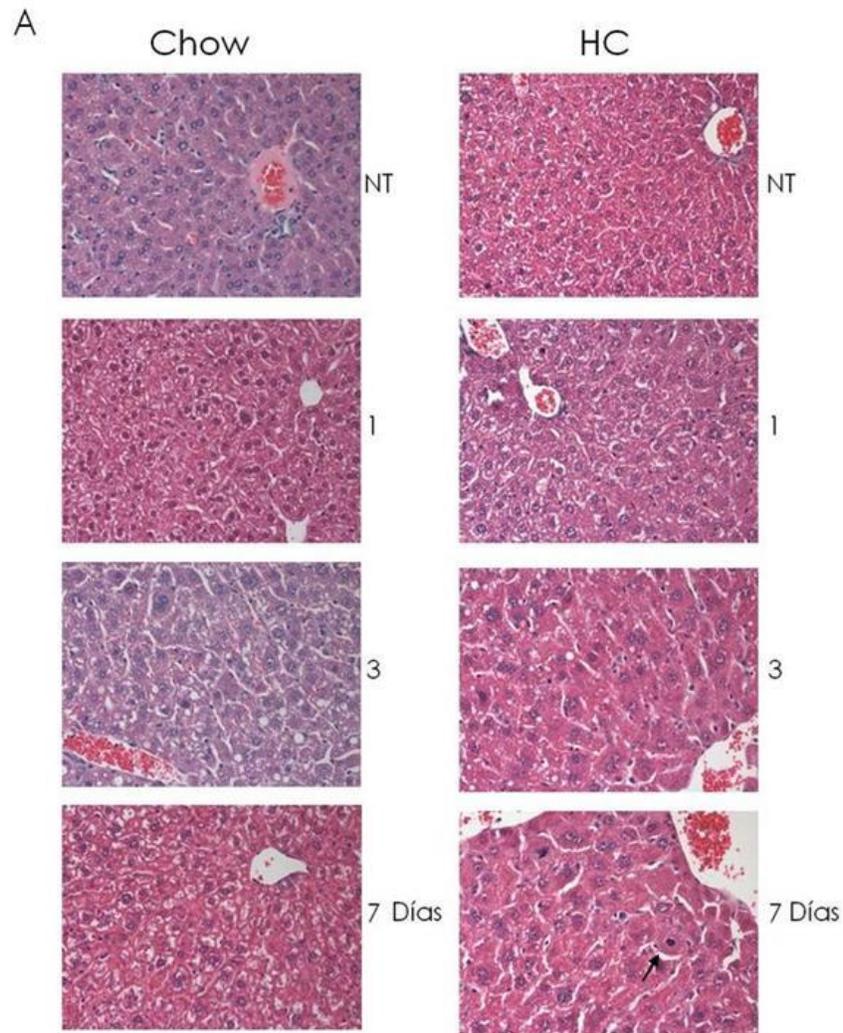


Figura 6. Aspecto histológico del tejido en regeneración. A) Cortes histológicos de los hígados en regeneración fueron teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina. B) Cuantificación de colesterol total en el tejido de las hepatectomías. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

La esteatosis inducida por la dieta HC afecta el ciclo celular

Con base a los resultados previos a continuación el interés fue investigar el efecto de la dieta HC en la expresión de proteínas del ciclo celular. Se realizó una serie de Western blots de proteínas que regulan de manera positiva el ciclo celular como ciclina D1, ciclina A, cdk2, cdk4, cdk6, y el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), así como de los inhibidores del mismo, como p21 y p27.

Los datos expuestos en la figura 7 revelan los cambios en los reguladores de la fase G1/S, los ratones HC muestran una disminución en las proteínas catalíticas como cdk4 y cdk6, al igual que en la reguladora ciclina D1 a partir del tercer día de la hepatectomía, esto se relacionó además a un incremento en la expresión de p27 al día uno de la cirugía. Todo esto se ve reflejado en la disminución en la expresión de PCNA al tercer día. Los ratones chow siguieron un patrón normal en términos de progresión del ciclo celular

En relación a los reguladores de la fase S/G2 la figura 8 muestra un incremento en la expresión de cdk2 a partir del primer día que se relacionó con la expresión de ciclina A y la disminución en la expresión de p21, lo cual sugiere que la maquinaria de progresión de esta etapa se encuentra eficientemente expresada.

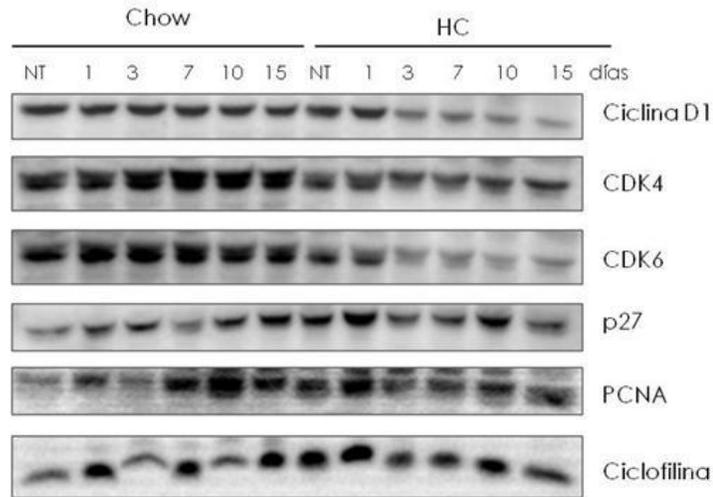
Proliferación de células ovas

Nuestros datos sugieren un arresto del ciclo celular, particularmente de los hepatocitos, por lo que decidimos investigar la posible participación de células

progenitoras hepáticas en la regeneración en los hígados HC. Se realizó el análisis en la expresión de marcadores de células progenitoras hepáticas o células ovales por medio de Western blot (Figura 9), el resultado mostró que la CK 19 y EpCam se encuentran incrementadas incluso en los ratones que no fueron sometidos a la hepatectomía parcial pero que si recibieron la dieta HC, los marcadores de células ovales se incrementaron a lo largo del proceso de regeneración llegando incluso a valores máximos al día 15, mientras que en los ratones chow se mantuvo en valores similares a los ratones control. Este resultado sugiere que la dieta HC induce por si misma la proliferación de células ovales y que la hepatectomía incrementa la proliferación de éste tipo celular juzgado por el contenido en CK19 y EpCam.

Datos previos de nuestro grupo de investigación sugieren que uno de los mecanismos adaptativos que puede originar la dieta es el incremento en ductulos biliares, los cuales están formados principalmente por colangiocitos los cuales derivan también de células ovales, esta respuesta tendiente a eliminar un incremento en la producción de ácidos biliares totales (ABT) que pueden estar generados por la dieta HC. Con la finalidad de corroborar lo anterior se decidió medirlos empleando un estuche comercial de Diazyme. La figura 9B muestra que los ratones HC presentan un incremento de 14 veces el valor de ABT de los ratones chow, el resultado comprueba que existe una acumulación de ABT los cuales presentan igualmente un efecto citotóxico en el hígado y puede explicar el efecto bifásico observado en el contenido de EpCam en los ratones HC.

A



B

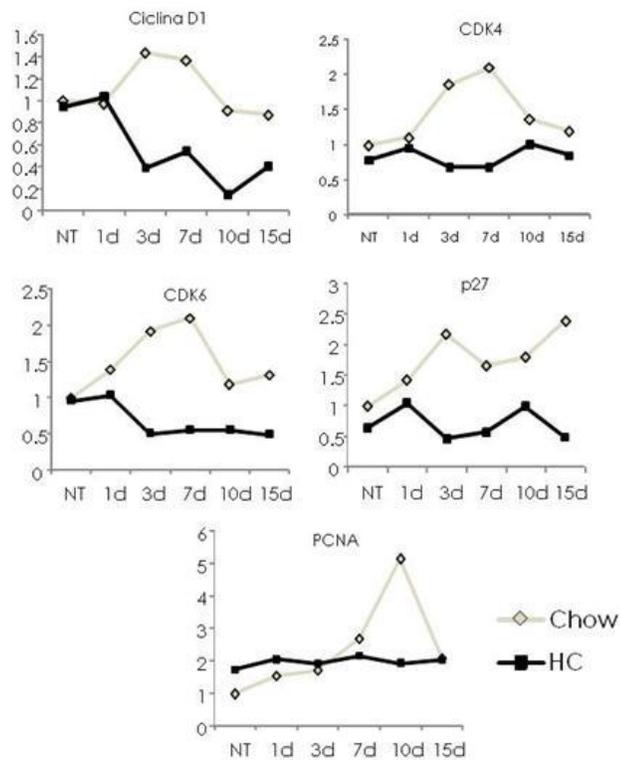


Figura 7. Efecto de la dieta hipercolesterolémica en los niveles de expresión de las proteínas que regulan el ciclo celular en la fase G1/S. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático y se llevó a cabo el análisis por Western Blot de ratones alimentados con dieta chow y dieta HC durante los tiempos especificados. A) Imágenes representativas de Ciclina D1, CDK4, CDK6, p27 y PCNA. B) Densitometría de los Western blots.

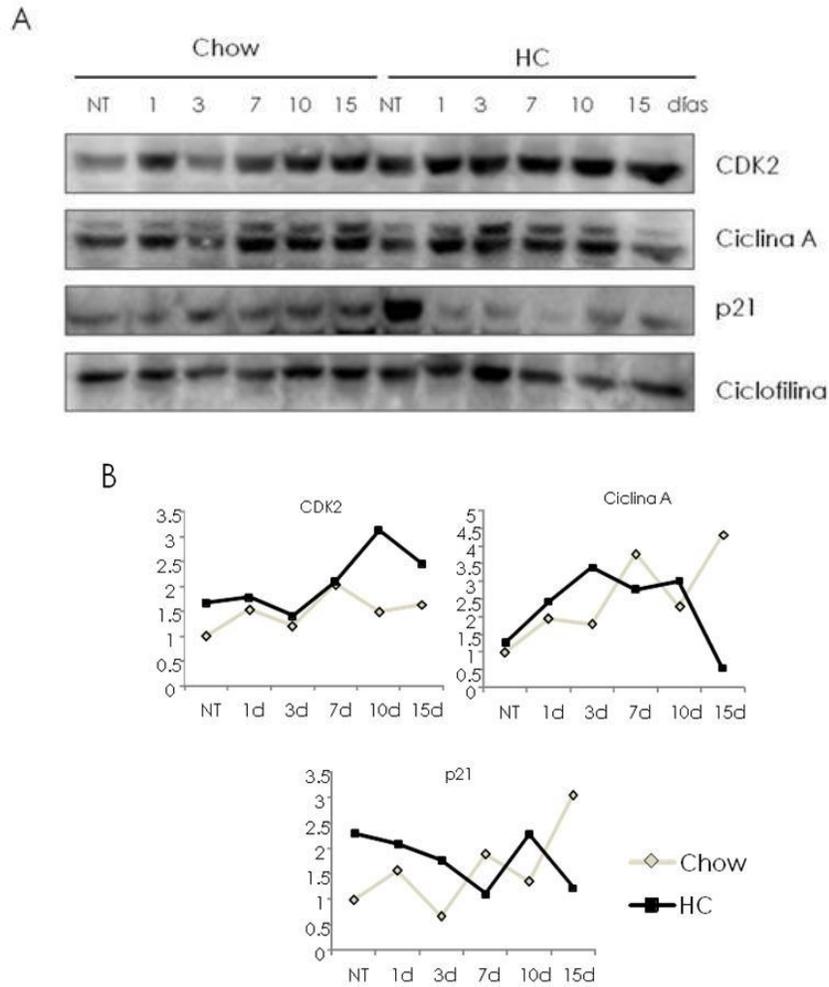


Figura 8. Efecto de la dieta hipercolesterolémica en los niveles de expresión de las proteínas que regulan el ciclo celular en la fase S/G2. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático y se llevó a cabo el análisis por Western Blot de ratones alimentados con dieta chow y dieta HC durante los tiempos especificados. A) Imágenes representativas de Ciclina A, CDK2 y p21. B) Densitometría de los Western blots.

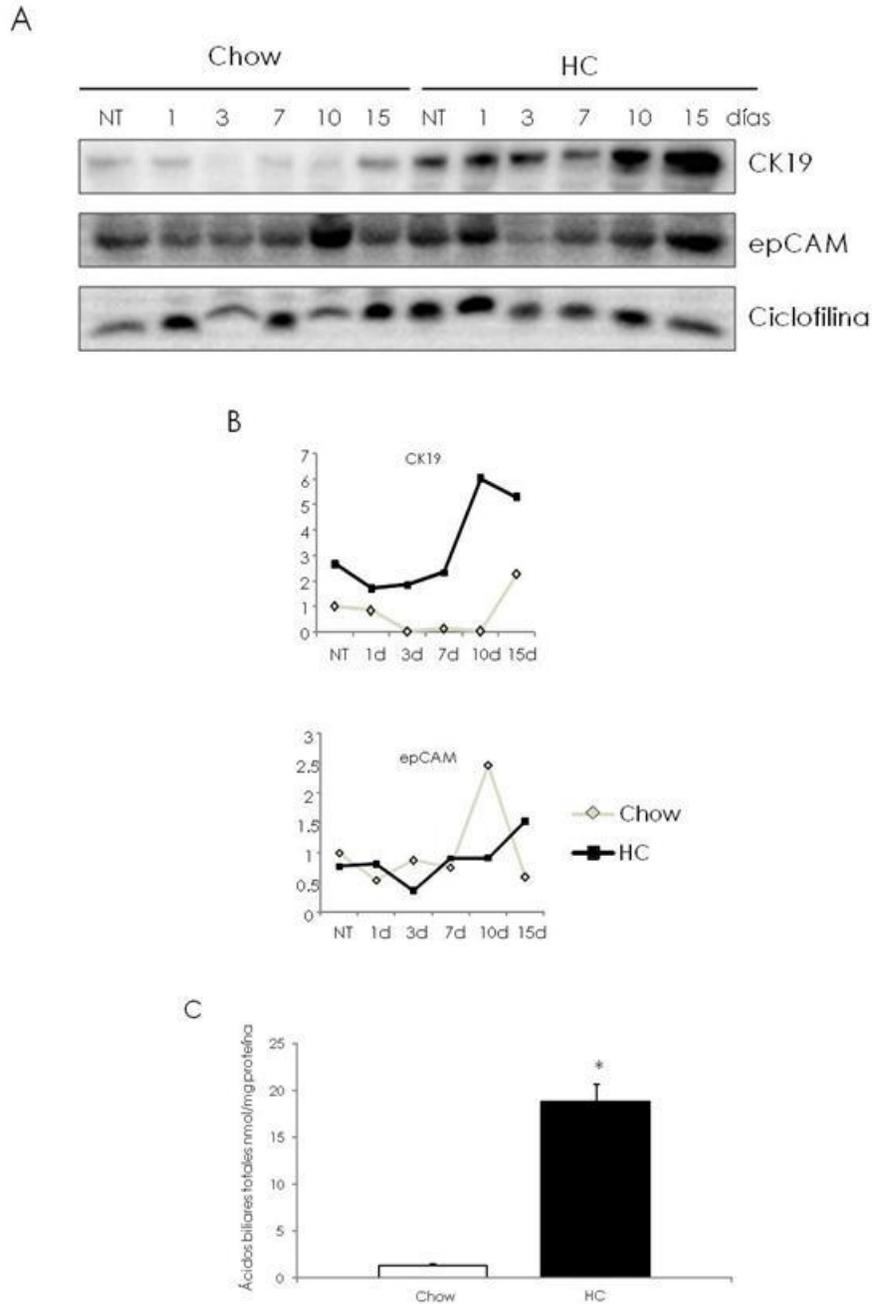


Figura 9. Efecto de la dieta hipercolesterolémica en la expresión de marcadores de células progenitoras. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático y se llevó a cabo el análisis por Western blot de ratones alimentados con dieta chow y dieta HC. A) Imágenes representativas de los Western blots de Ck19 y EpCAM. B) Densitometría de los Western blots. C) Determinación de ácidos biliares totales en el hígado. Las columnas representan el promedio de tres determinaciones de muestras independientes y llevadas a cabo por triplicado \pm EE. * $p \leq 0.05$ vs chow.

La dieta hipercolesterolémica induce una hipertrofia en los hepatocitos.

Con la finalidad de determinar que el incremento en el cociente del peso del hígado y el peso corporal observado por arriba del día 7 se debe a una hipertrofia de las células parenquimatosas y no a una continuación de la hiperplasia decidimos medir el tamaño de los hepatocitos en las histologías teñidas con hematoxilina y Eosina. Se midieron 20 hepatocitos por campo empleando el analizador de imágenes Image J (NIH, Bethesda MD). En la figura 10B se puede observar un incremento en el tamaño de los hepatocitos HC representando 1.94 veces el tamaño del hepatocito chow. El resultado sugiere que el incremento en el tejido hepático mostrado en la tabla 2 se debe a una hipertrofia celular, seguramente para poder compensar los requerimientos metabólicos necesarios para contrarrestar el incremento en los lípidos y el colesterol.

Efecto del HGF en hepatocitos de ratones HC

Partiendo de que el HGF es uno de los principales factores de crecimiento involucrados en la regeneración hepática, se realizaron una serie de experimentos tendientes a conocer la respuesta del HGF en los hepatocitos HC.

Primero decidimos estudiar si el HGF pudiera estar afectando el contenido de colesterol en hepatocitos de ratones HC, realizamos un estudio por microscopía confocal en hepatocitos de ratones HC y chow que fueron tratados con filipina la cual permite identificar el colesterol libre en las células. La figura 11 muestra que el HGF no induce cambio alguno en el contenido de colesterol,

dejando claro que al menos en la movilización del colesterol de la célula el HGF no presentó ningún efecto.

Posteriormente determinamos la activación de c-Met como respuesta a los tratamientos con HGF a diferentes tiempos. La figura 12 presenta un Western blot de c-Met fosforilado en la tirosina 1349, como se puede apreciar en los hepatocitos chow la activación del receptor se da a los tiempos cortos, teniendo un pico máximo al minuto y se desactiva a los 5 min permaneciendo inactivo a los 30 min. En el caso de los hepatocitos HC la activación se da a los 5 min bajando la respuesta a los 15 min. El resultado sugiere un retardo en la activación de c-Met y una respuesta corta lo cual pudiera impactar en el proceso de reparación mediado por HGF.

Finalmente para determinar si el proceso de reparación inducida por el HGF se ve afectada por la dieta HC realizamos un experimento de daño-cicatriz en hepatocitos de animales chow y HC el cual se muestra en la figura 13. El HGF indujo una respuesta reparadora en células chow, juzgada por la migración de hepatocitos a la zona de daño, efecto que no se observó en los hepatocitos HC; el resultado sugiere que el proceso de reparación del HGF en los hepatocitos HC está afectado y se relaciona con la activación tardía de c-Met y por el arresto en fase G1/S observado en las hepatectomías de los animales HC.

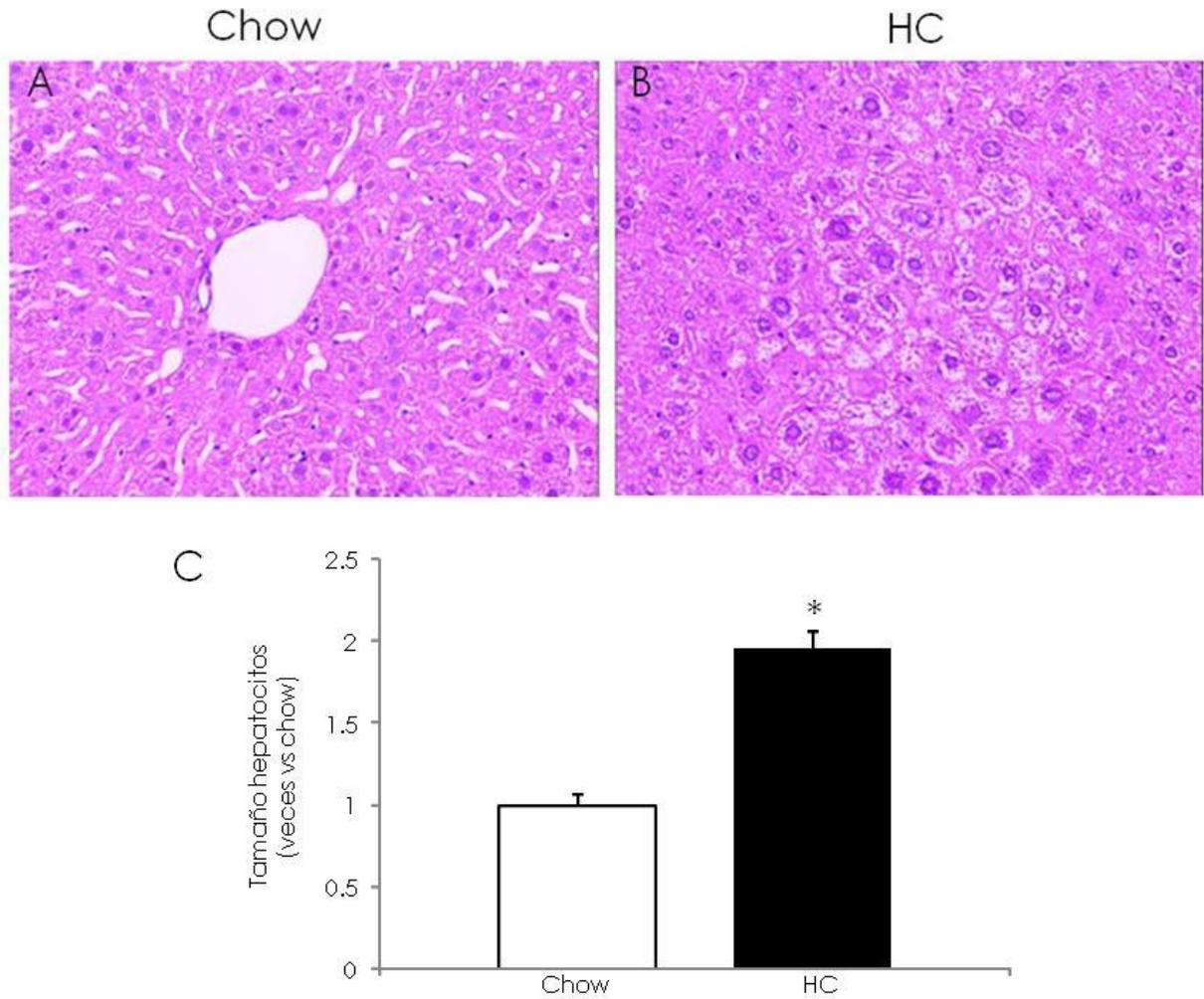


Figura 10. La dieta hipercolesterolémica induce una hipertrofia en hepatocitos. Cortes histológico de hígados de ratón alimentado con dieta A) Chow, B) HC. Aumento original 200X. C) Determinación del promedio en el tamaño de de los hepatocitos. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. Las columnas representan el promedio \pm EE. $p \leq 0.05$ vs chow.

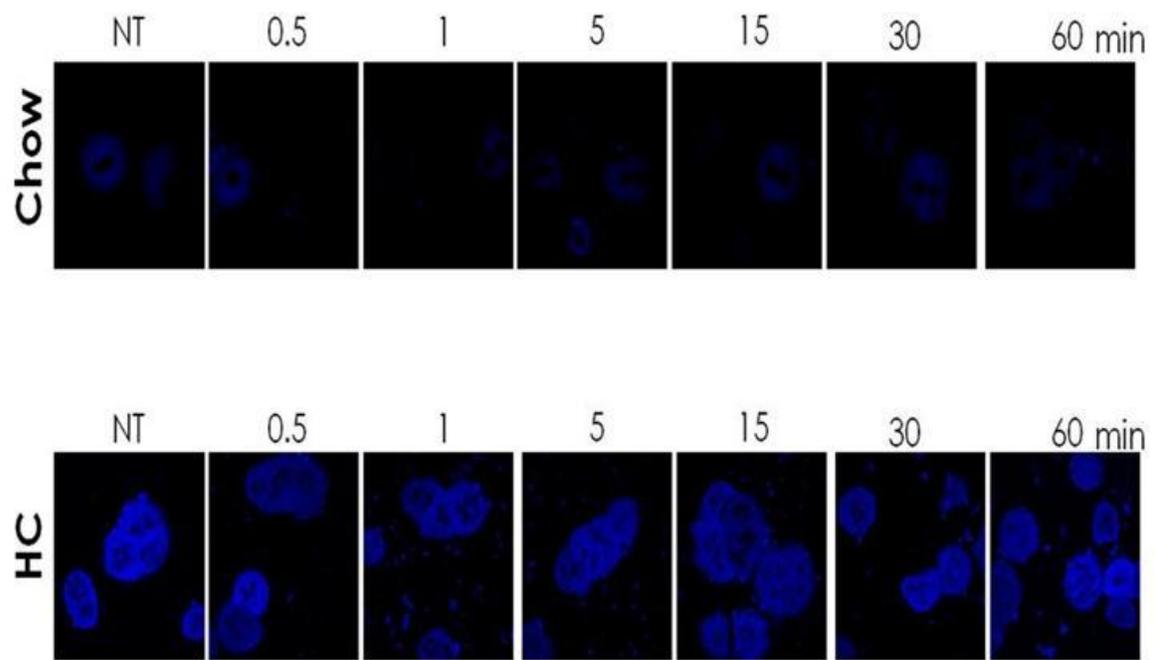


Figura 11. Detección del Colesterol libre por Filipina. Las células se trataron con 50ng/ml de HGF durante los tiempos especificados. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss Axioskop). Aumento original 200X. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

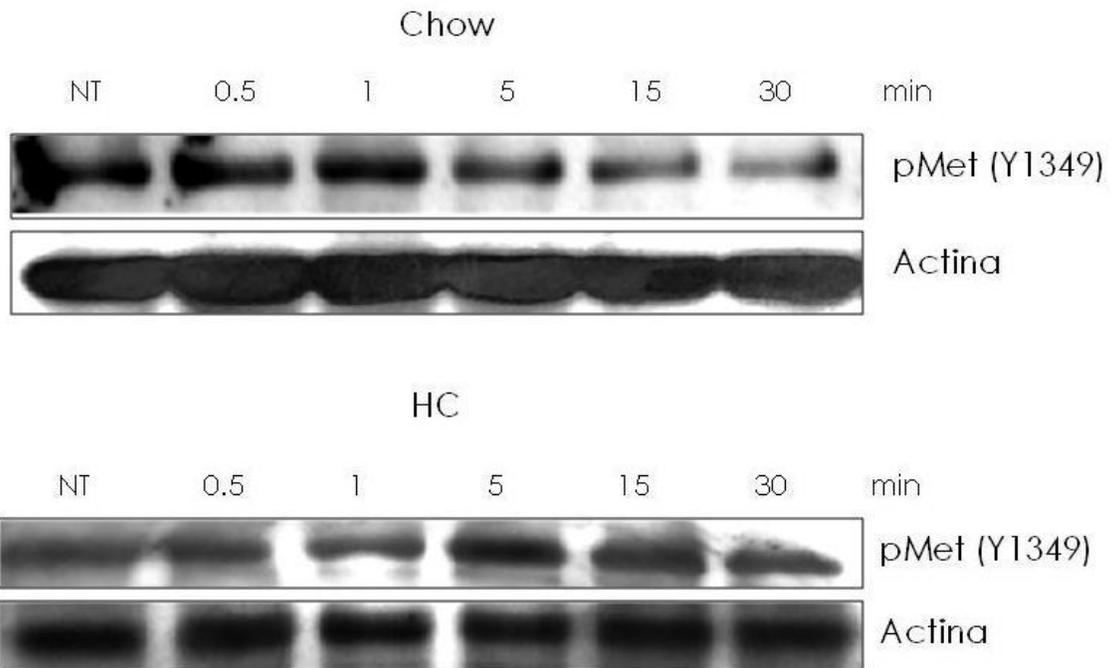


Figura 12. Activación de c-Met en hepatocitos de ratones chow y HC. Se aisló proteína total a partir de hepatocitos de ratón y se llevó a cabo el análisis por Western blot de ratones alimentados con dieta chow y dieta HC durante los tiempos especificados. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes llevado a cabo por triplicado.

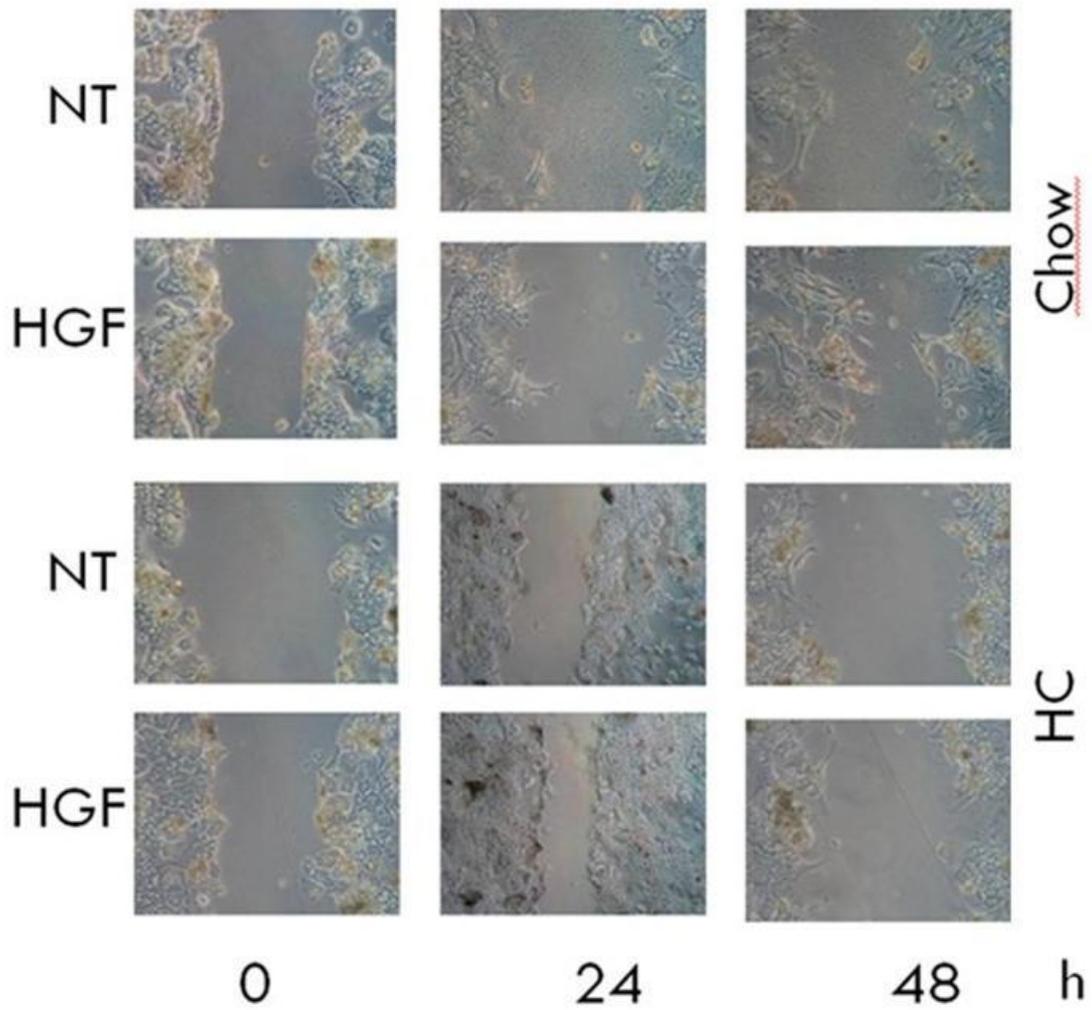


Figura 13. Ensayo de herida-cicatrización en hepatocitos chow y HC en cultivo primario. Las células se rasparon y posteriormente fueron tratadas con 50ng/ml de HGF durante los tiempos especificados. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una enfermedad crónica del hígado que afecta a una alta proporción de la población mundial.

La acumulación hepática de lípidos resulta de un desequilibrio entre la disponibilidad de los lípidos (captación de lípidos de la circulación y/o lipogénesis) y la eliminación de ellos a través de la oxidación de ácidos grasos o de su secreción por lipoproteínas ricas en triglicéridos como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Este desbalance, según se ha reportado, desencadena estrés oxidante y daño hepático (Musso et al. 2009; Angulo & K. D. Lindor 2002).

El grupo del doctor Fernández-Checa reportó, empleando la misma dieta que en este trabajo, observó que la acumulación de ácidos grasos libres, triglicéridos y colesterol pueden coexistir en la esteatosis hepática y que el daño hepático está en función del tipo de lípido incrementado, más que por la cantidad de grasa depositada en los hepatocitos, siendo el colesterol el que juega el papel más relevante (Marí et al. 2006).

El hígado posee una excelente capacidad regenerativa tras un daño causado por agentes químicos, como el etanol, agentes virales o por la resección parcial del órgano o hepatectomía parcial (Mangnall et al. 2003). En el presente estudio decidimos investigar si la dieta HC afecta la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial. Primero decidimos corroborar la sobrecarga de

colesterol tanto en el tejido de animales alimentados dos días con la dieta HC como en animales con la dieta chow, la figura 1 muestra que efectivamente el hígado acumuló significativamente colesterol, al igual que los hepatocitos aislados de éstos animales (figura 2).

Además del incremento de colesterol encontramos que el tejido hepático y los hepatocitos aumentaron la cantidad de ácidos grasos (figura 3 y 4), posiblemente como un proceso compensatorio ante el aumento de colesterol.

Un evento central en la acumulación de ácidos grasos en el tejido hepático es la activación de la proteína de unión al elemento regulatorio de esterol (SREBP), este factor de transcripción permanece inactivado en el retículo endoplásmico, después de un estímulo migra a Golgi donde es procesado para arribar finalmente al núcleo donde promueve la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (Ferré & Foufelle 2010).

Nuestros datos confirman que la dieta HC indujo la síntesis de lípidos como lo muestra la figura 4B, fenómenos que fueron relacionados con la sobreactivación de SREBP1 (6.5 veces con respecto al chow, figura 4C). Estos resultados sugieren fuertemente que la esteatosis desarrollada en los animales HC puede deberse a un mecanismo compensatorio tendiente a eliminar el colesterol del hígado.

Un incremento en el contenido de colesterol hepático genera la activación del receptor X hepático (LXR) que a su vez permite la expresión y activación de SREBP1 y por lo tanto de sus genes blanco los cuales están compuestos en su

mayoría por proteínas relacionadas con la síntesis de ácidos grasos los cuales son requeridos para el ensamblaje de VLDL(Cha & Repa 2007).

Sin embargo se ha observado que pacientes con hígado graso presentan una disminución en la producción de VLDL debido a una deficiente síntesis de apolipoproteína B, principal lipoproteína constitutiva de las VLDL lo que lleva a una acumulación de grasa en el órgano(Charlton et al. 2002).

Los datos presentados hasta este momento muestran claramente que la dieta HC induce un incremento en el contenido de colesterol en el tejido hepático, particularmente en el hepatocito, así mismo generó la activación del factor de transcripción SREBP1 que se asoció a un incremento en la lipogénesis, todo esto nos llevó a considerar el efecto del desbalance en el metabolismo lipídico en la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial.

La regeneración hepática después de una hepatectomía parcial se presenta como un proceso multifactorial que comienza con cambios en la expresión génica tendientes a promover la entrada de los hepatocitos quiescentes (etapa G0) al ciclo celular(Webber et al. 1994). Se sabe que las cinasas dependientes de ciclinas (cdks) y sus reguladores asociados (ciclinas) son las que juegan un papel central en el control de la progresión del ciclo a través de puntos de control durante el proceso. Se ha demostrado que las ciclinas tipo D en asociación con cdk2, cdk4 o cdk6, juegan un papel fundamental durante la progresión de la etapa G1(Pascal Loyer, Ilyin, et al. 1996), siendo la ciclina D1(CD1) el marcador más confiable de hepatocitos en proliferación tanto *in vivo* e *in vitro*(Albrecht & Hansen 1999). Se he reportado ampliamente que los

hepatocitos que expresan el complejo CD1/cdk4 han pasado el punto de restricción G1 y han pasado a la transición G1/S (P Loyer, S Cariou, et al. 1996), por lo que una correcta expresión de ésta ciclina y las correspondientes unidades catalíticas indican una progresión en el ciclo celular.

Nuestros datos señalan que en los ratones chow tanto la ciclina D1 como cdk4 y cdk6 se mantienen expresadas durante el proceso de reparación (figura 7), en cambio en los ratones HC presentan una disminución importante al día 3 en la ciclina D1 y en cdk6, mientras que cdk 4 permanece sin cambios y el inhibidor de la etapa, la proteína p27 disminuye su expresión al día 3 y 7 y se incrementa al día 10.

Albrecht y colaboradores (1999) reportaron que la ciclina D1 es fundamental para la progresión a través de la etapa G1 en los hepatocitos y que de ella depende la expresión de PCNA, y la activación de las ciclinas A y E. Nuestros datos guardan la misma relación con lo reportado previamente, los hepatocitos HC mostraron una disminución en la expresión no solo de la ciclina D1, si no también en cdk 6, y un incremento en el inhibidor p27, confirmando problemas en la progresión en G1.

A medida que las células entran en la fase S el complejo de la ciclina A/cdk2 es necesario para la duplicación del ADN(Mangnall et al. 2003; Pascal Loyer, Ilyin, et al. 1996; Albrecht & Hansen 1999). Por lo tanto, en nuestros experimentos se puede apreciar que para los ratones alimentados con la dieta chow, la ciclina A y cdk2 se encuentran expresadas indicando la progresión en la etapa S. Los ratones alimentados con una dieta HC presentan igualmente un

patrón similar en ciclina A y cdk2, sin embargo, es de destacar que cdk2 presenta una sobreexpresión, sugiriendo la posibilidad de que sea cdk2 quien pueda promover la progresión en el ciclo celular como un efecto compensatorio.

La cinasa cdk2, si bien se sabe que forma complejos con la ciclina A y la E, también es capaz de regular a la ciclina D1 induciendo proliferación y sobrevivencia en los hepatocitos, según lo ha reportado recientemente por Hanse y colaboradores (2009).

La actividad de los complejos ciclina/cdk esta negativamente regulada por las proteínas inhibitorias de cdk (CKIs), dentro de las cuales, p21 y p27 han sido las más estudiadas (Albrecht et al. 1998). Nuestros datos muestran que en ratones chow, p27 no disminuye durante la regeneración hepática, lo cual sugiere que puede estar interactuando con varios complejos ciclina/cdk durante la progresión del ciclo celular, además de estar actuando como inhibidor antes y después de la fase de replicación en la regeneración del hígado, tal como indican estudios previos reportados por Albrecht y colaboradores (1998). Sin embargo, en los ratones HC p27 disminuye con el paso del tiempo, lo cual podría sugerir que no se está inhibiendo al complejo ciclina A/CDK2, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para estas proteínas, debido a que se encuentran aumentadas.

Los hepatocitos progresan a través de la fase G1 con mayor rapidez en ausencia de p21, lo que sugiere que la modulación de G1 a través de la actividad del complejo ciclina/cdk regulado por p21, es un factor determinante

en la fase de replicación de la regeneración del hígado como ha sido previamente sugerido (Albrecht et al. 1998).

Se ha reportado en hígados de roedores y de humanos la acumulación de células ovals (progenitoras hepáticas de colangiocitos y hepatocitos), después que han sido dañados por agentes tóxicos, principalmente por alcohol, toxinas y acumulación de lípidos (S. Yang et al. 2004).

De hecho Mari y colaboradores (2004) demostraron fehacientemente que la sobrecarga de colesterol en el hígado inducido por la dieta HC promueve la sensibilización ante estímulos citotóxicos mediados por TNF- α o Fas, sobre todo por el involucramiento de una disfunción mitocondrial y por el incremento en el estado oxidante de éste organelo por la disminución de los niveles de GSH. De esta forma el modelo de esteatosis presentado en la presente tesis podría estar generando una deficiente proliferación de hepatocitos adultos posiblemente por la disfunción mitocondrial que se ha reportado previamente.

Con la finalidad de comprobar la proliferación de células ovals decidimos realizar una serie de Western blots de dos marcadores de éste tipo celular, la citokeratina 19 y EpCam, en ambos casos encontramos una señal positiva en los ratones sham HC, mientras que la CK19 se fue incrementando en los animales HC los ratones chow solo presentaron una muy baja expresión al día 15 (figura 9), por otro lado, EpCam no mostró cambio a lo largo del tiempo salvo en el día 10 que se elevó notablemente seguramente como una respuesta a la necesidad de generar más células ductales como respuesta a la sobrecarga de colesterol el cual puede ser eliminado como ácidos biliares vía ductos biliares, mientras que en

los ratones HC EpCam se elevó al día uno, disminuyendo al día 3 y 7 e incrementándose nuevamente a los días 10 y 15. Este efecto bifásico puede sugerir una primera ronda en la proliferación de células ovales tendientes a dirigir la diferenciación a hepatocitos, mientras que la segunda ronda, iniciada al día 10, pueda estar enfocada a la diferenciación de colangiocitos con la finalidad de eliminar el colesterol vía ductos biliares. Es decir, se puede considerar un efecto adaptativo del hígado dirigido a eliminar el exceso de colesterol como sales biliares. De hecho cuando medimos la cantidad de ácidos biliares totales en tejido hepático los ratones HC mostraron un incremento significativo con respecto a los ratones chow, la presencia de ABT puede representar también una señal tóxica que afecte la progresión normal del ciclo celular en los hepatocitos adultos.

El efecto observado en el cociente del peso del hígado y corporal (tabla 2) sugiere un crecimiento, prácticamente al doble, del órgano, sin embargo el ciclo celular parece estarse deteniendo por arriba del día 7. Con la finalidad de determinar si la hiperplasia compensatoria inducida por la hepatectomía parcial podría ser seguida de una hipertrofia de las células hepática decidimos determinar el tamaño de los hepatocitos de los animales HC, la figura 10 muestra que efectivamente el hepatocito HC presenta casi 2 veces el tamaño promedio de un hepatocito chow, dejando claro que el incremento del tejido hepático mostrado en la tabla 2 se debe a una hipertrofia y no a una hiperplasia.

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es el principal promotor de la regeneración y reparación hepática, se ha observado que los niveles de HGF

se elevan de 10 a 20 veces después de una hepatectomía parcial (Lindros et al. 1991) teniendo como principal objetivo inducir un efecto mitogénico en hepatocitos (Block et al. 1996). De hecho la administración de HGF en la circulación portal de ratones normales induce el crecimiento hepático por la proliferación de hepatocitos (Patijn et al. 1998) Por otro lado, ratones con eliminación condicional de c-Met presentan una deficiente reparación tras un insulto hepatotóxico (huh et al 2004) y arresto en la fase G2/M (Factor et al. 2010) mostrando que HGF/c-Met está involucrado en la regulación del ciclo celular no solo en la fase G1/S si no también en la fase de transición de G2/M. Además, se ha visto que la inhibición de c-Met con ARN de interferencia en ratones que han sido sometidos a una hepatectomía parcial bloquean completamente el ciclo celular (Paranjpe et al. 2007).

Por todo lo anterior decidimos estudiar el efecto del HGF en hepatocitos aislados de ratones sometidos a ambas dietas. Primero quisimos determinar si el tratamiento con HGF pudiera estar disminuyendo el contenido de colesterol, como un efecto protector dirigido por el factor de crecimiento. La figura 11 muestra que no hay cambios en términos de fluorescencia generada por la filipina. Sin embargo, cuando estudiamos la activación del receptor c-Met (figura 12) se observa un incremento en la fosforilación del receptor al minuto de tratamiento con HGF en las células chow, mientras, que las células HC presentaron la activación c-Met a los 5 minutos mostrando un retraso en la activación de c-Met. Estos resultados señalan que la sobrecarga de colesterol está afectando la transducción de señales del HGF que puede estar impactando en el proceso de reparación y regeneración hepática. Para corroborar lo anterior

realizamos un estudio de daño-cicatriz en cultivo de hepatocitos tanto en HC como en chow y posteriormente los tratamos con HGF por 24 y 48 horas. La figura 15 muestra que la reparación está impedida casi por completo en las células HC, comprobando que efectivamente la función reparadora de HGF esta afectada en las células HC lo cual se relaciona con lo observado en los estudios de hepatectomía parcial.

CONCLUSIÓN

El hígado tiene una gran capacidad de regeneración y reparación cuando es agredido. Normalmente la reparación del órgano es llevada a cabo por la entrada en el ciclo celular de los hepatocitos adultos, sin embargo cuando esta capacidad proliferativa se ve afectada o detenida las células ovas o progenitoras hepáticas proliferan para posteriormente diferenciarse en hepatocitos y células tubulares biliares que permiten la repoblación del órgano dañado.

Los datos presentados en el presente trabajo dejan claro que una dieta hipercolesterolémica y los efectos que ella causa como el incremento en la síntesis y depósito de grasa en el hígado, colestasis intrahepática, problemas en el ciclo celular con énfasis en la fase G1/S, y una transducción de señales mediada por el HGF alterada, impactan notablemente en el proceso de regeneración tras una hepatectomía parcial.

El trabajo reafirma el impacto que recibe el hígado tras una dieta desbalanceada, sensibilizándolo al daño e induciendo un proceso inadecuado de reparación lo cual lo ubica en un estado de vulnerabilidad tras una segunda agresión causada por agentes químicos como el etanol, infecciones virales o resección parcial del órgano.

REFERENCIAS

- Albrecht, J.H. & Hansen, L.K., 1999. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 10(6), pp.397-404. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392901>.
- Albrecht, J.H. et al., 1998. Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene*, 16(16), pp.2141-50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572495>.
- Angulo, P. & Lindor, K.D., 2002. Non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 17 Suppl, pp.S186-90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998429>.
- Cha, J.-Y. & Repa, J.J., 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The Journal of biological chemistry*, 282(1), pp.743-51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17107947> [Accessed September 22, 2011].
- Charlton, M. et al., 2002. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 35(4), pp.898-904. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11915037> [Accessed September 22, 2011].
- Delgado-Coello, B. et al., 2011. Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, pp.1271-1284. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21745289>.
- Diehl, A.M., 2005. Recent events in alcoholic liver disease V. effects of ethanol on liver regeneration. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, 288(1), p.G1-G6.
- Donnelly, K.L. et al., 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5), pp.1343-1351. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15864352.
- Dorrell, C. & Grompe, M., 2005. Liver repair by intra- and extrahepatic progenitors. *Stem cell reviews*, 1(1), pp.61-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132876>.
- Fabbrini, E. et al., 2008. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2), pp.424-431. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2705923&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Fausto, N, 2000. Liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 32, pp.19-31. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827800804122>.
- Fausto, Nelson & Campbell, J.S., 2003. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of Development*, 120, pp.117-130.
- Fausto, Nelson et al., 2011. present and future. *Hepatology*.
- Fawcett, D.W., 1995. *Tratado de Histología* 12th ed., Madrid: Mc Graw-Hill.
- Ferré, P. & Foufelle, F., 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes, obesity & metabolism*, 12 Suppl 2 (figure 1), pp.83-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029304>.
- Jou, J., Choi, S.S. & Diehl, A.M., 2008. Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Liver*, 28(4), pp.370-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18956293>.
- Longati, P. et al., 1994. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene*, 9(1), pp.49-57.
- Loomba, R. et al., 2009. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), pp.1282-93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2011].
- Loyer, P, Cariou, S, et al., 1996. Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes in vitro. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *The Journal of biological chemistry*, 271(19), pp.11484-92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626707>.
- Loyer, Pascal, Ilyin, G., et al., 1996. Progression through Gland S phases of adult rat hepatocytes. *Apoptosis*.
- Mangnall, D., Bird, N.C. & Majeed, A.W., 2003. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 23(2), pp.124-38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654135>.
- Marí, M. et al., 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metabolism*, 4(3), pp.185-198. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950136>.
- Michalopoulos, G.K., 2007. Liver Regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, (May), pp.286-300.

- Mitchell, C. & Willenbring, H., 2008. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols*, 3(7), pp.1167-70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600221> [Accessed July 13, 2010].
- Musso, G., Gambino, R. & Cassader, M., 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in lipid research*, 48(1), pp.1-26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824034> [Accessed September 3, 2010].
- Papeleu, P. et al., 2006. Isolation of rat hepatocytes. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj*, 320(3), pp.229-237. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16719394>.
- Ponzetto, C. et al., 1994. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*, 77(2), pp.261-271. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513258>.
- Tolosa, L. et al., 2011. Steatotic liver: a suitable source for the isolation of hepatic progenitor cells. *Liver International*, 31(8), pp.1231-1238. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1478-3231.2011.02609.x> [Accessed September 6, 2011].
- Webber, E.M., Godowski, P.J. & Fausto, N, 1994. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 19(2), pp.489-97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8294105>.
- Wu, C.-C. et al., 2007. Tissue birefringence of hypercholesterolemic rat liver measured with polarization-sensitive optical coherence tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 12(6), p.064022. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18163838>.
- Yang, S. et al., 2004. Oval cells compensate for damage and replicative senescence of mature hepatocytes in mice with fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 39(2), pp.403-11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14767993> [Accessed July 7, 2011].

Los miembros del jurado de designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA BAJO UNA DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA" con fecha 30 de septiembre del 2011.

JURADO DE EXAMEN



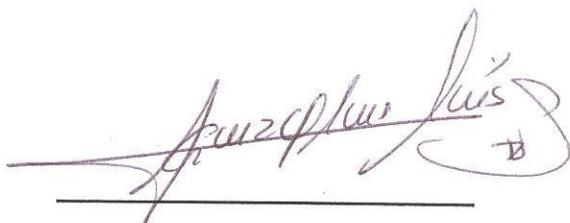
PRESIDENTE

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz



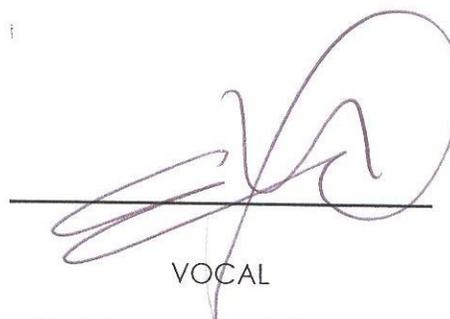
SECRETARIO

Dr. José Carlos Fernández Checa



VOCAL

Dr. José Luis Gómez Olivares



VOCAL

Dr. Eduardo Montalvo Jave