



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITAN**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

---

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE  
HEPATOCITOS (HGF) EN EL ESTADO REDOX CELULAR EN CULTIVO DE  
HEPATOCITOS DE RATÓN ALIMENTADOS CON UNA DIETA  
HIPERCOLESTEROLÉMICA”**

**T E S I S**  
para obtener el grado de  
Maestra en Biología Experimental

**PRESENTA:**  
Biól. Exp. Mayra Domínguez Pérez

Comité Tutoral

*Directora: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.*  
*Asesores: Dr. Armando Luna López*  
*Dra. Ana Ma. Guadalupe Rivas Estilla*

México, D.F., 01 de Diciembre de 2011

---

# COMITÉ TUTORAL

## DIRECTORA

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.  
Departamento de Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana.  
México, D.F  
[mcgr@xanum.uam.mx](mailto:mcgr@xanum.uam.mx)

## ASESOR

Dr. Armando Luna López  
Departamento de Investigación Básica  
Instituto de Geriatria  
México, D.F  
[armando.luna@salud.gob.mx](mailto:armando.luna@salud.gob.mx)

## ASESORA

Dra. Ana Ma. Guadalupe Rivas Estilla  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Monterrey, Nuevo León  
[arivas@fm.uanl.mx](mailto:arivas@fm.uanl.mx)

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, por medio de los proyectos con clave 61544 y 131701).

El programa de la maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa con número de registro (UAM-1:309-1), forma parte del Programa Nacional de Posgrado de Calidad de CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y recibe apoyo por parte del mismo Consejo a través del convenio 309-0, con clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí una beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 233304/289768, en el período 2009-2011.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: ***“EVALUACION DEL EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF) EN EL ESTADO REDOX CELULAR EN CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATÓN ALIMENTADOS CON UNA DIETA HIPERCOLESTEROLEMICA”***, con fecha de examen 01 de Diciembre de 2011.

## **MIEMBROS DEL JURADO**

---

### **PRESIDENTE**

**Dr. Javier Barrios González**  
Departamento de Biotecnología  
Universidad Autónoma Metropolitana  
México, D.F.

---

### **SECRETARIA**

**Dra. Ana Ma. Guadalupe Rivas Estilla**  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Monterrey, Nuevo León

---

### **VOCAL**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana  
México, D.F.

---

### **VOCAL**

**Dr. Armando Luna López**  
Departamento de Investigación Básica  
Instituto de Geriatria  
México, D.F.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi directora de tesis Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz mi profundo agradecimiento y admiración. Gracias por ser un apoyo fundamental para mí como investigadora y persona, por sus sabios consejos en las difíciles decisiones, por su paciencia y esmero en el trabajo realizado y por supuesto por la oportunidad que me dio al formar parte de su grupo de investigación.*

*Al Dr. Luis E. Gómez Quiroz quién me acompañó muy de cerca desde los inicios de este trabajo de investigación, asesorándome, guiándome y teniéndome infinita paciencia ante mi inconsistencia. Gracias por mostrarme y contagiarme su pasión por la investigación.*

*Al Dr. Armando Luna López por su entusiasmo, por sus consejos, por el apoyo y el ánimo que me brindó.*

*A la Dra. Ana Ma. Rivas Estilla por todas las correcciones, sugerencias y consejos que me dio para esta tesis.*

*Al Dr. Javier Barrios González por ser parte de jurado de examen y por sus observaciones a este trabajo.*

*A todas las personas que forman parte del laboratorio de Fisiología Celular, Dra. Leticia Bucio y Dra. Verónica Souza por su calidez y buena predisposición, a Natalia, Karina, Denise, Anayelly, Marcela, Mayrel, Cristina, Ileana, Sandra y Alberto que me brindaron amistad y compañerismo gracias a lo cual pude llevar adelante el trabajo experimental, todo mi agradecimiento y cariño.*

*A la Universidad Autónoma Metropolitana de la cual es un orgullo pertenecer, porque en esta institución recibí información y formación que marco el rumbo de mi vida.*

*Y a todas las personas que directa o indirectamente participaron en mi formación.*

**“Sinceramente Gracias”**

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres Cosme y Crisanta, que me han enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. A ellos que me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.*

*A ti mi niña hermosa Erika, que desde el día en que naciste hasta el día hoy sigues siendo mi motivación, mi fuerza y mi razón de vivir.*

*A mi pequeño angelito, que a pesar de la distancia siempre has estado presente en mis recuerdos.*

*A mi familia y amigos que me acompañaron en esta loca aventura que significó la maestría y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos.*

*A mis primas Cindy y Caro.*

*A mis hermanos José y Armando,*

*A mí cuñada Gaby*

*A mis tí@s Paula, Paz y Salome*

*A mis sobrín@s Ale, Vicky, Gabriel, Vale, David, Chule, Zai, Hugo, Pelón, Chacha y Genrrucho.*

*A mis amig@s Osiris, Jorge, Alelí y Gerardo*

*A mis amigas y compañeras del lab,  
Natalia, Kari, Dence, Nelly,  
Marce, Mayrel, Cris, Ile y Sandy*

#

#

#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#  
#

D #vflhq wlv#lq #k lv#cd erud wru | #lv#q rw#rq o | #d #whfk q lfld q =#k h#lv#d ovr #d #  
fk log #sod fhg #ehiruh#q d wx ud o#k hq rp hq d #z k lfk #lp suhw#k lp #b1nh#d #id lu | #  
wd ch1#L#d p #d p rq j #wk rvh#z k r #wk lq n #wk d w#vflhq fh#k d v#j uhd w#hd x w | 1#  
#

P D U L H # F X U L H ##  
+ 4 ; 9 : 0 4 < 6 7 ,

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
I.1 <i>Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD).....</i>	<i>4</i>
I.2 <i>Hepatocitos.....</i>	<i>5</i>
I.3 <i>Colesterol de la dieta y su transferencia entre los tejidos.....</i>	<i>5</i>
I.4 <i>NAFLD, hipercolesterolemia y estrés oxidante en el hepatocito.....</i>	<i>8</i>
I.5 <i>Glutación (GSH) y el control del estado redox.....</i>	<i>11</i>
I.6 <i>Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en el control del daño por         estrés oxidante.....</i>	<i>16</i>
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
III.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>20</i>
III.2 <i>Objetivos particulares.....</i>	<i>20</i>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
V.1 <i>Tratamiento de los animales.....</i>	<i>21</i>
V.2 <i>Pruebas de daño y funcionalidad hepática.....</i>	<i>21</i>
V.3 <i>Obtención de cultivo primario de hepatocitos de ratón.....</i>	<i>21</i>
V.4 <i>Diseño experimental.....</i>	<i>23</i>
V.5 <i>Detección de colesterol libre por tinción con filipina.....</i>	<i>24</i>
V.6 <i>Determinación de triglicéridos por tinción con Acetite Rojo O.....</i>	<i>25</i>
V.7 <i>Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO).....</i>	<i>25</i>
V.8 <i>Extracción y cuantificación de proteína total.....</i>	<i>25</i>
V.9 <i>Electroforesis de proteínas.....</i>	<i>26</i>
V.10 <i>Western Blot.....</i>	<i>27</i>
V.11 <i>Determinación de proteínas oxidadas.....</i>	<i>27</i>
V.12 <i>Determinación de las actividades enzimáticas.....</i>	<i>28</i>
V.12.a) <i>Actividad de la Catalasa.....</i>	<i>28</i>
V.12.b) <i>Actividad de la Superóxido Dismutasa total.....</i>	<i>29</i>
V.13 <i>Determinación de GSH/GSSG por HPLC.....</i>	<i>30</i>
V.14 <i>Análisis estadístico.....</i>	<i>30</i>



<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
VI.1 <i>Efecto de la dieta HC en los hepatocitos de ratón.....</i>	31
VI.2 <i>Regulación diferencial del HGF sobre las enzimas SOD1 y Catalasa en hepatocitos HC.....</i>	38
VI.3 <i>El HGF incrementa el sistema de GSH para contrarrestar el estrés oxidante producido por la dieta HC.....</i>	42
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>IX. REFERENCIAS.....</b>	<b>53</b>

## **I. INTRODUCCIÓN.**

El colesterol es esencial para diversas funciones celulares, sin embargo a pesar de la relevancia fisiológica se ha reportado que una dieta rica en colesterol puede inducir problemas de salud. Una de las respuestas celulares más generales que se presentan cuando se incrementan las concentraciones de colesterol, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales se han relacionado con diferentes procesos fisiológicos como la apoptosis, el cáncer y una respuesta inflamatoria incrementada. Para compensar los niveles de ERO, existen varios mecanismos para neutralizar los radicales libres, entre los que destacan los sistemas antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos. El mecanismo de defensa antioxidante puede ser inducido por diferentes estados fisiológicos en los sistemas biológicos por su interacción con el ambiente y como respuesta a los procesos metabólicos que se presentan en los organismos aeróbicos. La respuesta celular es sumamente compleja y puede activarse por un desbalance en el estado redox celular que puede ser inducido por interacciones ambientales o como parte de procesos fisiológicos naturales entre los que participan algunos factores de crecimiento. Las células disponen de sistemas enzimáticos complejos y moléculas que pueden reaccionar con las ERO, disminuyendo su alta reactividad y aminorando el daño oxidativo. Cuando hay un desbalance entre los agentes antioxidantes y pro-oxidantes se genera un estrés oxidante, que ha sido reconocido como el mecanismo clave responsable de la progresión del daño hepático.

## **I.1 Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico (NAFLD)**

La esteatosis no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) fue descrita en 1980 por Ludwig y es la más común de las enfermedades hepáticas crónicas en el mundo occidental tanto en adultos (Musso et al., 2010) como en niños (Loomba et al., 2009), teniendo una prevalencia superior al 30% en población adulta en general.

La NAFLD se ha considerado históricamente una condición benigna, reversible, asintomática y con pocas complicaciones clínicas asociadas. En la actualidad no existen marcadores bioquímicos específicos para el diagnóstico de la enfermedad (Byrne et al., 2009), sin embargo se ha reportado que los pacientes comúnmente presentan elevación de las concentraciones séricas de marcadores de daño en el hígado, incluyendo la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (GGT) (Chen et al., 2008).

Histológicamente, la esteatosis no alcohólica se caracteriza por acumulación de triglicéridos (TG) en forma de gotas grandes (macrovesículas) que se encuentran en el citoplasma dentro de los hepatocitos, (Donnelly et al., 2005).

La NAFLD es una enfermedad hepática que al presentarse de forma crónica puede llevar a un espectro de patologías hepáticas, variando desde una simple esteatosis, en su forma más benigna, hasta una cirrosis, siendo esta la forma más agresiva, pasando por la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la fibrosis (Jou et al., 2008). Los mecanismos que promueven la progresión de la NAFLD involucran múltiples adaptaciones celulares al estrés oxidante que ocurren cuando el metabolismo lipídico está alterado (Musso et al., 2009). Por ello la progresión de la

enfermedad es lenta, pueden ser años o décadas, por lo que la historia natural de la enfermedad es difícil de determinar en un tiempo corto (Donnelly et al., 2005).

## **I.2 Hepatocitos.**

La composición celular del hígado normal es de 70% a 80% de hepatocitos, los cuales tienen forma poliédrica con ocho o más caras y su tamaño varía entre 25-30  $\mu\text{m}$  de largo y 20-25  $\mu\text{m}$  de ancho. Una gran mayoría de ellos presenta un núcleo único, aunque aproximadamente el 25% de ellos es binucleado (Kmieć, 2001).

Los hepatocitos son considerados el componente celular principal del hígado debido a que llevan a cabo la mayoría de las funciones hepáticas tales como la síntesis y regulación de la mayoría de las proteínas séricas esenciales (albúmina, proteínas transportadoras, factores de coagulación, hormonas y factores de crecimiento), la regulación de nutrientes (glucosa, glucógeno, lípidos, colesterol, aminoácidos), el metabolismo y conjugación de compuestos lipofílicos (bilirrubina, cationes, xenobióticos) para su excreción por bilis o por orina, la producción de bilis y sus transportadores, lipoproteínas del plasma, la transformación de lipoproteínas, el catabolismo de LDL, VLDL y la síntesis de colesterol, entre otras (Kershenobich, 2005).

## **I.3 Colesterol de la dieta y su la transferencia entre los tejidos.**

El colesterol es una molécula imprescindible por sus numerosas funciones: componente estructural de membranas, precursor de hormonas y ácidos biliares. Está distribuido en diferentes membranas, predominantemente en la membrana plasmática, donde participa en la organización física de dominios específicos. Las

células obtienen el colesterol por dos vías, la síntesis de novo y la internalización de colesterol exógeno (Hu et al., 2010).

El colesterol que entra en el lumen del intestino delgado deriva principalmente de tres fuentes: la dieta, la bilis, y el desprendimiento de la mucosa del epitelio intestinal. Pero solo el colesterol proveniente de la dieta (300 a 500 mg por día) y la bilis ( 800-1200 mg por día) es el que puede absorberse (Ikonen, 2008).

Debido a que el colesterol es poco soluble en un medio acuoso, su solubilización depende de los ácidos biliares. Las sales biliares son detergentes anfipáticos biológicos, y sus monómeros se pueden agregar de forma espontánea para formar micelas simples. Las micelas simples, de aproximadamente 3 nm de diámetros, son pequeños agregados, termodinámicamente estables que pueden solubilizar una cantidad mínima de colesterol. Sólo el colesterol no esterificado puede ser incorporado en las micelas de ácidos biliares (Trauner et al., 2010; van der Velde et al., 2010). Además se ha identificado a la proteína Niemann-Pick C1 like-1 (NPC1L1) como un transportador de esteroides que se encuentra en la membrana apical de los enterocitos, que se activa cuando los niveles de colesterol intrahepáticos son bajos lo que facilita la captación de colesterol permitiendo su transporte a través de la membrana apical de los enterocitos y su liberación hacia la linfa (Ikonen, 2008).

La acetil coenzima A acetiltransferasa 2 (ACAT2) es la encargada de esterificar al colesterol absorbido. Los ácidos grasos provenientes de la dieta se utilizan para la síntesis de TG en el retículo endoplásmico liso (REL) y simultáneamente se sintetizan apolipoproteínas, como la Apo-B48 en el retículo endoplásmico rugoso (RER) del enterocito. La proteína microsomal transportadora

de triglicéridos (MTP) transfiere a los TG y los ésteres de colesterol a la APOB48 formándose partículas llamadas quilomicrones (Hu et al., 2010).

Los quilomicrones salen del RE y son secretados a través del complejo de Golgi hacia el lado basolateral del enterocito y llegan al torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos. El colesterol obtenido de los alimentos inicialmente es transportado del intestino al hígado y después se entrega a todos los tejidos del cuerpo. (Ikonen, 2008).

El colesterol empaquetado en quilomicrones es tomado por los hepatocitos. A su vez, los hepatocitos secretan TG, colesterol y apolipoproteína-B en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para ser liberados al plasma (Kang and Davis, 2000; Hu et al., 2010). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se forman en el plasma como producto de la degradación de la VLDL, éstas se encargan de acarrear el colesterol a los tejidos periféricos donde es requerido. Para ello, las LDL son reconocidas por las diversas células del organismo por medio de receptores específicos que permiten regular el equilibrio intracelular del colesterol (Wang, 2007).

El transporte reverso del colesterol, es el proceso clave para prevenir las lesiones ateroscleróticas, se encarga de conducir el colesterol remanente desde los tejidos, incluso de la pared arterial, hacia el hígado para su posterior reutilización o eliminación a través de la bilis, evitando su acumulación a nivel tisular.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se forman en el hígado y en el intestino. Tienen una estructura discoidal es decir, una pequeña bicapa fosfolípida central rodeada de apolipoproteínas, constituida fundamentalmente por fosfolípidos y apolipoproteínas apoA1. Las HDL de origen hepático suelen

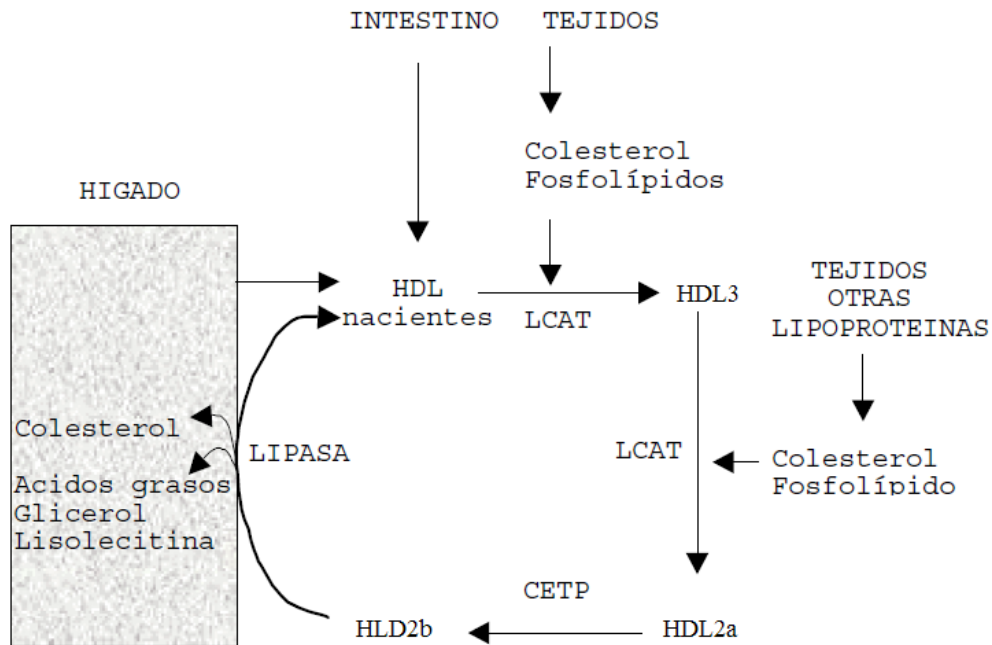
llevar también apoA-II, apoC y apoE. La transformación de estas partículas discoidales en esféricas se realiza mediante la captación de colesterol y fosfolípidos y su conversión en colesterol esterificado por la acción de la enzima lectina colesterol aciltransferasa (LCAT), dando como resultado la formación de HDL3 que posteriormente se transforma en HDL2a al recibir apolipoproteínas, colesterol libre y fosfolípidos liberados por la lipoproteína lipasa (LPL) durante el catabolismo de los quilomicrones o las VLDL. Por otra parte, existe una proteína, la proteína que transfiere ésteres de colesterol (CETP), que realiza el intercambio de colesterol esterificado por TG de manera que las HDL2a se enriquecen progresivamente en TG generando HDL2b. Las HDL2b constituyen un buen sustrato para la lipasa hepática, que hidroliza dichos TG así como los fosfolípidos superficiales, favoreciendo el suministro de colesterol desde dicha superficie al interior de las células hepáticas, junto a glicerol, ácidos grasos y lisolecitina. (Fig.1) (Von Eckardstein et al., 2001).

Debido al papel que juega en el mantenimiento de la fluidez celular y permeabilidad, la homeostasis del colesterol está altamente regulada y la acumulación excesiva de éste se considera tóxico para las células y provoca enfermedades mortales (Ory, 2004)

#### **I.4 NAFLD, hipercolesterolemia y estrés oxidante en el hepatocito.**

Mientras que en la literatura se asume que la esteatosis no alcohólica es el resultado de la acumulación de TG, es importante reconocer el potencial patogénico de la acumulación de otros lípidos como los ácidos grasos (FFA) y el colesterol. De hecho, hay reportes en la literatura en donde muestran que ratas sometidas a una dieta enriquecida con colesterol (4%) no solo incrementan el

contenido de TG (3 veces) a nivel hepático, si no también incrementa el contenido de colesterol (20 veces). (Wang et al., 2010).



**Fig. 1 Transporte reverso del colesterol**

La NAFLD está asociada con desórdenes metabólicos de lípidos, tanto en el caso de hipertrigliceridemia como en el caso de hipercolesterolemia. Datos reportados muestran que una exposición a LDL y colesterol induce daño celular y tisular y que una dieta crónica rica en colesterol (1.5%) produce hipercolesterolemia, hiperplasia nodular focal y una fibrosis severa (Sumiyoshi et al., 2010). Este fenómeno se conoce como lipotoxicidad, un término utilizado para definir el daño y muerte celular causado por el incremento de lípidos como el colesterol, los TG y los FFA y sus metabolitos. Se considera que la lipotoxicidad juega un papel relevante en la patogénesis del daño hepático (Neuschwander-Tetri, 2010).



Los hepatocitos no son células fisiológicamente capacitadas para almacenamiento de lípidos. Los FFA que llegan al hepatocito son derivados de la hidrólisis de los TG provenientes de la dieta, éstos entran a la célula por difusión pasiva y facilitada. En las células del parénquima hepático con procesos de oxidación activados, la  $\beta$  oxidación mitocondrial representa la ruta principal para la oxidación de los ácidos grasos. Un incremento en el suministro de FFA podría no ser el problema, lo que sugiere que la vía de eliminación puede ser la causa del daño, sin embargo una característica de la NAFLD, es la elevación en las concentraciones de FFA y este incremento puede inducir un aumento en la síntesis de ácidos grasos, disminución de la  $\beta$ - oxidación, además de una disminución en la exportación de VLDL lo que implica que el colesterol y TG no se secreten y se acumulen en el hepatocito. (Neuschwander-Tetri, 2010). La acumulación de grasa en los hepatocitos puede inducir citotoxicidad de manera directa o bien a través de sensibilización a otras agresiones.

El colesterol libre no sufre cambios por lo que consideran que el exceso de colesterol se está almacenando en forma de éster. El grupo del Dr. Fernández Checa (Marí et al., 2006) reporta datos muy interesantes 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, pero no los FFA o los TG, es clave en la sensibilización del hígado y su acumulación afectaba principalmente la mitocondria incrementando el colesterol libre y sensibilizando a los hepatocitos progresando a esteatohepatitis.

Las mitocondrias son organelos pobres en colesterol estimado en 0,5% a 3% del contenido total que se encuentra en la célula, juegan el papel principal en la

fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos (Kmieć, 2001). Alteraciones en la estructura y función mitocondrial llevará a una depleción de energía, una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y por tanto como consecuencia a un estrés oxidante celular.

Se ha demostrado que en muchas enfermedades hepáticas las ERO están involucradas en los mecanismos de inicio y progresión del daño. Si bien hasta hace algunos años se les consideraba exclusivamente como especies altamente dañinas y negativas para los seres vivos, ahora se sabe que este efecto es dependiente de la concentración y duración del fenómeno de estrés oxidante (Marí et al., 2010).

Por lo tanto en la esteatosis no alcohólica, la desregulación metabólica de lípidos, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidante juegan un papel determinante en el daño de los hepatocitos y así como cambios profundos en la expresión génica que contribuyen a un proceso inflamatorio. (Yang et al., 2001).

### **I.5 Glutación (GSH) y el control del estado redox**

Las ERO pueden ser generadas en el hígado a través de mecanismos que involucran la mitocondria, los peroxisomas, el citocromo P-450, NADPH oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa y un exceso de Fe (Marí et al., 2010). En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidantes, la producción de las ERO y los sistemas de defensa (antioxidantes y/o enzimas antioxidantes) que mantienen la homeostasis celular y la regulación del estado redox intracelular. Cuando este balance no se mantiene, ya sea por un aumento en la producción de las ERO, por la pérdida o la disminución del sistema protector o por ambos eventos simultáneamente, se dice que existe un estado de estrés

oxidante. Las principales biomoléculas blanco de las ERO son los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, lesionando así su función y su estructura (Inoue, 2009). Si las células se mantienen bajo estrés oxidante, se pueden tener como resultado severas disfunciones metabólicas y enfermedades hepáticas como NAFLD, NASH, incluso cirrosis y hepatocarcinomas, por ello es importante saber el mecanismo de regulación del estado redox celular (Marí et al., 2010).

Para compensar los niveles de las ERO, la célula tiene varios mecanismos de defensa celular contra el daño oxidativo. Las enzimas son los primeros mecanismos de defensa celular contra el daño oxidativo. En general, funcionan eliminando  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  antes de que interactúen para formar el radical  $\cdot OH$ . Estas enzimas actúan sobre las ERO específicas degradándolas a moléculas menos nocivas. La inactivación se da por etapas sucesivas, este proceso se inicia con la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), por la mediación de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Existen tres tipos de SOD dependiendo de su ubicación: la mitocondrial (SOD2), citosólica (SOD1) y extracelular (SOD3) (Inoue, 2009).

Posteriormente el  $H_2O_2$  es convertido en agua por dos enzimas con actividad de peroxidasas, la catalasa y la glutatión peroxidasa (GHSpx). Además existe una segunda línea de defensa compuesta por secuestradores no enzimáticos, que actúan sobre los radicales libres residuales que escapan a las enzimas antioxidantes.

El hígado es el órgano que sintetiza glutatión (GSH) en mayor cantidad debido principalmente a dos aspectos en la biosíntesis de éste. En primer lugar, por la

capacidad única del hepatocito de convertir la metionina a cisteína a través de una reacción de transulfuración, en segundo lugar, la tasa de biosíntesis del GSH en el hepatocito es compensada por su tasa de exportación hacia el plasma, bilis y mitocondrias a través de distintos sistemas de transporte de GSH. El transportador de GSH en la mitocondria mantiene la poza neta de GSH debido a que la mitocondria no puede sintetizarlo (Lu, 1999).

El GSH es sintetizado en el citosol a partir de glutamato, cisteína y glicina en dos pasos enzimáticos y dependientes de ATP catalizados por la  $\gamma$ -glutamilcisteinsintetasa ( $\gamma$ -GCS) y GSH sintetasa (GS). El incremento de la síntesis de GSH es un mecanismo de adaptación en respuesta al estrés oxidante, siendo el primer paso limitante, el cual es mediado por la  $\gamma$ -GCS (Tsuboi, 1999).

El GSH es un tripéptido que existe en altas concentraciones (del rango de nanomoles) en todas las células. Es generalmente aceptado que la proporción GSH/GSSG en las células es de 10:1 en circunstancias normales, pero la relación redox puede cambiar a 4:1 en condiciones de estrés oxidante. Si bien es muy abundante en la célula, no está bien distribuido en sus organelos, ya que del 80-85% se encuentra en citosol, el 10% en mitocondria y el resto posiblemente en el retículo endoplasmático y en núcleo, siendo considerado el GSH mitocondrial más importante para la supervivencia celular debido a que este organelo es blanco de ataque en el daño y al no sintetizarlo de novo, requiere de su transportación hacia el interior de la mitocondria (Lu, 1999; Fernandez-Checa et al., 2005).

El balance de la proporción GSH/GSSG es mantenida por dos enzimas:

a) La glutatión reductasa (GSSGred), que utiliza el poder reductor de NADPH para convertir GSSG a GSH y por ende está ligado a los niveles de NADPH, que son determinados por el estado energético de la célula (Han et al., 2006).

b) La glutatión peroxidasa (GSHPx) que es un complejo enzimático que se encarga de eliminar el  $H_2O_2$ , existen cinco isoformas en mamíferos y todas ellas contienen selenio en su centro activo. La GSHPx actúa eliminando el  $H_2O_2$  formado por la SOD1, para lo cual emplea dos moléculas de GSH, lo que a su vez genera al GSSG (Han et al., 2006). Estas dos enzimas con actividad de peroxidasa (catalasa y GSHPx) actúan dependiendo los niveles  $H_2O_2$  presentes (Inoue, 2009). También repara la oxidación de lípidos mediante la conversión de lipoperóxidos en lípidos menos tóxicos (Yuan and Kaplowitz, 2011).

Entre las funciones que se le han asignado al GSH en el interior de la célula se pueden destacar: 1) De cofactor de varias enzimas de detoxificación contra estrés oxidante, como por ejemplo la glutatión transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico por la reducción del GSH en los compuestos polares que contienen un carbono electrofílico, nitrógeno, o azufre, entre otras (Hayes et al., 2005). Una vez realizada la catálisis, la GST se conjuga con fármacos o xenobióticos, esta acción facilita la exportación de medicamentos y xenobióticos a través de la familia de proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP). 2) La participación en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática. 3) Como atrapador de radicales como el  $\cdot OH$ , y de detoxificador del  $H_2O_2$  y los peróxidos lipídicos por la acción catalítica de GSHPx. 4) De regenerador de otros antioxidantes como la vitamina C y la vitamina E (Masella et al., 2005).

Finalmente el hepatocito exporta al GSH al sinusoide a través del transporte en el plasma o en la bilis a través del transporte del canalículo biliar (Fig. 2).

Para definir el estado redox celular se pueden medir los cocientes de importantes moléculas redox tales como  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  y  $\text{GSH}/\text{GSSG}$ , sin embargo lo más común es medir al  $\text{GSH}/\text{GSSG}$ . Esta proporción es la más representativa para obtener una estimación del estado redox celular porque la concentración molecular en la célula es mucho más alta que los otros compuestos. Además proporciona una estimación confiable del estado redox celular en las células y por lo tanto se mide con frecuencia como un indicador de estrés oxidante (Han et al., 2006).

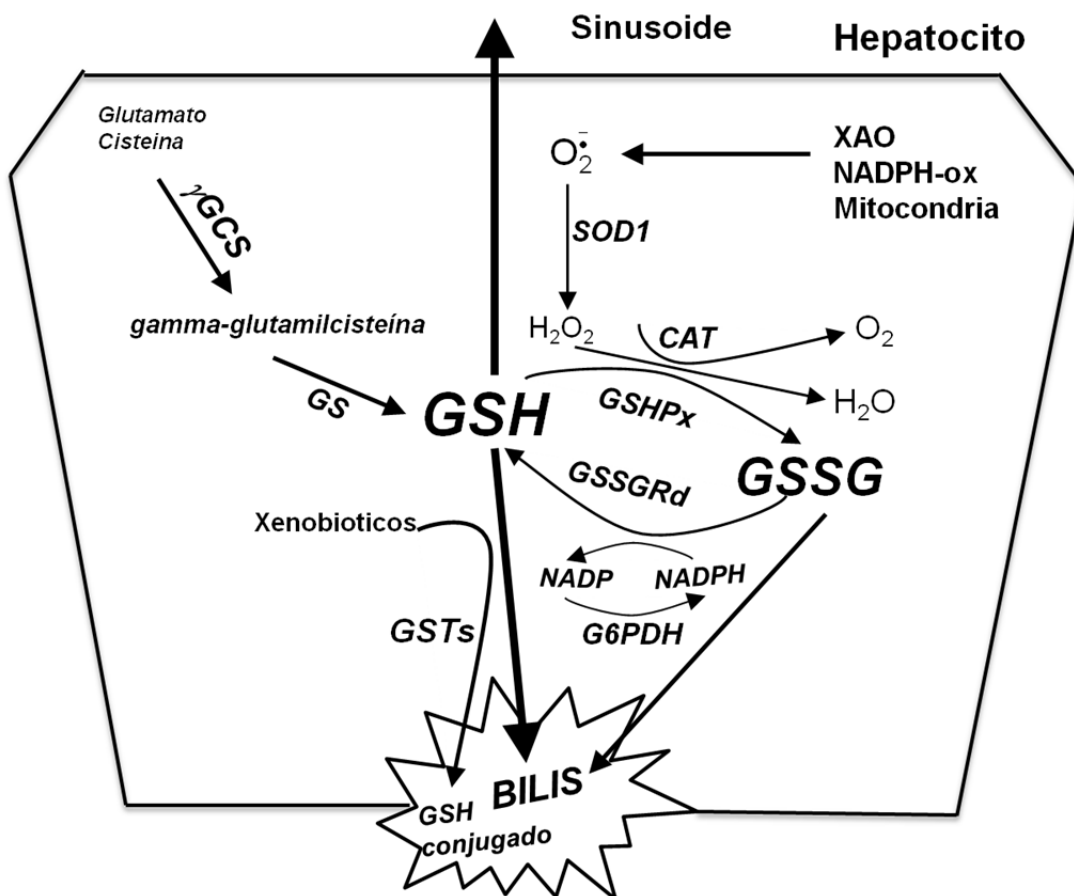


Fig. 2 Regulación del GSH intrahepático

## **I.6 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en el control del daño por estrés oxidante**

La regulación del control del estrés oxidante está dada en gran medida por enzimas como la GSHPx, la GST, la SOD y la catalasa entre otras, así como de las moléculas no enzimáticas como el  $\alpha$ -tocoferol y GSH. Alguno de ellos son inducidos por factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a través de su receptor c-met (Zarnegar et al., 2009).

El gen que codifica para HGF se encuentra en el cromosoma 7 q21.1 (Saccone et al., 1992). El HGF fue identificado como una glicoproteína compuesta por 692 a 697 aminoácidos (Matsumoto and Nakamura, 2001). Éste es sintetizado y secretado como un precursor inactivo (pro-HGF) de una sola cadena, pudiéndose sintetizar en el pulmón (Okada et al., 2004), o bien en el hígado por estelares, endoteliales, células del ducto biliar (Arends et al., 2008), entre otras.

El HGF activo se presenta como un heterodímero formado de dos cadenas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro. La cadena  $\alpha$  (30kDa) contiene un dominio N-terminal "hairping loop" (HL) que es el sitio de unión al receptor. La cadena  $\beta$  (60kDa) es un homólogo de proteasas de serina, pero carece de esta actividad enzimática (Funakoshi and Nakamura, 2003; Nakamura et al., 2011).

Al unirse el HGF al receptor c-met, se promueve su dimerización y la autofosforilación en residuos de tirosina ubicados en el dominio catalítico; esta fosforilación resulta en el reclutamiento de las moléculas de señalización intracelulares las cuales conducen a las respuestas fisiológicas (Stuart et al., 2000).

La señalización desplegada por el HGF/c-met está básicamente conducida por moléculas transductoras de señales como Gab1, Stat3, P13K, Grb2, fosfolipasa C (PLO), Rac, Ras, entre otras, la activación diferencial de ellas conduce a la respuesta fisiológica requerida, sea de proliferación, de protección antiapoptótica, morfogénesis, migración, entre otras (Fig. 3) (Stuart et al., 2000; Trusolino et al., 2010).

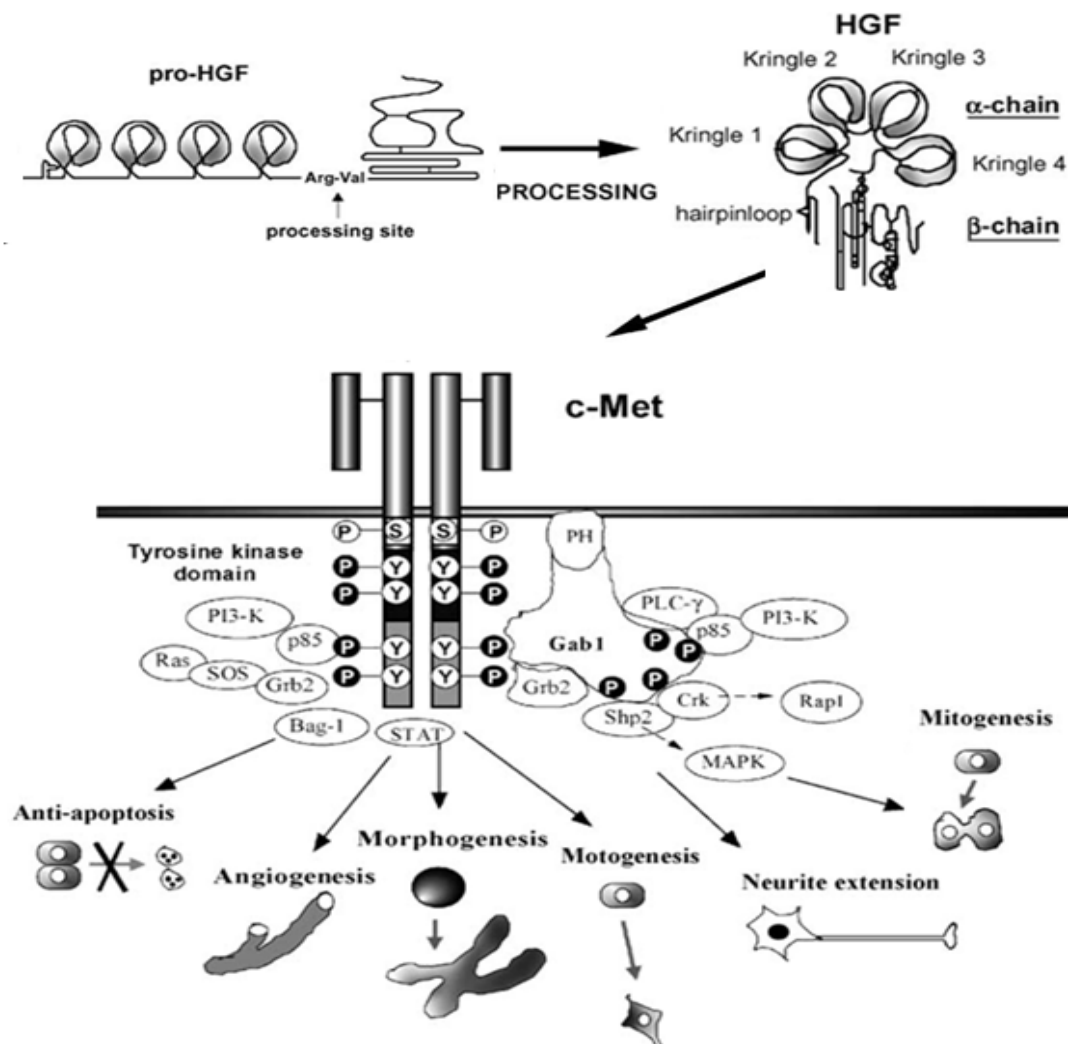


Figura 3. Estructura esquemática HGF activo procesado de un precursor inactivo (pro-HGF) y las actividades biológicas mediadas por las rutas de señalización de HGF/c-Met



Se ha asociado una elevación en los niveles séricos de HGF con el síndrome metabólico (Hiratsuka et al. 2005) y con enfermedades hepáticas (Tomiya et al., 1992), también se ha propuesto al HGF como un agente protector contra el estrés oxidante en diferentes tipos celulares como cardiomiocitos (Kitta et al., 2001), células epiteliales de pulmón (Okada et al., 2004), células del ducto biliar (Arends et al., 2008), entre otras. Inclusive dentro de nuestro grupo de trabajo Valdés-Arzate y col. (2009) encontraron el mecanismo por el cual HGF induce a las enzimas antioxidantes SOD, Catalasa y  $\gamma$ -GCS en células VL-17A para contrarrestar el daño oxidante producido por el metabolismo del etanol. Si bien se ha estudiado ampliamente el sistema HGF/c-met en diferentes procesos celulares, se ha dejado a un lado el impacto de la señalización mediada por HGF y su receptor c-met en el control del estrés oxidante en condiciones patológicas

Recientemente se ha reconocido al HGF como protector celular contra los efectos adversos del colesterol (Yu et al., 2010) y ácidos grasos (Santangelo et al., 2007), inclusive su participación en la regulación del metabolismo de los lípidos, así como la estimulación de la síntesis de lípidos y lipoproteínas de secreción (Kaibori et al, 1998; Kosone et al 2007), sin embargo a la fecha, no se ha estudiado el efecto de HGF/c-Met en la reversión del daño y el estrés oxidante debido a la acumulación de colesterol en los hepatocitos.

## **II. JUSTIFICACION.**

En la actualidad, la población mexicana tanto adulta como infantil presenta una prevalencia muy alta de obesidad. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición señala que 52.2 millones de mexicanos sufren sobrepeso y obesidad. Además, en su dieta, el consumo de grasas es superior al valor recomendado, lo cual nos lleva a considerar que una proporción muy alta de la población mexicana debe de tener hígado graso o esteatosis.

La NAFLD asociado a un incremento del consumo de colesterol es el factor que mayor riesgo representa para las enfermedades cardiovasculares, y se ha correlacionado positivamente con la incidencia y mortalidad de la enfermedad coronaria. En la última década se han realizado importantes avances que nos han permitido una mejor comprensión de la patogénesis en algunas enfermedades hepáticas y se ha demostrado que el estrés oxidante participa en gran medida en el inicio y la progresión del daño hepático. Por lo que el desbalance del estado redox celular y/o el estrés oxidante determina en gran medida el inicio y progresión de los distintos estadios patológicos en el hígado, es por ello que la esteatosis no alcohólica con hipercolesterolemia ha recibido gran atención desde el punto de vista del tratamiento clínico

Es bien conocida la participación del HGF en procesos de daño hepático, sin embargo no se conoce la participación de HGF/c-met en el control del estado redox en la esteatosis producida por una dieta hipercolesterolémica

### **III. OBJETIVOS.**

#### **III.1 Objetivo general.**

Determinar el control del estrés oxidante por el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en cultivo primario de hepatocitos de ratón alimentado con una dieta alta en colesterol (HC).

#### **III.2 Objetivos particulares.**

III.2.a) Analizar el efecto del HGF en el estado oxidante de hepatocitos de ratones alimentados con dieta HC, así como la producción de especies reactivas de oxígeno.

III.2.b) Determinar el efecto del HGF sobre el contenido y actividad de las enzimas reguladoras del estado redox.

III.2.c) Evaluar el efecto del HGF sobre el glutatión (GSH) y las enzimas relacionadas con el sistema del mantenimiento del GSH.

### **IV. HIPÓTESIS.**

La acumulación de lípidos sensibiliza a los hepatocitos a un daño oxidativo, provocando que la respuesta antioxidante sea insuficiente para compensar el daño. El HGF inducirá una respuesta antioxidante que mejorará el estrés celular.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS.**

Los ratones de la cepa CD1, 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, EUA)

### **V.1 Tratamiento de los animales.**

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 de 8 a 12 semanas, los cuales fueron sometidos a un ayuno previo por 12 h y posteriormente alimentados con una dieta rica en colesterol (HC, 2% colesterol y 0.5% colato de sodio, Dyets) o con una dieta balanceada (chow, sin colesterol, Harland) por 48 h.

### **V.2 Pruebas de daño y funcionalidad hepática.**

Los ratones alimentados con las diferentes dietas fueron anestesiados intraperitonealmente utilizando 0.7-0.8 ml de avertina (2-2-2 tribromoetanol) (Sigma, EUA). Una vez anestesiados, la sangre fue colectada por punción ocular en un vacutainer con citrato de sodio (BD Falcon, EUA). Se emplearon tiras reactivas comerciales (Roche, Alemania) para determinar marcadores de daño hepático como alanino amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT) y marcadores de funcionalidad hepática como bilirrubina y fosfatasa alcalina (ALP) utilizando el equipo Reflotron (Roche Diagnostics).

### **V.3 Obtención de cultivo primario de hepatocitos de ratón.**

Se lavó el área abdominal del ratón con etanol al 70% y se procedió a hacer una incisión en forma de "V" en el abdomen y tórax para dejar expuesto el hígado y corazón. Se hizo una incisión en la aurícula derecha del corazón y se introdujo

un catéter Abbocath 22G acoplado a un equipo de perfusión, se anudó la vena cava inferior con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones y se cortó la vena porta, por donde se eliminaron los fluidos de la perfusión.

Para el aislamiento de hepatocitos de los ratones alimentados con las diferentes dietas se utilizó la técnica de doble perfusión con colagenasa. En la primera parte del proceso, el hígado se perfundió con aproximadamente 50 ml solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (Gibco, EUA) libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , con ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico (HEPES) 10 mM (Gibco, EUA), pH 7.4, etilglicol (b-aminoetil1-eter)-N,N,N,N ácido tetracético (EGTA) 75 mM (Sigma, EUA) a una temperatura de 37 °C. La velocidad de perfusión se controló con una bomba peristáltica a 3.8 ml/min. En la segunda parte de la perfusión se utilizó 50 ml de colagenasa tipo I al 0.1% (Sigma) en medio William's (Sigma, EUA) con  $\text{NaHCO}_3$  25mM (J. T. Baker, México) amortiguado con HEPES 10 mM, pH 7.4 a una temperatura de 37 °C. (Gómez-Quiroz et al., 2008; Papeleu et al., 2006). El hígado se retiró y se colocó en 50 ml de medio William's frío suplementado con suero fetal de bovino al 10% (SFB, HyClone UT, EUA), HEPES 18 mM, albúmina sérica (BSA) (Sigma, EUA), una mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y un agente antimicótico (anfotericina B) (Gibco, EUA). Este medio será denominado en adelante como medio de adhesión. Se colocó el hígado en una caja de Petri de 10 cm de diámetro, se rompió la membrana de tejido conectivo que rodea al hígado, utilizando 2 pipetas graduadas estériles de 1 ml, lo que permitió la dispersión de las células hepáticas y se obtuvo una suspensión celular que se pasó por un filtro (BD Falcón) con un tamaño de poro

de 100  $\mu\text{m}$ . El filtrado se centrifugó a 45 Xg durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 25 ml de medio de adhesión frío. Una solución de Percoll (Sigma, EUA) con HBSS 1X (Sigma, EUA) se depositó sobre ésta suspensión celular, ambas fases se homogenizaron suavemente y posteriormente se centrifugó a 170 Xg durante 10 min a 4 °C, con lo que se obtuvo un botón compuesto por hepatocitos viables. El sobrenadante se eliminó y los hepatocitos se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesión frío. La viabilidad de las células se determinó por tinción con azul de tripano (Sigma, EUA) en un hematocitómetro (cámara de Neubauer). La viabilidad celular siempre fue superior al 95%. Después los hepatocitos suspendidos en los 20 ml de medio de adhesión se centrifugaron a 45 Xg durante 5 min a 4°C, posteriormente el botón se resuspendió en medio de adhesión frío a una concentración de  $1.0 \times 10^6$  células/ml. Las células se sembraron, en cajas Petrí (Corning, EUA) o multipozos (Nunc, EUA) dependiendo el experimento a seguir y se colocaron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (Gómez-Quiroz et al., 2008).

#### **V.4 Diseño experimental.**

En todos los experimentos los hepatocitos chow y HC se sembraron en una densidad de  $3.5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, que corresponde a aproximadamente 90% de confluencia en la superficie de sembrado. Después de que la mayor parte de las células se adhirieron (2 a 4 h), se les cambió el medio de adhesión por medio Williams con una mezcla de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y un agente antimicótico (anfotericina B) (Gibco, EUA), sin SFB (referido posteriormente como W+AB/AM). Las células se cultivaron en este medio toda la noche para permitir la

estabilización del cultivo. Al día siguiente se cambió el medio W+AB/AM fresco y se formaron diferentes grupos: (1) células sin tratamiento del ratón chow y HC; (2) células del ratón chow y HC tratadas con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a una concentración final de 50ng/ml (PeproTech, Rocky Hill NJ, EUA) durante 3, 6, 12 ó 24 h..

Terminado el tiempo del tratamiento los medios fueron retirados, y las células se emplearon en las diferentes pruebas: inmunofluorescencia para detectar colesterol libre con filipina, determinación de TG por tinción con Rojo O, producción de peróxidos por la oxidación de 2,7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), oxidación de proteínas empleando el ensayo comercial "Oxyblot", análisis de proteínas por inmunoblot, determinación de actividades enzimáticas espectrofotométricamente, y cociente de GSH/GSSG por HPLC.

#### **V.5 Detección de colesterol libre por tinción con filipina.**

Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma, EUA) por 15 min a temperatura ambiente, después se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Sigma, EUA). Al terminar, se incubaron con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (Sigma, EUA) diluido en PBS + saponina al 0.2% por 15 min, posteriormente se lavaron dos veces con PBS y se colocó la filipina a una dilución 1:100 en BSA 0.1% en PBS por 60 min a temperatura ambiente, al finalizar se hicieron tres lavados con PBS y se montó con Dako Cytomation. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia.

#### **V.6 Determinación de triglicéridos por tinción con Aceite Rojo O.**

Las células fueron sembradas en placas de 12 pozos (Costar, EUA). Después de que se les cambió el medio de adhesión por medio W+AB/AM. Las células se cultivaron en este medio toda la noche para permitir la estabilización del cultivo. Al día siguiente se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS. Para fijar las células se agregó 0.4 ml de PFA al 2.5% por pozo durante 1 h. Se retiró el PFA y se lavó con PBS. Se tiñó 0.4 ml de Aceite Rojo O 0.2% (Sigma, EUA) por pozo durante 4 h. Se lavó cuatro veces con H<sub>2</sub>O desionizada y se dejó secar toda la noche. Posteriormente se extrajo el colorante con 0.2 ml de isopropanol (J. T. Baker, México) y se agitó suavemente por 10 min. La absorbancia fue registrada a una longitud de onda de 510 nm.

#### **V.7 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO).**

La producción de ERO, particularmente peróxidos, fue determinado por la fluorescencia emitida por la diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma, EUA) en presencia de peróxidos. Para este ensayo las células fueron sembradas en placas de 96 pozos especiales para fluorescencia. Después del tratamiento con HGF, las células fueron tratadas con DCFH-DA [5 µM] durante 30 min. Al finalizar el tiempo de incubación con la DCFH-DA, la placa fue leída con longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm usando un detector multimodal de microplacas DTX 880 (Beckman Coulter) (Valdés-Arzate et al., 2009).

#### **V.8 Extracción y cuantificación de proteína total.**

Se retiró el medio de cultivo de las células una vez concluido el tiempo de tratamiento y las células se lavaron dos veces con PBS frío y se agregó 200 µl de



amortiguador de lisis, compuesto por 10 ml de reactivo de extracción de proteína (M-PER) (Pierce, EUA), 100  $\mu$ l de dithiothreitol (DTT) (Sigma, EUA), 100  $\mu$ l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma, EUA), y una mezcla de inhibidores de fosfatasas y de proteasas (Roche, Alemania), para después despegar las células usando un gendarme de goma. La suspensión celular obtenida se colocó en un tubo Eppendorf se incubó en hielo durante 15 min y después se centrifugó a 17000 Xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se guardó a -20 °C en alícuotas hasta ser cuantificadas (Gómez-Quiroz et al., 2008; Valdés-Arzate et al., 2009).

La proteína se cuantificó colorimétricamente utilizando el paquete comercial BCA (Pierce, EUA), basado en la reacción del ácido bicínico, que interacciona con los residuos fenólicos de la proteína y oxidando al cobre. Como curva patrón se utilizó albúmina sérica de bovino (Smith et al., 1985).

### **V.9 Electroforesis de proteínas.**

Se tomó entre 50 y 100  $\mu$ g de proteína total y se le agregó un amortiguador de muestra constituido por Tris-HCl 0.1 M a pH 6.8 (Sigma, EUA), glicerol (J. T. Baker, México), dodécil sulfato de sodio (SDS) al 20% (BioRad, EUA), 2- $\beta$ -mercaptoetanol al 10% (BioRad, EUA) y azul de bromofenol al 1.0% (BioRad, EUA). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (Sigma, EUA) en presencia de SDS 0.1 %, en una cámara de electroforesis mini-Protean II (BioRad, EUA) a un voltaje de 120 V durante 90 min.

### **V.10 Western Blot.**

La proteína total fue transferida a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Invitrogen, EUA) a 120 V por 2 h. Pasado este tiempo la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween (Sigma, EUA) por 1 h en agitación, después se realizaron dos lavados con TBS-Tween por 10 min en agitación constante y se incubó durante toda la noche en agitación constante a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos: anti-SOD1 (sc-11407), anti-actina (sc-13065), anti- $\gamma$ -GCS (sc-22755), anti-GSHPx (3/5/6) (sc-55102), anti-GST (sc-138) y anti-G6PD (sc-46968) (todos ellos de Santa Cruz Biotechnology, EUA), y anti-catalasa, (Sigma, EUA). Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con TBS-Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 1 h. Después se lavó 2 veces por 10 min con TBS-Tween y 1 vez por 5 min con TBS. Se reveló utilizando el sustrato de alta sensibilidad (Millipore, USA). Se detectó la luminiscencia y se cuantificaron las bandas usando el equipo Gel Logic 1500 imaging system, de Kodak (Towbin et al., 1992).

### **V.11 Determinación de proteínas oxidadas.**

La producción de grupos carbonilos en las proteínas por efecto de las ERO fue determinado por ensayo comercial Oxyblot™ (Millipore, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomó 50  $\mu$ g proteína total, por cada 5  $\mu$ l de la alícuota de proteína se agregó 5  $\mu$ l de SDS 12% para obtener una concentración final de 6%. Se añadió 10  $\mu$ l de la solución 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 1x y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, terminado el tiempo se

añadió 7.5  $\mu$ l de la solución de neutralización. Posteriormente las muestras se analizaron por Western Blot, siguiendo el procedimiento antes descrito (Valdés-Arzate et al., 2009).

#### **V.12 Determinación de las actividades enzimáticas.**

Se sembraron  $4 \times 10^6$  células en cajas de Petri de  $10 \text{ cm}^2$  con medio con medio W+AB/AM, se trataron o no con HGF 50 ng/ml (24 h). Las células fueron lavadas dos veces con PBS para retirar los tratamientos, se levantaron las células con un gendarme de goma en 1.0 ml de la solución de PBS y fueron transferidas a un tubo cónico. La suspensión celular se sonicó en hielo durante 30 segundos utilizando un sonicador (Ultrasonic Processor XL2020). De éste lisado se tomó 20  $\mu$ l para la determinación de la cantidad de proteína por el método de BCA antes descrito y el resto se centrifugó a 100,000 Xg por 90 min a 4°C en una ultracentrifuga Beckman (TLX). Las actividades de las enzimas fueron determinadas en el sobrenadante.

##### V.12.a) Actividad de la Catalasa.

La actividad enzimática de catalasa se determinará por el método de Beers y Sizer (1952) basada en la utilización del peróxido de hidrógeno como sustrato. Se tomaron 10  $\mu$ l de muestra y se agregaron 1.990 ml de agua, se dejó incubar por 2 min a 25 °C, posteriormente se adicionó 1 ml de una solución compuesta de  $\text{H}_2\text{O}_2$  59 mM (J. T. Baker, México) en amortiguador de fosfato de potasio 0.05 M (J.T.Baker, México) a pH 7.0. La absorbancia de la muestra se leyó inmediatamente a una longitud de onda de 240 nm en el espectrofotómetro, se

repitió la lectura pasado un minuto. Los resultados se expresan como U / mg de proteína.

#### V.12.b) Actividad de la Superóxido Dismutasa total.

La actividad de SOD se determinó por el método de Winterbourn (1975) el cual se basa en la habilidad de la enzima para inhibir la reducción del tetrazolionitro-azul (NBT) por el radical superóxido el cual es generado por la reacción de foto-reducción de la riboflavina y el oxígeno. En una serie de tubos de ensaye se preparó la mezcla de reacción formada por la muestra en diferentes volúmenes que fueron desde 5 hasta 300  $\mu$ l, 0.2 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 M (Sigma, EUA), 0.1 ml de azul nitrotetrazolio (NBT) 1.5 mM (Sigma, EUA) y PBS 0.067 M (J. T. Baker, México) a pH 7.8, teniendo un volumen final de 3.0 ml, los tubos se colocaron en una cámara iluminada con lámparas fluorescentes de 15 W por un periodo de 10 min. Pasado este tiempo se agregaron a los tubos de ensaye 0.05 ml de riboflavina 0.12 mM (Sigma, EUA) y se incubaron en la misma cámara por 20 min, al final de este tiempo las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 560 nm de longitud de onda.

Se determinó el porcentaje de inhibición de la reducción del NBT para calcular el volumen que proporciona la mitad de la máxima inhibición por la enzima. La actividad se determinó por la siguiente relación:

Unidades = 1000,000/Vol. que resulta de la mitad de la máxima inhibición

Los resultados fueron reportados como mU/mg de proteína.

### **V.13 Determinación de GSH/GSSG por HPLC.**

Se sembraron  $4 \times 10^6$  células en cajas de Petri de  $10 \text{ cm}^2$  con medio con medio W+AB/AM, se trataron o no con HGF 50 ng/ml (0-24 h). Las células fueron lavadas dos veces con PBS para retirar los tratamientos, se levantaron las células con un gendarme de goma en 1.0 ml de la solución de PBS. La suspensión celular se sonicó en hielo durante 30 segundos. Se tomaron 500  $\mu\text{l}$  del lisado y se agregó 50  $\mu\text{l}$  de ácido meta-fosfórico (1% v/v) (J.T. Baker, México), se centrifugaron las muestras a 20,000 Xg durante 10 min a 4 °C. Del sobrenadante se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se procedió al análisis por un sistema de HPLC (Waters, EUA), equipado con una columna Synergi 4u Hydro-RP 80A (150×4.6 mm) (Phenomenex, EUA), la fase móvil fue a base de solución amortiguadora de potasio ajustado a pH=3 (Kachadourian et al., 2011).

### **V.14 Análisis estadístico.**

Cada experimento se realizó al menos por triplicado usando células de al menos 3 animales de experimentación. Para la comparación de medias de diferentes grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por prueba no paramétrica de Tukey. Se empleó para el análisis el programa NCSS versión 2000. La diferencia entre medias se consideró significativa con  $p \leq 0.05$ .

## **VI. RESULTADOS.**

### **VI.1 Efecto de la dieta HC en los hepatocitos de ratón.**

Con la finalidad de evaluar el daño hepático causado por la ingesta de la dieta HC se determinaron las transaminasas ALT y AST, los datos muestran un incremento de 2 y 5 veces respectivamente (Tabla 1) en los ratones HC con respecto a los ratones chow. Además se determinó la GGT, bilirrubina total y ALP para determinar la funcionalidad del hígado encontrando un aumento en la bilirrubina total de 3 veces más en los ratones HC con respecto a los ratones chow (Tabla 1).

Con la finalidad de corroborar que los hepatocitos HC presentaban un incremento en el contenido de colesterol se realizó una inmunofluorescencia con filipina, compuesto que se une específicamente al grupo 3 $\beta$ -hidroxilo de los esteroides emitiendo una fluorescencia. Se observa en la figura 1B que los hepatocitos HC tienen un incremento en la fluorescencia indicando que hay un incremento en el contenido de colesterol libre en los hepatocitos HC en comparación con los hepatocitos de ratones alimentados con la dieta chow.

Además al obtener el cultivo primario de hepatocitos se observa por microscopía de contraste de fases un incremento en el contenido de vesículas lipídicas en los hepatocitos HC con respecto a los hepatocitos chow (Fig. 1B). Se consideró que el contenido de estas vesículas podrían ser de TG y con la finalidad de corroborarlo se realizó la tinción con aceite rojo O. Los micrográficas mostraron ser positivas para lípidos en las células HC, es interesante observar que el depósito de lípidos se ubica principalmente rodeando el núcleo (Fig. 1F). Al

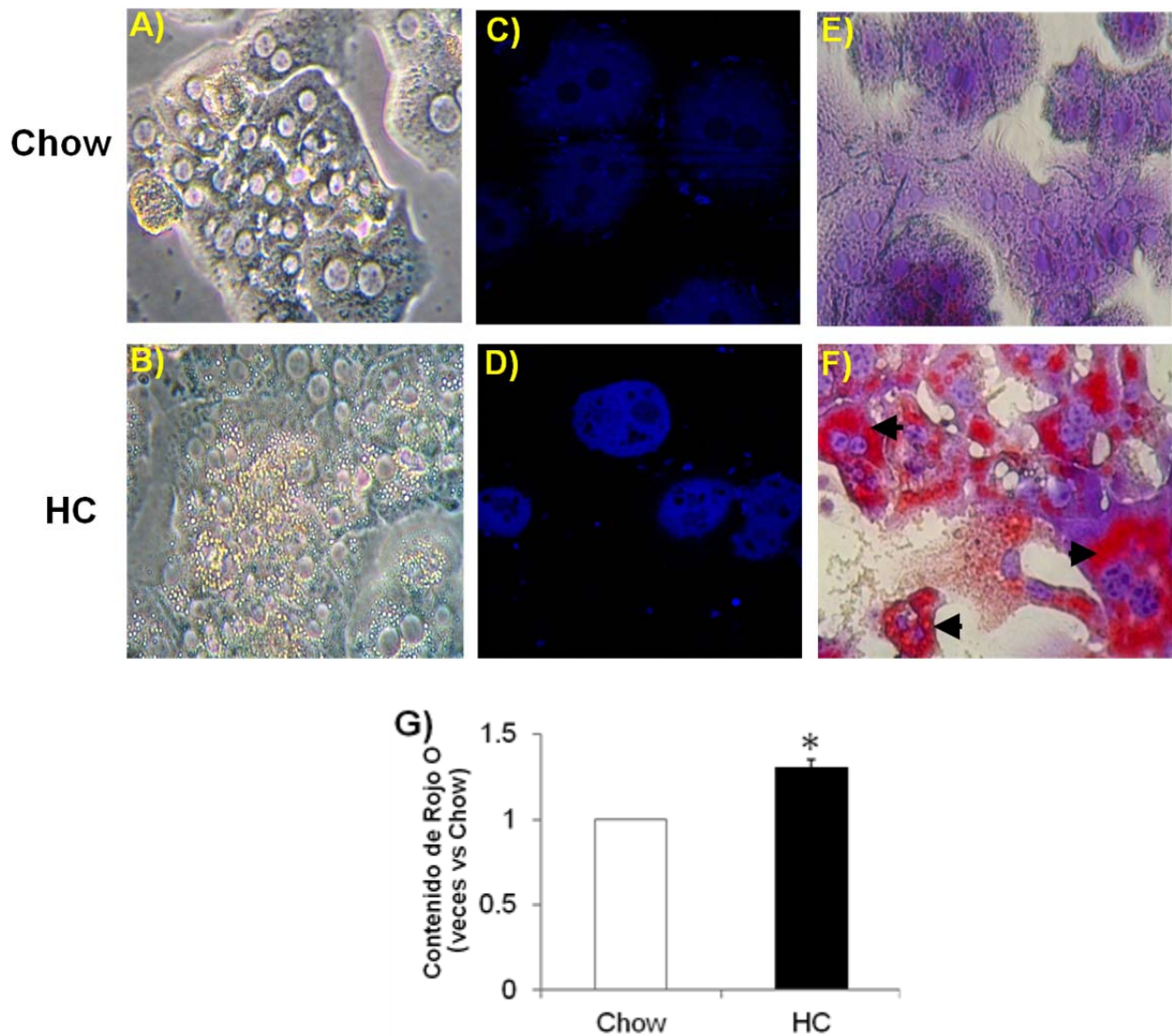
extraer el aceite rojo O de los hepatocitos se encontró una elevación de 1.3 veces en el contenido de rojo O (Fig. 1E) en los hepatocitos HC con respecto a los hepatocitos chow.

**Tabla 1. Determinación de funcionalidad y daño hepático**

<b>Parámetros</b>	<b>chow</b>	<b>HC</b>
<b>AST (U/L)</b>	41.1 ± 12.1	79.7 ± 33.0*
<b>ALT (U/L)</b>	21.9 ± 11.3	100.4 ± 57.0*
<b>GGT (U/L)</b>	2.8 ± 0.0	2.8 ± 0.0
<b>Bilirrubina</b>	0.65 ± 0.04	1.3 ± 0.13*
<b>Fosfatasa Alcalina</b>	35.6 ± 8.5	37.85 ± 14.7

*AST = aspartato aminotransferasa, ALT = alanino aminotransferasa*

La sangre se obtuvo por punción ocular, se determinó las transaminasas (ALT, AST y GGT) y marcadores de función hepática (bilirrubina y fosfatasa alcalina) con tiras reactivas específicas. Los valores representan el promedio ± EE de al menos 7 experimentos independientes.\*  $p \leq 0.05$  vs ratones alimentados con la dieta chow.



**Figura 1. La dieta HC incrementa el contenido de colesterol libre y TG en los hepatocitos.** Cultivo primario de hepatocitos de ratón alimentados con dieta chow y HC. La figura A) y B) muestran la morfología de los hepatocitos de ratón chow y hepatocitos de ratón HC respectivamente; D) y F) detección de colesterol libre con filipina (0.05 mg/ml). E) y F) detección de TG con aceite rojo O contrastado con cristal violeta. G) Determinación del contenido de rojo O. Las imágenes tienen un aumento de 200x y son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Las columnas muestran el promedio de la absorbancia  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de ratones alimentados con la dieta chow.

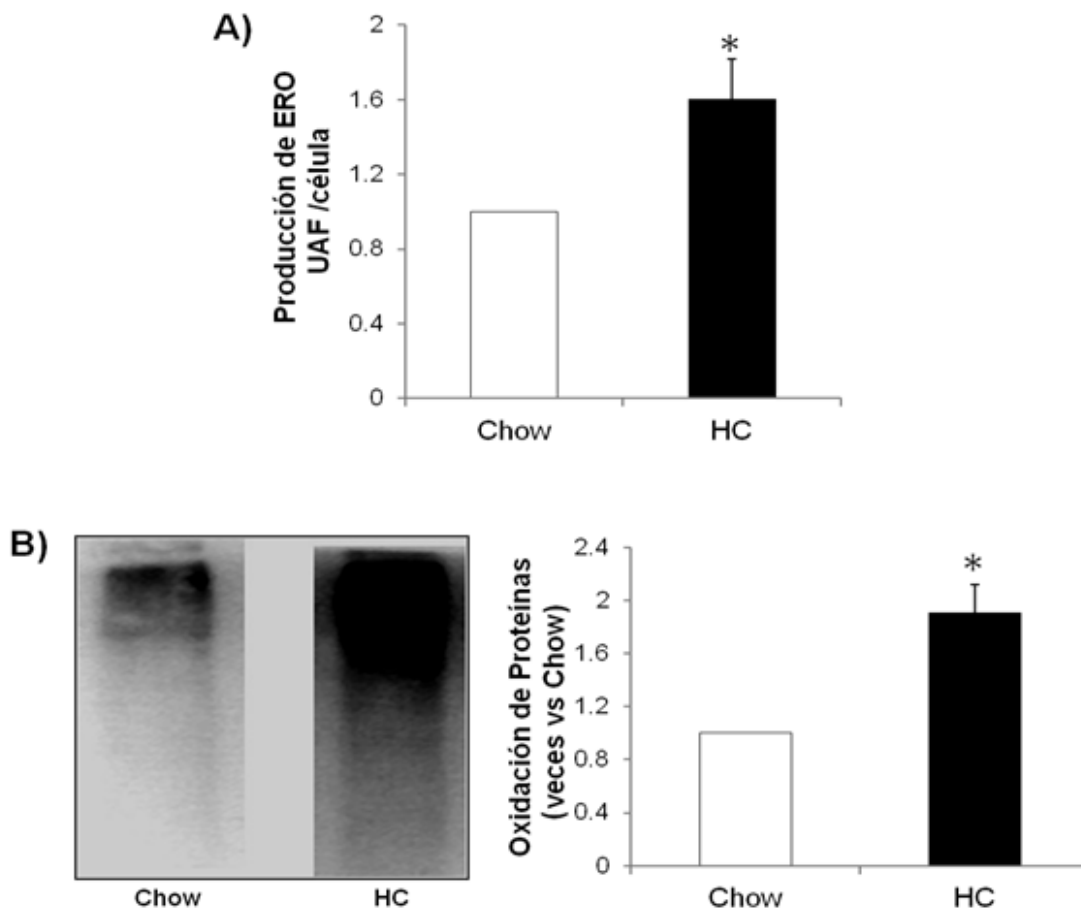


A continuación procedimos a evaluar el efecto oxidante de la dieta HC determinando la generación de peróxidos por una técnica fluorométrica empleando DCFH-DA (figura 2A) y por la oxidación de proteínas en la cual se usó el estuche comercial Oxyblot™ (figura 2B). Los resultados muestran que la dieta HC elevó significativamente la producción de peróxidos y la oxidación de proteínas dejando evidencia de que la dieta hipercolesterolémica está generando el incremento de especies oxidantes que inducen daño celular, juzgado por la oxidación de proteínas.

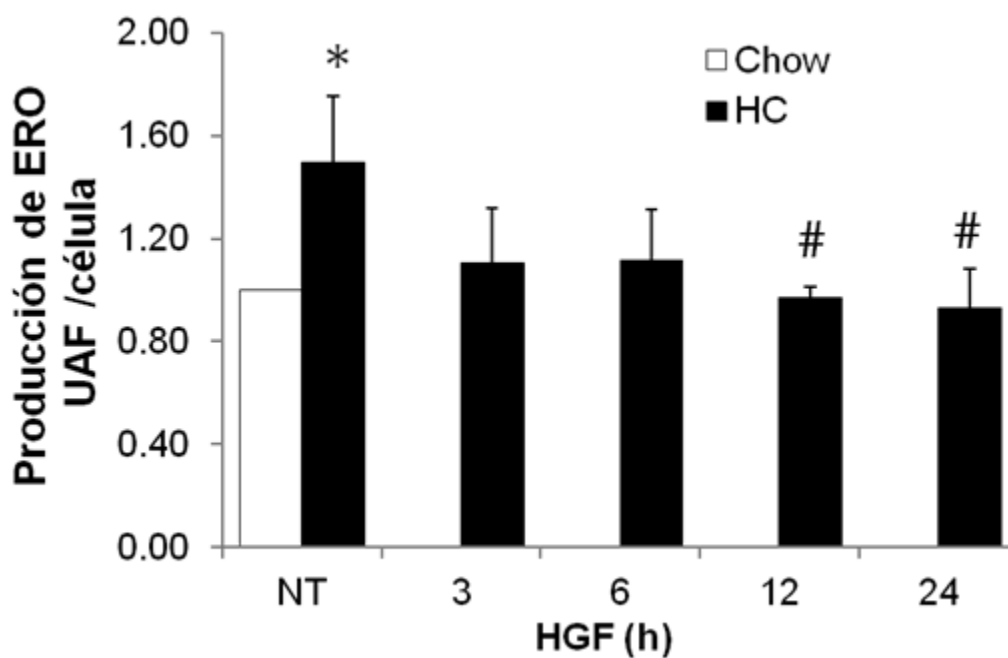
Previamente nuestro grupo de investigación ha demostrado que el factor de crecimiento de hepatocitos induce una respuesta de sobrevivencia y reparación por medio de la inducción de proteínas antioxidantes y antiapoptóticas (Kaposi-novak et al., 2006; Gómez-Quiroz et al., 2008), incluso es capaz de proteger contra los efectos citotóxicos del etanol (Valdés-Arzate et al., 2009), por lo que realizamos una serie de experimentos tendientes a conocer si el HGF revierte el daño oxidante inducido por la dieta HC.

En la figura 3 se puede observar que el HGF revierte la producción la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales disminuyen en los hepatocitos HC desde las 12 hasta las 24 h, esto se relacionó con una disminución en las proteínas oxidadas (figura 4).

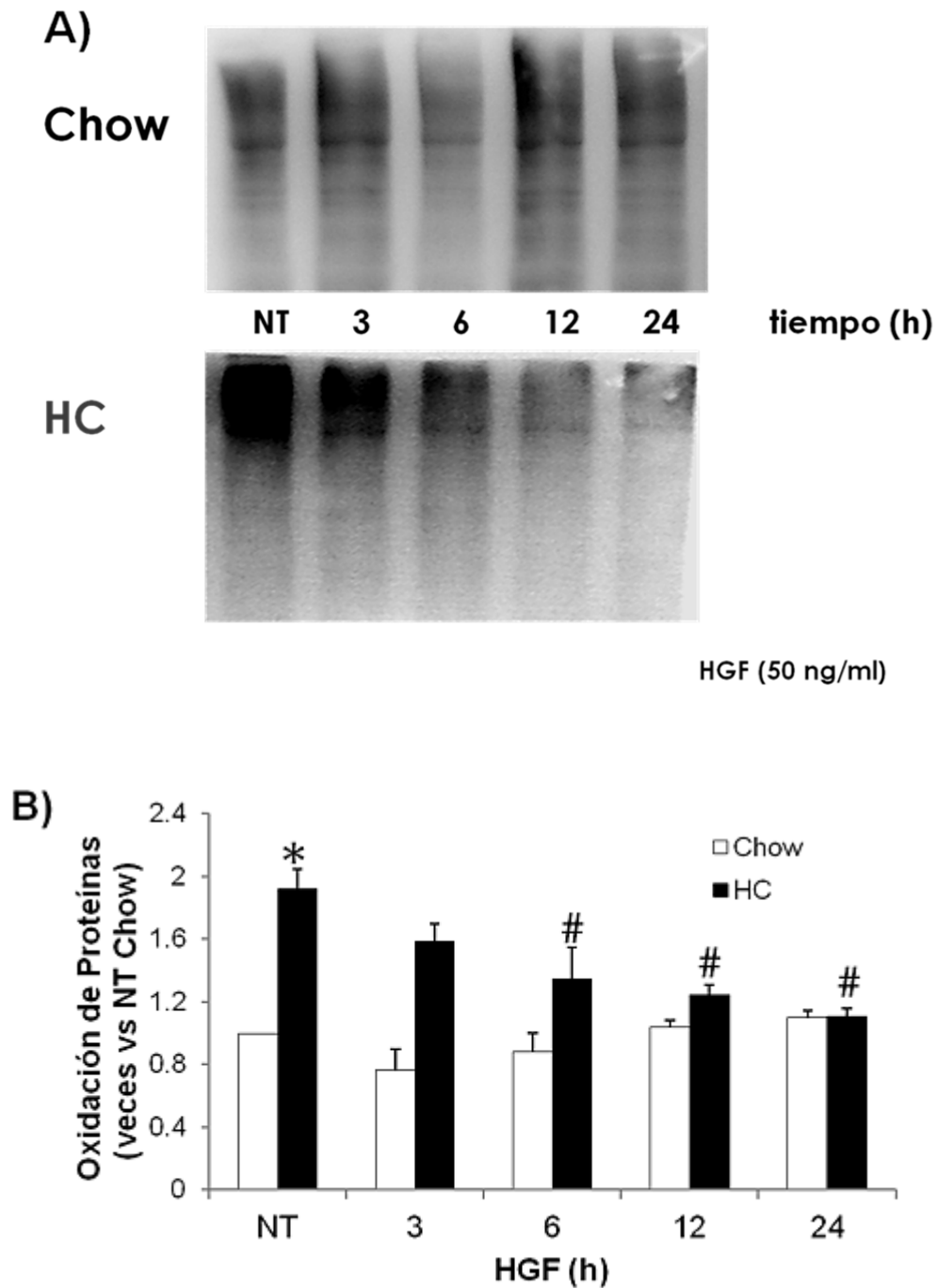
El oxiblot (Fig. 4A) muestra que la oxidación de las proteínas va disminuyendo de manera dependiente del tiempo de exposición con HGF. Los datos obtenidos muestran que el HGF disminuye el contenido de los grupos carbonilos de las proteínas a partir de las 6 h y se mantiene a las 12 h (1.3 y 1.1 veces respectivamente) llegando hasta niveles basales a las 24 h (figura 4B).



**Figura 2. Determinación de ERO y proteínas oxidadas en hepatocitos de ratón alimentados con una dieta alta en colesterol.** Cultivo primario de hepatocitos de ratones alimentados con la dieta chow y HC. A) La producción de peróxidos se determinó por medio de DCFH-DA (5 $\mu$ M) midiendo la intensidad de la fluorescencia. C) La determinación de la oxidación de proteínas fue determinada por el contenido de grupos carbonilo con un ensayo comercial Oxyblot. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de al menos 4 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta chow.



**Figura 3. Efecto del HGF sobre la producción de ERO.** Las células se trataron o no con HGF (50ng/ml) durante 3, 6 12 y 24 h. La producción de peróxidos se determinó por medio de DCFH-DA (5 $\mu$ M) midiendo la intensidad de la fluorescencia. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta chow. #  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos HC no tratados.



**Figura 4. Efecto del HGF sobre la reversión en la oxidación de proteínas en los hepatocitos HC.** Las células se trataron o no con HGF (50ng/ml) durante 3, 6 12 y 24 h. A) La oxidación de proteínas fue determinada por el contenido de grupos carbonilo con un ensayo comercial Oxyblot siguiendo las instrucciones del fabricante. B) Efecto del HGF en oxidación proteica de hepatocitos chow y HC. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta chow. #  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos HC no tratados.

## **VI.2 Regulación diferencial del HGF sobre las enzimas SOD1 y**

### **Catalasa en hepatocitos HC.**

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que el HGF tiene un efecto protector induciendo a diversas enzimas antioxidantes (Gómez-Quiroz et al., 2008; Valdés-Arzate et al., 2009), el siguiente objetivo fue determinar estado de que guarda el sistema antioxidante, particularmente la superóxido dismutasa 1, la catalasa y las proteínas relacionadas con el glutatión, en los hepatocitos con sobrecarga de lípidos, así como el efecto de HGF sobre éstas.

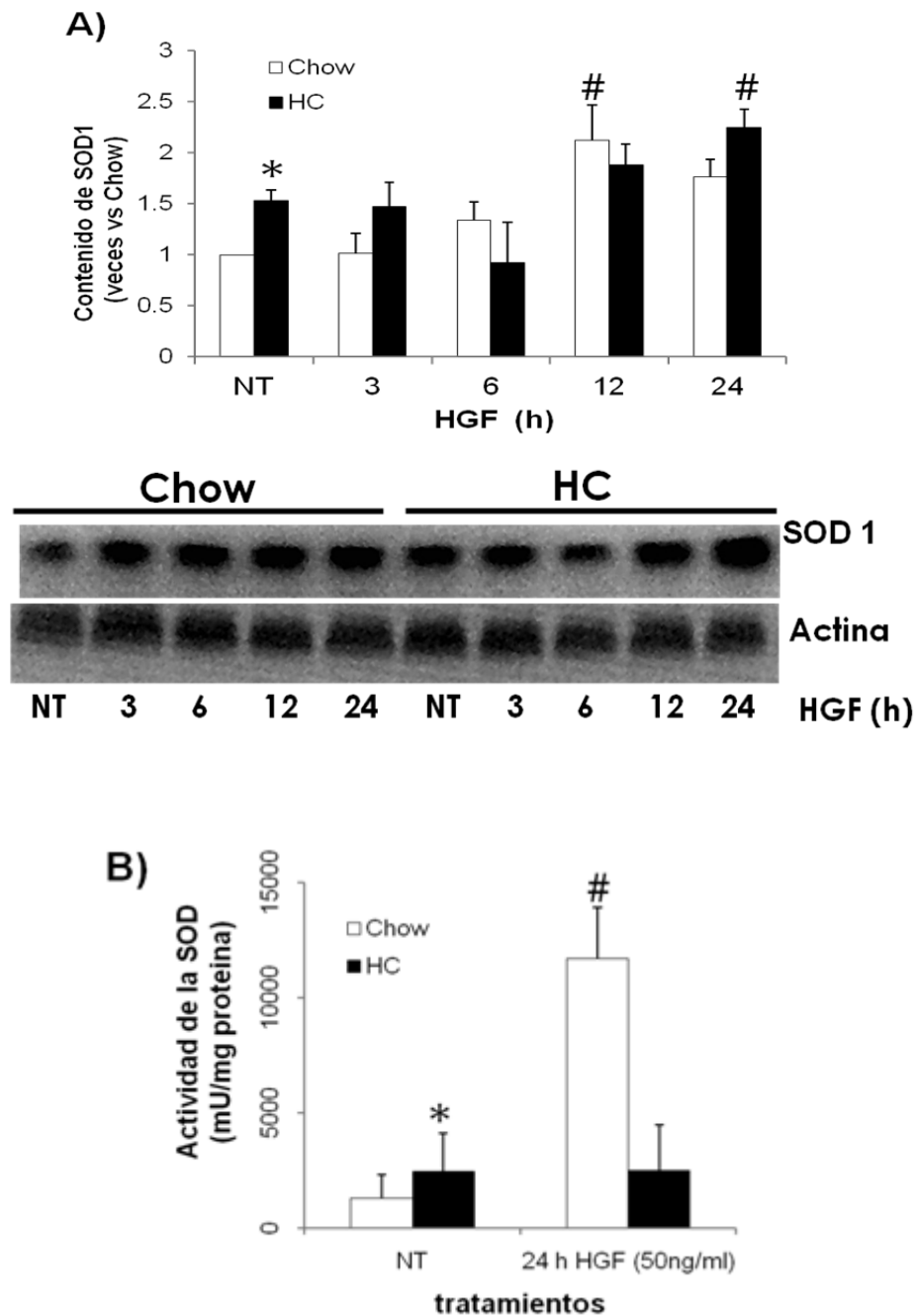
Las figuras 5A y 6A muestran un incremento de 1.5 veces en el contenido proteico de las enzimas SOD1 y catalasa en los hepatocitos HC no tratados con respecto a los hepatocitos chow no tratados. Al evaluar la actividad de estas enzimas se observa en las figuras 5B y 6B un incremento de 2 y 6 veces en la actividad de la SOD1 y de la catalasa respectivamente en los hepatocitos HC con respecto a los hepatocitos chow no tratados.

Asimismo evaluamos el efecto de HGF y observamos que HGF induce la expresión de la SOD1 tanto en los hepatocitos chow como en los hepatocitos HC. Hay un incremento en el contenido de la SOD1 de 2.1 veces en hepatocitos chow y 2.2 veces en los hepatocitos HC (Fig. 5A) a las 12h y 24h respectivamente comparados con las células no tratadas con HGF. Aunque el HGF induce el contenido de la SOD1 a las 24 h en hepatocitos HC no se asoció con la actividad de la enzima. En la figura 5B se observa que el HGF no tiene un efecto significativo en la actividad de la SOD en los hepatocitos HC tratados a las 24h, en comparación con los hepatocitos chow, no obstante la actividad de la SOD no

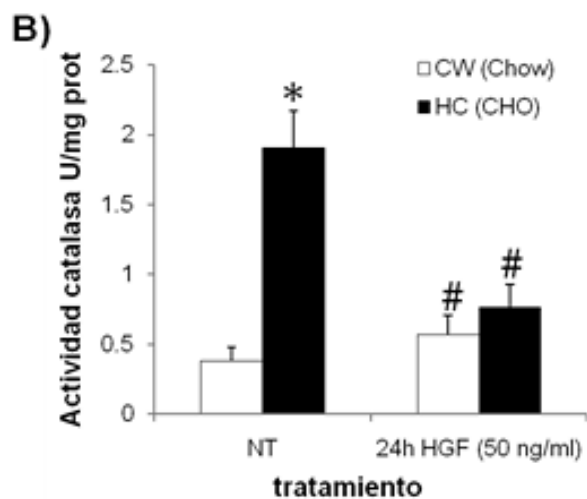
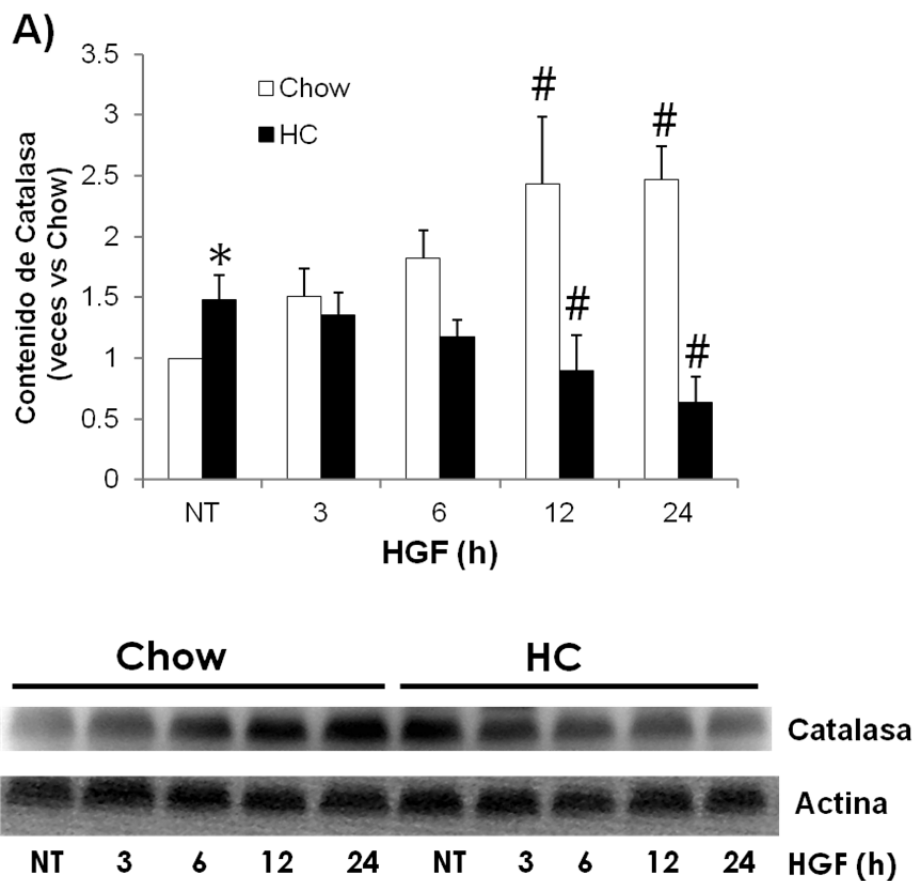
esta del todo disminuida, indicando que aún hay una buena transformación del radical superóxido a  $H_2O_2$ , por la célula.

Por otro lado, se observa en la figura 6A que el HGF induce la expresión de la catalasa de manera dependiente del tiempo en los hepatocitos chow teniendo un máximo de 2.4 veces a las 12 h y manteniéndose hasta las 24 h con respecto a las células no tratadas del ratón chow. Este efecto de HGF se ve reflejado en la actividad de la catalasa que se incrementa 2 veces en los hepatocitos chow, sin embargo, al tratar las células HC, se observa que el HGF tiene un efecto contrario. El contenido y actividad de la catalasa disminuye un 40 y 60% respectivamente a las 24 h de exposición con HGF con respecto a los hepatocitos HC sin tratamiento (Fig. 6). Lo cual implicaría que el  $H_2O_2$  no está siendo transformado a agua por la acción de la catalasa, lo que permite la acumulación de éste.

Por lo tanto el efecto del HGF en la reversión del estrés oxidante, juzgado por la disminución en la producción de ERO y en la oxidación de proteínas es independiente de la catalasa, por lo que sugerimos que estaba determinado por un mecanismo que involucra el sistema de GSH.



**Figura 5. El efecto de HGF sobre el contenido y actividad de SOD1, en los hepatocitos HC.** Las células se trataron o no con HGF (50ng/ml) durante 3, 6 12 y 24 h. A) Análisis por Western blot de los niveles de la SOD1 a diferentes tiempos de incubación con el HGF. B) Actividad de la enzima SOD1 en hepatocitos tratadas o no por 24 h con HGF. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta chow. #  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos no tratados.



**Figura 6. Efecto de HGF sobre el contenido proteico y actividad enzimática de la catalasa en los hepatocitos HC.** Las células se trataron o no con HGF (50ng/ml) durante 3, 6 12 y 24 h. A) Análisis por Western blot de los niveles de la catalasa a diferentes tiempos de incubación con el HGF. B) Actividad de la enzima catalasa en hepatocitos tratadas o no por 24 h con HGF. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta chow. #  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos no tratados.



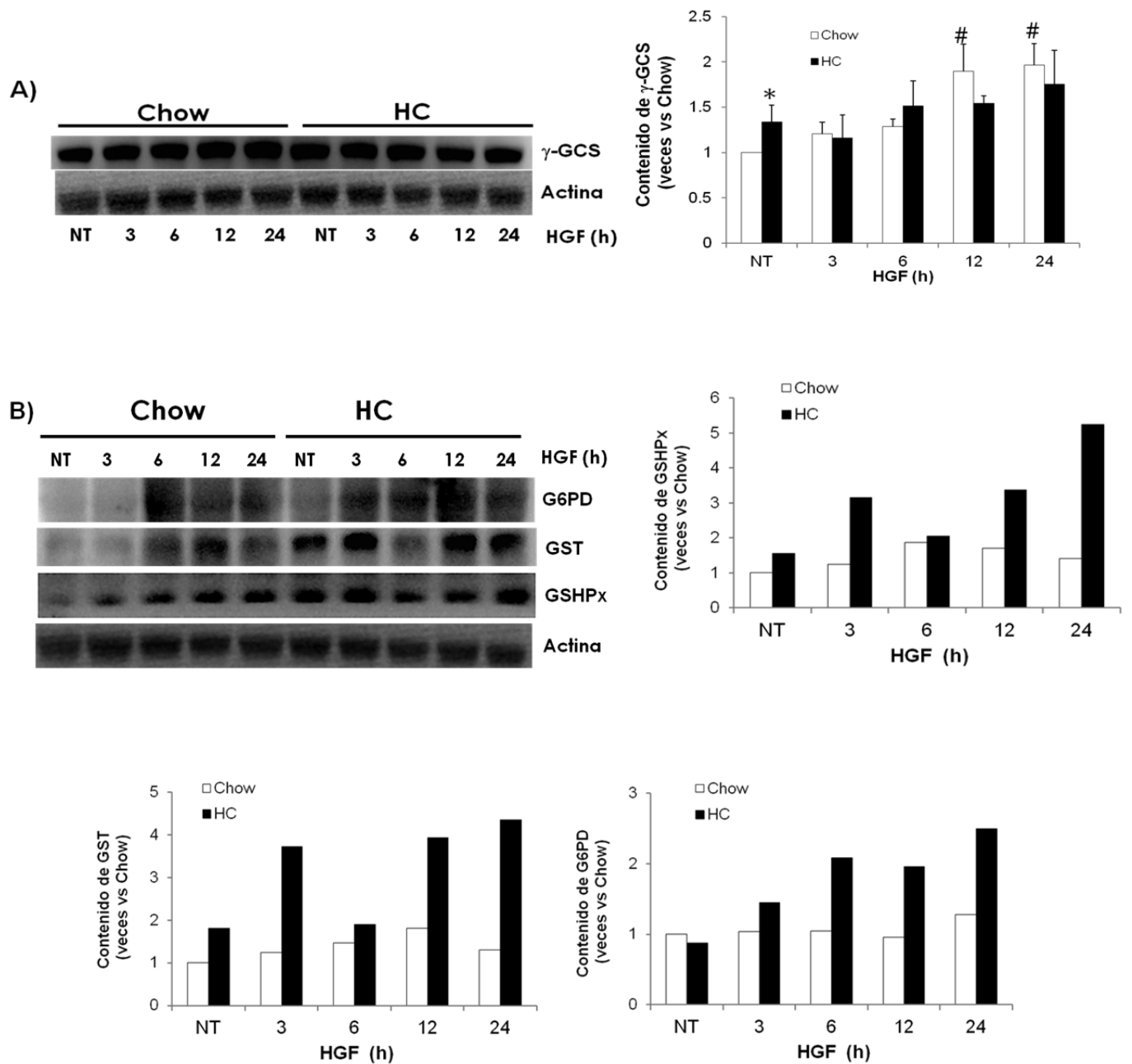
### **VI.3 El HGF incrementa el sistema de GSH para contrarrestar el estrés oxidante producido por la dieta HC.**

El GSH es la principal molécula protectora en el hígado, por lo que se decidió estudiar la concentración de GSH y de GSSG por medio del cociente GSH/GSSG, así como el contenido de la enzima  $\gamma$ -GCS considerada enzima limitante en la síntesis del GSH.

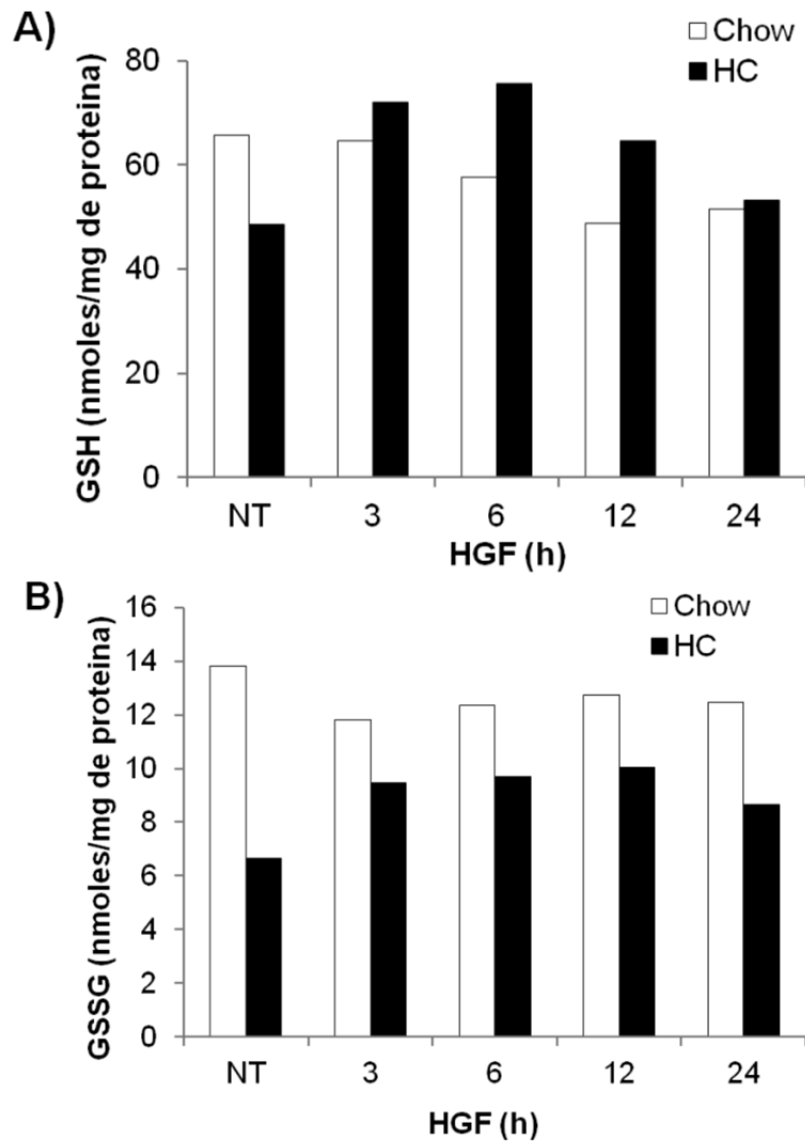
En la figura 7A se observa que el contenido de la  $\gamma$ -GCS se incrementa de manera dependiente al tiempo de exposición con HGF en los hepatocitos chow, mientras que en los hepatocitos HC no se observa ningún cambio estadísticamente significativo lo que implica que la reversión en el estrés oxidante mediada por HGF no se debe a la inducción en la síntesis de novo del GSH.

Tomando en cuenta los resultados previos, a continuación nos enfocamos a evaluar el efecto de HGF sobre las enzimas involucradas en el mantenimiento del GSH como la GSHPx, GST y G6PD. Se observa en la figura 7B una tendencia a incrementar el contenido de estas enzimas a partir de las 3h de exposición con el factor de crecimiento pero tiene una disminución a las 6h, sin embargo a las 12 h se incrementan de nuevo y se mantiene hasta las 24 h de exposición (Figura 7B). Para el caso de la G6PD, se observa en la misma figura que el aumento en el contenido de la enzima es a partir de las 3h de exposición con el HGF y este se mantiene hasta las 24 horas. El incremento de estas enzimas muestran un efecto indirecto en el reciclamiento del GSH y se le atribuya un papel importante en la reversión del estrés oxidante mediado por HGF.

Finalmente para corroborar la participación del sistema de GSH en el control del estrés oxidante, se determinó por HPLC las concentraciones de GSH reducido. La figura 8A muestra que la concentración de GSH esta disminuida en los hepatocitos HC en comparación con los hepatocitos chow, pero cuando se trata con HGF se observa un incremento a las 3 h, manteniéndose a las 12 h. La concentración de GSSG en los hepatocitos HC se encuentra disminuido con respecto a los hepatocitos Chow, y al igual que el GSH tiene un aumento a partir de las 3 h de tratamiento con HGF y manteniéndose a las 12 h (Fig. 8B).



**Figura 7. Efecto del HGF sobre el contenido proteico de las enzimas involucradas en sistema del GSH en hepatocitos HC.** Las células se trataron o no con HGF (50ng/ml) durante 3, 6 12 y 24 h. Se aisló la proteína total y la determinación del contenido de cada proteína se llevó a cabo por Western blot usando anticuerpos específicos descritos en materiales y métodos). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Cada columna representa el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes. \*  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta chow. #  $p \leq 0.05$  vs hepatocitos no tratados.



**Figura 8. Efecto del HGF sobre la regulación el sistema de GSH.** Las células se trataron o no con HGF (50ng/ml) durante 3, 6 12 y 24 h. A) Los valores absolutos de glutatión reducido (GSH) y B) los valores absolutos de glutatión oxidado (GSSG) fueron determinados por HPLC.

## VII. DISCUSIÓN

En nuestro país las enfermedades hepáticas representan la cuarta causa de muerte en la población (DGEI, Secretaria de Salud, 2007). La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es una enfermedad asintomática, sin embargo los pacientes cursan con una elevación de los marcadores séricos de daño en el hígado, incluyendo la alanina aminotransferasa (ALT), la aspartato aminotransferasa (AST), entre otras (Chen et al., 2008). Nuestros datos muestran que al administrar una dieta alta en colesterol, las enzimas ALT y AST se elevan (Tabla 1), de estas enzimas la ALT se ha postulado tener una relación con ésta patología y a menudo se usa en estudios epidemiológicos como un marcador indirecto de NAFLD (Clark, 2006; Schindhelm et al., 2006).

La NAFLD, como hemos señalado, inicia con una acumulación de grasa en el hígado que puede desencadenar una respuesta inflamatoria (Ferré et al., 2009). El grupo del Dr. Fernández Checa (Marí et al., 2006) reporta datos muy interesantes analizando el tipo de lípido, más que la cantidad del mismo, que determina la susceptibilidad del hígado graso. Los resultados muestran que el colesterol, pero no los FFA o los TG, es clave en la sensibilización al hígado a otras agresiones. Los resultados presentes en este trabajo indican que la ingesta de la dieta HC induce no solo la acumulación de colesterol si no también la de lípidos como los TG (figura 1).

La acumulación de lípidos en el hepatocito puede deberse a una alteración del metabolismo controlada principalmente por la síntesis de TG, la beta-oxidación y deficiencia en la secreción de lípidos en forma de lipoproteínas (Trauner et al., 2010; Sozio et al., 2010). Las tasas de secreción de VLDL en la NAFLD están

afectadas lo cual se relaciona con el aumento de TG en el hígado como se observa en el presente trabajo y como ha sido reportado por otros grupos (Musso et al., 2009).

Una de las consecuencias derivadas de la acumulación de lípidos en el hígado es la producción incrementada de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (Videla et al., 2004) (Fig. 2B) las cuales además de generar daño celular también dispararan una respuesta inflamatoria (Matsunami et al., 2010; Neuschwander-Tetri, 2010), que eventualmente incrementa aún más el daño por ERO.

Entre las primeras consecuencias que se originan por la sobre producción de ERO y una deficiencia en su detoxificación se encuentran la oxidación de macromoléculas, proteínas principalmente (figura 2C) (Han et al., 2006), de hecho se ha reportado que los pacientes con esteatosis no alcohólica presentan un índice más alto en la oxidación de proteínas en el hígado debido a la unión con hierro que favorece la interacción de las proteínas con las ERO para producir la formación de carbonilos, y así puede agravar el daño oxidante en el hígado (Videla et al., 2004).

La lipoperoxidación es una de las consecuencias del daño oxidante que promueven la progresión de NAFLD a NASH, fibrosis o cirrosis. Hardwick y cols. (2010) reportaron que la ausencia en la oxidación lípidica en biopsias de pacientes con NAFLD es por la formación del 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), con una isoforma de GST (GST-P) lo cual implicaría la detoxificación de éste subproducto de la lipoperoxidación. Resultados similares encontramos en los hepatocitos HC en donde observamos que un aumento en el contenido de la glutatión-s-transferasa (GST) (Fig. 8) se asocia con la ausencia del grado de lipoperoxidación (dato no

mostrado) en los hepatocitos HC. Esta enzima pertenecen a la familia de enzimas de fase II y esta involucrada en la conjugación de una gran variedad de xenobióticos, nucleófilos electrofílicos, medicamentosos entre otros por la catálisis de la enzima. Esta acción facilita la exportación de medicamentos, xenobióticos, etc. a través de las sales biliares para su degradación (Yang et al. 2001).

Recientemente se ha reconocido al HGF como protector celular contra los efectos adversos del colesterol (Yu et al., 2010) y ácidos grasos (Santangelo et al., 2007), inclusive su participación en la regulación del metabolismo de los lípidos, así como la estimulación de la síntesis de lípidos y lipoproteínas de secreción (Kaibori et al., 1998; Kosone et al., 2007), sin embargo a la fecha, no se ha estudiado el efecto de HGF/c-Met en el control del estrés oxidante debido a una acumulación de lípidos. Nosotros observamos que en los hepatocitos provenientes de los ratones alimentados con la dieta hipercolesterolémica al ser tratados con HGF disminuye la generación de ERO (figura 3) que finalmente se ve reflejado en una disminución en la oxidación de proteínas (figura 4B), esto concuerda con el efecto protector de HGF observado en otros tipos celulares (Arends et al., 2008; Valdés-Arzate et al., 2009; Yu et al., 2010).

Se ha reportado que la mitocondria es la principal fuente de una constante generación de ERO en la esteatosis no alcohólica (Marí et al., 2006), pero la célula también ha desarrollado un sistema antioxidante para contrarrestar la producción de radicales de oxígeno tóxicos que pueden causar daño celular. Permeluter y cols. (2005) reportaron que la actividad de la catalasa y SOD 1 están incrementadas en pacientes con NAFLD, nosotros encontramos un efecto similar, en donde el contenido y actividad de la catalasa y SOD1 se encuentran elevadas (figura 5B y

6B) en los hepatocitos HC no tratados, éstas enzimas intervienen en la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y transformación del peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) a oxígeno y agua, sin embargo el incremento de estas enzimas no es suficiente para compensar el daño ocasionado por la acumulación de lípidos.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que el HGF y su receptor c-met pueden inducir la transcripción de enzimas antioxidantes involucrados en la regulación del estrés oxidante (Gómez-Quiroz et al., 2008; Valdés-Arzate et al., 2009). Debe de existir un control en la generación de ERO por los antioxidantes, para mantener equilibrio crítico y evitar la sobre generación de oxidantes como el  $H_2O_2$ .

En el presente trabajo observamos que HGF induce el contenido proteico de SOD1, y mantiene su actividad similar a sus niveles basales en los hepatocitos HC (Figura 5B). La dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  puede conducir a un incremento neto de  $H_2O_2$ , si la acumulación de este no se limita participa en una cadena de reacciones (Haber-Weiss-Fenton) que generan los radicales libres más reactivos, por ejemplo, el radical hidroxilo (Marí et al., 2010). Por ello existen mecanismos de detoxificación del  $H_2O_2$ , evitando así la formación de radicales hidroxilo, tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSHPx). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en las células HC disminuyen su contenido y actividad de la catalasa al ser estimuladas con HGF (Figura 6B), indicando que la catalasa no interviene la reducción del estrés en los hepatocitos HC. También observamos que la actividad de la SOD1 no esta del todo afectada a las 24 h de exposición con HGF, indicando una buena transformación del radical superóxido a  $H_2O_2$ , por la



célula, sin embargo, este peróxido no es detoxificado por la catalasa, lo que permitiría la acumulación del  $H_2O_2$ . Estos resultados nos sugieren que la disminución en las concentraciones las ERO principalmente de  $H_2O_2$  (figura 3), es debido a la participación de la glutatión peroxidasa (GSHPx), otra enzima capaz de transformar al  $H_2O_2$ .

En este trabajo evaluamos el efecto de HGF en el contenido de la GSHPx, y observamos un incremento en los hepatocitos HC no tratados comparados con los hepatocitos chow, pero aunque tiene una disminución a las 6h como efecto del HGF, este incremento se restablece de nuevo a las 12 h y se mantiene hasta las 24 h de tratamiento con HGF. La GSHPx actúa a concentraciones bajas de  $H_2O_2$  como esta reportado por Inoue et al., (2009). Para la modulación de la conversión del  $H_2O_2$  en oxígeno molecular y agua, la GSHPx utiliza al glutatión (GSH) como sustrato.

Por otra parte, se ha reportado que el HGF indujo la expresión del gen de  $\gamma$ -GCS en cardiomiocitos y células epiteliales del ducto biliar (Tsuboi, 1999; Arends y cols. 2007). Nuestros datos concuerdan con estas observaciones en los hepatocitos chow, sin embargo en los hepatocitos HC se observa que no hay un efecto de HGF sobre el contenido de  $\gamma$ -GCS, lo que sugiere que la disminución en el estrés oxidante no depende del incremento en la síntesis de novo del GSH.

Se sabe que en gran medida, que la reversión del daño producido por los RL, se debe a un incremento en el contenido de GSH, ya sea por una eficiencia en la síntesis *de novo*, o por una apropiada restauración del glutatión oxidado (GSSG) (Fernandez-Checa et al., 2005; Marí et al., 2010).

El NADPH sirve como la principal fuente reductora en el cuerpo y muchas reacciones de óxido-reducción, incluyendo la reducción de GSSG se llevan a cabo mediante la oxidación de NADPH en  $\text{NADP}^+$ . (Wu et al. 2011). Nuestros datos sugieren la participación indirecta de la G6PD en la restauración del GSSG, como se puede observar en la figura 7B, hay un incremento en la enzima glucosa-6-fosfato (G6PD) en los hepatocitos HC debido a que la mayor parte de los NADPH en la célula son generados por la vía de las pentosas fosfato, durante la fase oxidativa, a partir de G6PD obtenida mediante la fosforilación de la glucosa libre (Han et al., 2006). Finalmente evaluamos las concentraciones de GSH, el cual es considerado como el principal protector antioxidante contra estrés oxidativo en el hígado, es sintetizado en el citosol en respuesta múltiples factores, incluido el estrés oxidativo y factores de crecimiento (Fernández-Checa et al., 2005). Nuestro grupo de trabajo reportó que en hepatocitos knock-out de c-Met presentaron un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis inducida por Fas que fue evitado por el tratamiento con N-Acetil-L-Cisteína (NAC), el cual es un precursor de GSH y un antioxidante (Gomez-Quiroz y cols. 2008). En los datos obtenidos en este trabajo se observa (figura 8A) una tendencia a elevar la concentración del GSH en los hepatocitos HC tratados con HGF.

En conclusión, el presente trabajo soporta el papel fundamental del HGF en la reversión del daño y estrés oxidante producido por la acumulación de lípidos, por un mecanismo independiente de la acción de la catalasa y dependiente del sistema de GSH.

## **VIII. CONCLUSIONES**

**VIII.1** La dieta hipercolesterolémica produce estrés oxidante en los hepatocitos debido a la acumulación de lípidos.

**VIII.2** El sistema antioxidante se eleva en respuesta a la acumulación de lípidos en los hepatocitos HC, sin embargo este incremento no es suficiente para contrarrestar el incremento en las especies reactivas de oxígeno y oxidación proteica.

**VIII.3** El efecto de reversión del HGF contra el daño oxidante ocasionado por la alteración del metabolismo de lípidos, fue mediado por un mecanismo dependiente de la activación del sistema de GSH.

## IX. REFERENCIAS

- Arends B., Slump E., Spee B., Rothuizen J., Penning L.C. (2008). Hepatocyte growth factor improves viability after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in bile duct epithelial cells. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 324-330.
- Balaban Y. H., Sumer H., Simsek H., Us D., Tatar G. (2006). Metabolic syndrome, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and hepatocyte growth factor (HGF). *Annals of hepatology: official journal of the Mexican Association of Hepatology*, 5(2), 109-114.
- Byrne C. D., Olufadi R., Bruce K. D., Cagampang F. R., Ahmed M. H. (2009). Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical science*, 116(7), 539-564.
- Chen Z., Chen L., Dai H., Chen J. Fang L. (2008). Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 9(8), 616-622.
- Clark, J.M. (2006). The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol*, 40(3): S5-S10.
- Donnelly K.L., Smith C.I., Schwarzenberg S.J., Jessurun J., Boldt M.D., Parks E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest* 115, 1343-1351.
- Eckardstein A. Von, Nofer J.R., Assmann G. (2001). High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis thrombosis and vascular biology* 21:13-27.
- Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N. (2005). Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204:263-273 .
- Ferré N., Martínez-Clemente M., López-Parra M., González-Pérez A., Horrillo R., Planagumà A., Camps J., Joven J., Tres A., Guardiola F., Bataller R., Arroyo V., Clària J. (2009). Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice: potential involvement of oxysterols. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296:G553-562.
- Funakoshi H., Nakamura T. (2003). Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 327(1-2), 1-23.
- Gomez-Quiroz, L.E., Factor, V.M., Kaposi-Novak, P., Coulouarn, C., Conner, E.A., Thorgeirsson, S.S. (2008). Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 14581-14589.
- Han D., Hanawa N., Saberi B., Kaplowitz N. (2006). Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 291:G1-7.

Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R. (2005). Glutathione transferases. Annual review of pharmacology and toxicology, 45, 51-88.

Hu Y.W., Zheng L., Wang Q. (2010). Regulation of cholesterol homeostasis by liver X receptors. Clin. Chim. 411(9-10), 617-625.

Ikonen E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Nature reviews. Molecular cell biology, 9(2), 125-138.

Inoue M. (2009). Protective Mechanism Against Reactive Oxygen Species. En The Liver Biology and Pathobiology, Arias I, Boyer J., Chisari F., Fausto N., Schachter D., Shafritz D., ed. Reino Unido: Lippincot Williams and Wilkins., 443-454.

Jou J., Choi S.S., Diehl A.M. (2008). Mechanisms of Disease Progression in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Liver 28:370-379.

Kachadourian R., Pugazhenti, S., Velmurugan, K., Backos, D. S., Franklin, C. C., McCord, J. M., Day, B. J. (2011). 2',5'-Dihydroxychalcone-induced glutathione is mediated by oxidative stress and kinase signaling pathways. Free radical biology & medicine, 51(6), 1146-1154.

Kaibori M., Kwon H., Oda M., Kamiyama Y., Kitamura N., Okumura T. (1998). Hepatocyte growth factor stimulates synthesis of lipids and secretion of lipoproteins in rat hepatocytes. Hepatology (Baltimore, Md.) 27:1354-1361.

Kang S., Davis R. (2000). Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. Biochimica et biophysica acta 1529:223-230.

Kaposi-novak P., Lee J., Gómez-Quiroz L.E., Coulouarn C., Factor V.M., Thorgeirsson S.S. (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. Gene Expression Patterns 116.

Kershenovich D. (2005). Hígado. Estructura y unidades funcionales. En Fisiología Médica, René Drucker Colín Editor, ed. México: Manual Moderno, 427-434.

Kmieć Z., (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. Advances in anatomy embryology and cell biology, 161, III-XIII, 1-151.

Kosone T., Takagi H., Horiguchi N., Ariyama Y., Otsuka T., Sohara N., Kakizaki S., Sato K., Mori M. (2007). HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 293:G204-210.

Looma, R., Sirlin, C.B., Schwimmer, J.B., Lavine, J.E. (2009). Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 50, 1282-1293.

Lu S.C. (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13:1169-1183.

Ludwig J., Viggiano T.R., McGill D.B., Oh B.J. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 55, 434-438.

Mari M., Caballero F., Colell A., Morales A., Caballeria J., Fernandez A., Enrich C., Fernandez-Checa J.C., Garcia-Ruiz C. (2006). Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 4, 185-198.

Marí M., Colell A., Morales A., Montfort C., Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. (2010). Redox control of liver function in health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 12:1295-1331.

Marsella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16:577-586.

Matsumoto K., Nakamura T. (2001). Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney international* 59:2023-2038.

Matsunami T., Sato Y., Ariga S., Sato T., Kashimura H., Hasegawa Y., Yukawa M. (2010). Regulation of oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor 2 in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *International journal of clinical and experimental pathology* 3:472-481.

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), 1-26.

Musso G., Gambino R., Cassader M. (2010). Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(6), 430-445.

Nakamura T., Sakai, K., Nakamura T., Matsumoto, K. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 26, 188-202.

Neuschwander-Tetri B. (2010). Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52:774-788.

Okada M., Sugita K., Inukai T., Goi K., Kagami K., Kawasaki K., Nakazawa S. (2004). Hepatocyte Growth Factor Protects Small Airway Epithelial Cells from Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  or Oxidative Stress. *Pediatric Research*. 56: 336-344.

Ory D. S. (2004). Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circulation research*, 95(7), 660-670.

Papeleu P., Vanhaecke T., Henkens T., Elaut G., Vinken M., Snykers S., Rogiers V. (2006). Isolation of rat hepatocytes. *Methods In Molecular Biology* Clifton NJ, 320(3), 229-237.

Pendino G.M., Mariano A., Surace P., Caserta C.A., Fiorillo M.T., Amante A., Bruno S., Mangano C., Polito I., Amato F., Cotichini R., Stroffolini T., Mele A.; ACE Collaborating Group. (2005). Prevalence and etiology of altered liver tests: a population-based survey in a Mediterranean town. *Hepatology*. 41(5):1151-1159.

Perlemuter G., Davit-Spraul A., Cosson C., Conti M., Bigorgne A., Paradis V., Corre M.P., Prat L., Kuoch V., Basdevant A., Pelletier G., Oppert J.M., Buffet C. (2005). Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 25, 946-953.

Saccone S., Narsimhan R. P., Gaudino G., Dalprà L., Comoglio P. M., Della Valle G. (1992). Regional mapping of the human hepatocyte growth factor (HGF)-scatter factor gene to chromosome 7q21.1. *Genomics*, 13(3), 912-914.

Santangelo C., Matarrese P., Masella R., Carlo M.C. , Lillo A., Scazzocchio B., Vecci E., Malorni W., Perfetti R., Anastasi E. (2007). Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. *Journal of molecular endocrinology* 38:147-158.

Schindhelm R.K., Diamant M., Dekker J.M., Tushuizen M.E., Teerlink T., Heine R.J., (2006). Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Diabetes/Metab. Res. Rev.*, 22(6), 437-443.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 150, 76-85.

Sozio M.S., Liangpunsakul S., Crabb D. (2010). The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Seminars in liver disease* 30:378-390.

Stuart K.A., Riordan S.M., Lidder S., Crostella L., Williams R., Skouteris G.G. (2000). Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int. J. Exp. Pathol*. 81, 17-30.

Sumiyoshi M., Sakanaka M., Kimura Y. (2010). Chronic intake of a high-cholesterol diet resulted in hepatic steatosis, focal nodular hyperplasia and fibrosis in non-obese mice. *Br. J. Nutr*. 103, 378-385.

Tiniakos D. G., Vos M. B., Brunt E. M. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annual review of pathology*, 5, 145-171.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology Reading Mass*, 24(9), 145-149.

Trauner M., Arrese M., Wagner M. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta Fatty liver and lipotoxicity*. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801:299-310

Trusolino L., Bertotti A., Comoglio Paolo M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(12), 834-848.

Tsuboi S. (1999). Elevation of glutathione level in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor via induction of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biochem.* 126, 815-820.

Valdes-Arzate A., Luna A., Bucio L., Licona C., Clemens D.L., Souza V., Hernandez E., Kershenovich D., Gutierrez-Ruiz M.C., Gomez-Quiroz L.E. (2009). Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 424-430.

Velde A.E., Brufau G., Groen A.K. (2010). Transintestinal cholesterol efflux. *Current opinion in lipidology* 21:167-171.

Videla L., Rodrigo R., Orellana M., Fernandez V., Tapia G., Quiñones L., Varela N., Contreras J., Lazarte R., Csendes A., Rojas J., Maluenda F., Burdiles P., Diaz J.C., Smoks G., Thielemann L., Poniachik J. (2004). Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical science*, 106(3), 261-268.

Wang D. (2007). Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annual review of physiology* 69:221-248.

Wang, Y., Zhang B., Xue Y., Li Z., Wang J., Xue C., Yanagita T. (2010). The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids in health and disease*, 9(4). 1-6.

Winterbourn C., Hawkins R., Brian M., Carrell R. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 85(2), 337-341.

Wu K., Cui J., Klaassen C. (2011). Beneficial role of nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 123(2), 590-600.

Yang Y., Cheng J.Z., Singhal S.S., Saini M., Pandya U., Awasthi S., Awasthi Y.C. (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *The Journal of biological chemistry*, 276(22), 19220-19230.



Yang S.Q., Lin H.Z., Mandal A.K., Huang J., Diehl A.M. (2001). Disrupted signaling and inhibited regeneration in obese mice with fatty livers: implications for nonalcoholic fatty liver disease pathophysiology 401. *Hepatology* 34, 694-706.

Yu X., Song M., Chen J., Zhu G., Zhao G., Wang H., Hunag L. (2010). Hepatocyte growth factor protects endothelial progenitor cell from damage of low-density lipoprotein cholesterol via the PI3K/Akt signaling pathway. *Molecular biology reports* 37:2423-2429.

Yuan L., Kaplowitz N. (2011). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Molecular aspects of medicine* 30:29-41

Zarnegar R., Marie D. (2009). Hepatocyte growth factor: its role in hepatic growth and pathobiology. En *The Liver Biology and Pathobiology*, Arias I, Boyer J., Chisari F., Fausto N, Schachter D, Shafritz D., ed. Reino Unido: Lippincot Williams and Wilkins.

Los miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **"EVALUACION DEL EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF) EN EL ESTADO REDOX CELULAR EN CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATÓN ALIMENTADOS CON UNA DIETA HIPERCOLESTEROLEMICA"**, con fecha de examen 01 de Diciembre de 2011.

## MIEMBROS DEL JURADO



**PRESIDENTE**

**Dr. Javier Barrios González**  
Departamento de Biotecnología  
Universidad Autónoma Metropolitana  
México, D.F.

P.A. 

**SECRETARIA**

**Dra. Ana Ma. Guadalupe Rivas Estilla**  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Monterrey, Nuevo León



**VOCAL**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana  
México, D.F.



**VOCAL**

**Dr. Armando Luna López**  
Departamento de Investigación Básica  
Instituto de Geriatria  
México, D.F.