



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS INDUCE EFECTOS DE
PROTECCIÓN Y DE REVERSIÓN EN PANCREATITIS AGUDA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

M. en BIOL. EXP. MAYREL PALESTINO DOMÍNGUEZ

DIRECTORA

DRA. MARÍA CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

ASESORES

DR. MARIO C. PELÁEZ LUNA

DR. JENS U. MARQUARDT

7 DE SEPTIEMBRE DEL 2018

COMITÉ TUTORAL

Directora

Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Fisiología Celular

mcgr@xanum.uam.mx

Asesores

Dr. Jens U. Marquardt

Departamento de Medicina I., Universidad Johannes Gutenberg, Mainz, Alemania

marquarj@uni-mainz.de

Dr. Mario C. Peláez Luna

Departamento de Gastroenterología

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

mariopl@prodigy.net.mx

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

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT a Mayrel Palestino Domínguez para estudios doctorales: 283757

Se contó también con una beca mixta de movilidad académica para realizar una estancia de 14 meses, del 17 de octubre del 2016 al 04 de diciembre del 2017 en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Fisiología Celular y Molecular, del Instituto de Medicina Traslacional, de la Universidad de Liverpool, Reino Unido.

La investigación presentada en esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Contó con financiamiento de CONACYT con número de proyecto **CB-2015-252942** siendo responsable técnico el Dr. **Luis Enrique Gómez Quiroz**, así como de PROMEP 913026 14612111 y de la propia Universidad.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

"El factor de crecimiento de hepatocitos recombinante provee efecto protector en pancreatitis aguda inducida por ceruleína en ratones", que presentó

Mayrel Palestino Domínguez

El día 7 de septiembre del año 2018

Dr. Mario Peláez Luna

PRESIDENTE

Departamento de Gastroenterología. Instituto Nacional de ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán

mariopl@prodigy.net.mx



Dr. Armando Luna López

SECRETARIO

Instituto Nacional de Geriátría

allbioexp@yahoo.com



Dra. María del Refugio Denise Clavijo Cornejo

VOCAL

Instituto Nacional de Rehabilitación "Dr. Luis Guillermo Ibarra Ibarra"

mrclavijo@inr.gob.mx



Dr. Benjamín Pérez Aguilar

VOCAL

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
brian_may82@hotmail.com



Índice

AGRADECIMIENTO	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
HISTORIA DEL PÁNCREAS	9
EL PÁNCREAS	10
CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS	12
CÉLULAS DUCTALES PANCREÁTICAS.....	13
CÉLULAS DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS.....	14
SEÑALIZACIÓN DE CALCIO EN CÉLULAS ACINARES	14
LA PANCREATITIS AGUDA	17
EL ESTADO REDOX CELULAR Y EL ESTRÉS OXIDANTE.....	19
EL HGF COMO REGULADOR MAESTRO DEL ESTADO REDOX CELULAR Y EL ESTRÉS OXIDANTE.....	20
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
MODELO DE PREVENCIÓN.....	26
MODELO DE REVERSIÓN.....	27
MODELO DE PANCREATITIS AGUDA INDUCIDA POR L-ARGININA.....	28
RESPUESTA AL HGF DEPENDIENTE DEL TIEMPO.....	29

COCIENTE PÁNCREAS PESO CORPORAL.....	29
HISTOLOGÍA.....	29
ACTIVIDAD DE ALFA AMILASA PANCREÁTICA	30
CUANTIFICACIÓN DE LIPASA PANCREÁTICA	30
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	31
INMUNOBLOT	31
LIPOPEROXIDACIÓN	34
ENSAYO DEL CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)	34
EXPRESIÓN DE C-MET POR RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	36
DETERMINACIÓN DE ERO <i>IN SITU</i>	37
DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN	37
ACTIVIDAD DE CASPASA 3.	38
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.	39
INGRESO DE PACIENTES Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS SÉRICAS.	39
DETERMINACIÓN DE HGF EN MUESTRAS SÉRICAS DE PACIENTES.....	43
AISLAMIENTO DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS DE RATÓN PARA MICROSCOPIA CONFOCAL CON INDICADOR A CALCIO.	44
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
RESULTADOS.....	47
EL TRATAMIENTO CON CN INDUCE UN INCREMENTO DE HGF EN SUERO Y LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE C-MET.....	47
EL HGF ACTIVA RUTAS DE SOBREVIVENCIA E INCREMENTA LA DEFENSA ANTIOXIDANTE EN RATONES.	48
EL HGF PROVEE PROTECCIÓN CONTRA LA PANCREATITIS AGUDA	50
EL HGF DESPLIEGA UNA RESPUESTA ANTIOXIDANTE QUE CONTRARRESTA EL ESTRÉS OXIDANTE INDUCIDO POR LA CN.	54
EL HGF INDUCE PROTECCIÓN ANTI-APOPTÓTICA EN EL MODELO DE PA.	57
EL HGF MODULA LA ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS STAT3, ERK1/2 Y AKT ASÍ COMO A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CANÓNICOS EN LA PA.	59
EL HGF COMPENSA EL DAÑO CAUSADO POR LA CN EN UN MODELO DE REVERSIÓN DE PA.	63

EL HGF CONTRARRESTA AL ESTRÉS OXIDANTE INDUCIDO POR LA CN EN UN MODELO DE REVERSIÓN	65
EL HGF ACTIVA RUTAS DE SOBREVIVENCIA Y REGULA ENZIMAS PRODUCTORAS DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS EN EL MODELO DE REVERSIÓN.....	67
LOS NIVELES DE HGF SE INCREMENTAN EN PACIENTES CON PANCREATITIS	68
EL HGF INDUCE SEÑALIZACIÓN POR CALCIO EN CÉLULAS ACINARES, ESTA SEÑALIZACIÓN SE INHIBE AL ADMINISTRAR CAFEÍNA.	70
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIÓN	87
PERSPECTIVAS	88
DATOS SUPLEMENTARIOS	88
REFERENCIAS	90

Agradecimiento

A la ***Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz***, por ser mi directora y todo el apoyo que me ha dado desde el inicio de mi formación científica.

Al ***Dr. Luis E. Gómez Quiroz*** por la idea y oportunidad de trabajar con un maravilloso proyecto de páncreas, y por impulsar enormemente mi desarrollo como científica.

Al ***Dr. Mario Peláez Luna***, por su apoyo y asesoría en la presente tesis, y por proveernos de muestras humanas que son invaluable para corroborar lo básico en lo clínico....

Al ***Dr. Alexei Tepikin y Dr. John Neoptolemos*** thank you so much for the great and invaluable opportunity to learn from the very best scientists in pancreas all over the world, and make me feel at home during my stay at the University of Liverpool.

A la ***Dra. Svetlana Voronia***, thank you so much for encourage the discipline, for all the knowledge you shared with me about the pancreas and many amazing techniques. Thank you for the personal support and much more in Liverpool.

Al ***Dr. Jens Marquardt***, thank you very much for all the great kind support during my PhD training.

Al ***M. en B.E. Roberto Lazzarini*** y a la unidad de microscopia confocal de la DCBS, UAMI, por las histologías y microscopia confocal.

Al ***Dr. Tony Parker***, thank you for let me help in your research project and been a great colleague at the University of Liverpool.

A la ***M. en B.E. Atzin Balderas*** por alentarme en los experimentos más difíciles y ser una compañía muy agradable en el laboratorio, gracias por brindarme tu valiosa amistad.

A ***mis padres; Elía y Eliseo, a mis hermanos; Yahid y Sofía*** por siempre alentarme a seguir adelante y trabajar con más entusiasmo cuando las cosas no van bien. Por la alegría y orgullo que me hacen sentir.

Al ***Lic. en B. E. Aldo Hernández Lozano*** por siempre escuchar y ayudarme a crear nuevas ideas de investigación, por el apoyo incondicional, por rescatarme del laboratorio en las madrugadas y fines de semana (también en Liverpool). Por la maravillosa compañía a distancia, durante un año en mi estancia en la Universidad de Liverpool.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Akt: Serin-treonin cinasa B

PA: Pancreatitis aguda

AP1: Proteína activadora 1

ATP: Adenosín trifosfato

ATPasa: Enzimas que catalizan la descomposición de ATP en ADP y fosfato

Bax: Proteína X Asociada a Bcl-2

Bcl2: Linfoma de células-B 2

Ca²⁺: Calcio

CCK: Colecistoquinina

CFTR: Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

c-Jun: Miembro de la familia de factores de transcripción AP-1

Cl⁻: Ion cloruro

c-Met: Receptor al factor de crecimiento de hepatocitos, proto-oncogen inductor de la transición epitelio mesénquima celular

Cn: Ceruleína

Cox: Ciclooxygenasa

Elisa: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Erk1/2: Cinasa regulada por señales extracelulares

ERO: Especies reactivas de oxígeno

G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

γ-GCS: Gamma-glutamil cistein sintasa

GPX: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSS: Glutación oxidado

GSTM: Glutación transferasa de mamíferos

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HO-1: Hemoxigenasa 1

HRP: Peroxidasa de rábano picante

ip: Intraperitoneal

iv: Intravenoso

JNK: C-Jun N-terminal cinasas

L-Arg: L-Argina,

Mcl-1: Secuencia 1 de células de leucemia mieloide

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NQO1: NAD(P)H Quinona Oxidoreductasa 1

Nrf2: Factor relacionado al factor nuclear eritroide 2

p38: Proteína cinasa activada por mitógenos 38

PI3K: Fosfatidil-inositol 3-cinasa

SOD1: Superóxido dismutasa 1 [Cu-Zn]

Stat3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

Trx1: Tiorredoxina 1

Resumen

La pancreatitis aguda (PA) es una enfermedad multifactorial asociada a grandes cambios en el páncreas, inducidos por la liberación de enzimas digestivas que conducen a un incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, excesiva necrosis tisular, edema, y sangrado. Niveles elevados del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor inductor de la transición epitelio mesénquima celular (c-Met) se han observado en diversas enfermedades pancreáticas crónicas y agudas, incluyendo modelos experimentales de PA.

El HGF ha sido ampliamente caracterizado por nuestro grupo de investigación como un maestro modulador del estado redox celular y estrés oxidante, particularmente en el hígado. El HGF ejerce sus efectos por la inducción de una gran variedad de proteínas protectoras, como son antioxidantes, detoxificantes de fase II y III, proliferación y reparación. Aunque estos efectos están mayormente descritos en el hígado, en el páncreas permanecen escasamente estudiados.

En el presente estudio, investigamos el efecto protector inducido por el HGF recombinante humano en un modelo murino de PA inducida por ceruleína (Cn). Se indujo pancreatitis por la administración de 8 inyecciones supramáximas de Cn (50 µg/kg, ip). El tratamiento con HGF (20 µg/kg, iv), significativamente redujo el contenido de lipasa y la actividad de amilasa en suero, así como el grado de inflamación y edema en general, conduciendo menores cambios histológicos como necrosis, inducida por la Cn. Los efectos protectores del HGF fueron asociados con la activación de rutas de supervivencia como Akt, Erk1/2 y Nrf2 así como un

incremento en proteínas ejecutoras relacionadas a sobrevivencia y la disminución en proteínas proapoptóticas. Además, la disminución en el contenido de ERO y lipoperoxidación, asimismo incremento en la síntesis de glutatión en páncreas. Se observó protección sistémica juzgado por la histología del pulmón, debido a que en la PA severa puede desencadenar un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria y síndrome de disfunción multiorgánica, en el presente trabajo se corroboró la manifestación de dichos signos de daño mediante el análisis histológico del pulmón.

En conclusión, este reporte provee evidencia que indica que el HGF ejerce un efecto de protección mediante Nrf2 y el glutatión en PA reflejado por una reducción en la inflamación, edema y estrés oxidante. Y que el HGF o Nrf2 pueden ser blanco como una opción terapéutica en pancreatitis aguda y posiblemente en otras enfermedades pancreáticas.

Abstract

Acute pancreatitis (AP) is a multifactorial disease associated with profound changes of the pancreas, induced by release of digestive enzymes that lead to increase in proinflammatory cytokine production, excessive tissue necrosis, edema, and bleeding. Elevated levels of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met have been observed in different chronic and acute pancreatic diseases including experimental models of acute pancreatitis.

HGF has been extensively characterized by our research group as a master modulator of redox cellular status and oxidative stress, particularly in the liver. HGF exerts its effects by inducing a wide range of protective proteins, such as antioxidants, phase-II and III detoxifying, proliferation and repair. Although, these effects are well-addressed in the liver, in pancreas are poorly studied.

In the present study, we investigated the protective effects induced by the recombinant human HGF in a mouse model of cerulein-induced acute pancreatitis.

Pancreatitis was induced by 8 hourly administrations of supramaximal cerulein injections (50 µg/kg, ip). HGF treatment (20 µg/kg, iv), significantly attenuated lipase content and amylase activity in serum as well as the degree inflammation and edema overall leading to less severe histologic changes such as necrosis, induced by cerulein. Protective effects of HGF were associated with activation of pro-survival pathways such as Akt, Erk1/2 and Nrf2 and increase in executor survival-related proteins and decrease in proapoptotic proteins. In addition, ROS content and lipid peroxidation were diminished, and glutathione synthesis increased in pancreas. Systemic protection was observed by lung histology, due to

the fact that in severe AP can trigger a systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction syndrome, in the present work the manifestation of these sings of damage were corroborated trough analyzing the lung histology.

In conclusion, this report is providing evidence that indicates that HGF exerts an Nrf2- and glutathione-mediated protective effect on acute pancreatitis reflected by a reduction in inflammation, edema, and oxidative stress, and HGF, or Nrf2 could be targeted as a novel therapeutic option in acute pancreatitis and, perhaps, others pancreatic diseases.

Introducción

Historia del páncreas

Este órgano fue generalmente ignorado en la antigüedad, como órgano así como foco de enfermedad. La primera descripción del páncreas se atribuye a Herophilus de Calcedonia (hacia el año 300 a. C.), él es considerado el Padre de la Anatomía Científica y entre otros órganos y estructuras describió al páncreas. Rufus de Éfeso (alrededor del año 100 d. C.), un fisiólogo eminente y excelente anatomista, nombró al órgano páncreas (del griego pan: todo y Kreas; carne), debido a que en sus observaciones anatómicas en cadáveres humanos no se identificaba cartílago ni hueso. En 1543 Vesalius en su tratado “De humani corporis fabrica” da una descripción del páncreas, pero erróneamente considera su función como cojín del estómago y válvula para cerrar el píloro. Fue R. Oddi, quien en 1887 publicó sus observaciones de la estructura y la función del esfínter en “Archives Italiennes de Biologie” lo que sentó las bases para entender su función en la enfermedad pancreática y biliar. Entre 1813 y 1878 Claude Bernard, describió la relevancia fisiológica y clínica con la publicación de 1856 “Mémoire sur le Pancreas” dejando claro el papel fundamental en la digestión de proteínas y grasas. Pavlov propuso la teoría de la regulación neuronal de la secreción pancreática en 1897. Mientras que en 1914 W. Bayliss y E. Starling desarrollaron el concepto alternativo de un sistema de mensajeros químicos (secretina) estableciendo así la endocrinología. W. Kuhne y R. Heidenhain introdujeron el término enzima y zimógenos para identificar a las formas activas e inactivas de los compuestos químicos en el jugo

pancreático. En 1921, F. Banting y su estudiante colaborador C. Best demostraron que la pancreatectomía inducía diabetes en perros pero se revertía al inyectar extractos de islotes y con la ayuda de J. Collip, purificaron un extracto de islote, la insulina. En 1869, Langerhans describió estructuras llamadas *Zellhäufchen* (montoncitos de células) pero fue hasta 1893, que G. E. Laguesse especuló su importancia en la secreción interna y los llamó islotes de Langerhans para conmemorar la muerte trágica de Langerhans. En febrero de 1889, Reginald H. Fitz, publicó la primera descripción de la patología en el Boston Medical and Surgical Journal, en la cual él describe la forma hemorrágica y supurada de la pancreatitis, anteriormente descubiertas por Rokitansky en 1865, además de las formas gangrenosa y la de diseminación de la necrosis adiposa (Berger Hans G *et al.*, 2008).

El páncreas

El páncreas se sitúa detrás del estómago (Imagen 1) y se dispone transversalmente en el abdomen, tiene una longitud de unos 20 cm. Su cola queda situada cerca del bazo, mientras que su cabeza queda rodeada por el duodeno (Pocock, 2005). Estructuralmente hablando, el páncreas consiste de dos órganos en uno: una glándula exocrina y una glándula endocrina que son estructuralmente diferentes pero integradas funcionalmente. La glándula exocrina está formada por células acinares pancreáticas y células ductales que producen enzimas digestivas

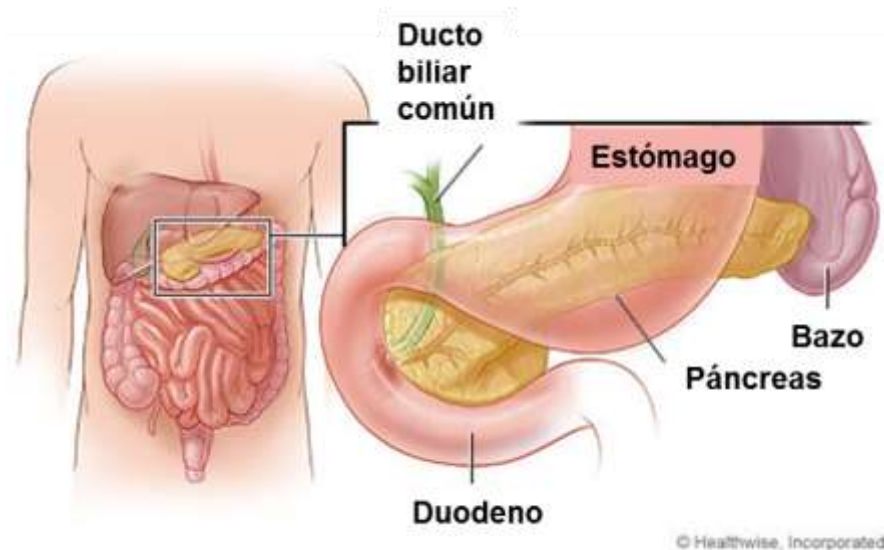


Imagen 1. Localización del páncreas en el cuerpo humano. Imagen modificada de: <https://www.webmd.com/digestive-disorders/pancreas>, abril, 2018.

y bicarbonato de sodio respectivamente. La función primaria del páncreas exocrino es secretar las enzimas digestivas responsables de la digestión normal y absorción de los alimentos, y finalmente la asimilación de nutrientes hacia el interior de nuestro cuerpo. La glándula endocrina, mientras tanto, está compuesta por cinco tipos de células secretoras de los islotes que producen y liberan hormonas peptídicas encargadas de mantener la homeostasis de la glucosa. Las funciones secretoras del páncreas están finamente reguladas por mecanismos neurocrinos, endocrinos y paracrinos así como también por mecanismos intracrinos. Debido a este hecho, la activación o desactivación inapropiada de rutas que median la fina regulación del páncreas impacta en la salud y la enfermedad (Leung Po Sing, 2010).

Células acinares pancreáticas

Las células acinares pancreáticas pertenecen a la porción exocrina del páncreas. Poseen una forma piramidal, las células acinares serosas son el tipo celular dominante en el páncreas, constituyendo el 82% del volumen total (Bolender R. P., 1974). Su función principal es producir, almacenar y secretar tres categorías principales de enzimas digestivas: α -amilasa, lipasa y proteasa, las cuales son responsables de la digestión de carbohidratos, grasas y proteínas respectivamente. La extensa red del sistema ductal del páncreas exocrino permite que ocurra la comunicación intercelular eléctrica y química entre las células (Iwatsuki N. *et al.*, 1978).

Una célula acinar consiste de un núcleo basalmente localizado, abundantes mitocondrias, ribosomas libres y retículo endoplásmico rugoso, y contiene un aparato de Golgi bien desarrollado. La arquitectura de este orgánulo permite la producción de gránulos secretores llamados zimógenos (ZG), los cuales están compuestos de una multitud de enzimas y proenzimas que son liberadas en la zona apical de las células acinares. Al liberarse las proenzimas en el duodeno, el tripsinogéno inactivo es convertido a tripsina activa por la enzima enteroquinasa, la tripsina puede activar a otras proteasas precursoras como a quimiotripsinógenos y procarboxipeptidasas, solo la amilasa y la lipasa se secretan en su forma activa. En condiciones normales, la activación se evita manteniendo un ambiente ácido en los gránulos de zimógeno y por la presencia del inhibidor de la tripsina en el jugo pancreático (Pocock, 2005). Fisiológicamente hablando, la activación de

proteasas en el duodeno en lugar de en el páncreas previene la autodigestión del órgano, conduciendo a pancreatitis (Hegyi P. *et al.*, 2013).

Células ductales pancreáticas

Las células ductales representan la minoría de la porción exocrina del páncreas. Sin embargo, estas células son indispensables para la función normal de las enzimas digestivas secretadas por las células acinares y la integridad de la mucosa duodenal. Las células ductales son las responsables de la secreción de bicarbonato de sodio fluido alcalino que neutraliza el quimo gástrico que es vaciado al duodeno. La función fisiológica del bicarbonato es proveer un pH óptimo para las enzimas digestivas y prevenir lesiones a la mucosa duodenal o la enfermedad de úlcera péptica. La deficiencia de las células ductales causa mala digestión y mala absorción. Las células ductales constituyen solo el 10% del número total células y el 5% de la masa total del páncreas humano (Githens S., 1988). Los ductos terminales están estructuralmente unidos con células acinares por medio de las células centroacinares, las cuales poseen varias características ductales y se consideran como terminales del árbol ductal. Las enzimas digestivas son vertidas a los ductos intercalados, seguidos por los ductos intralobulares, y finalmente un ducto interlobular. Las células de los ductos intercalados e intralobulares son los principales productores de bicarbonato. Estas células poseen una pequeña cantidad de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi. Abundantes mitocondrias se encuentran en las células principales, reflejando la gran demanda energética (Hegyi P. *et al.*, 2013).

El jugo pancreático es de color claro, rico en bicarbonato, alcalino e isotónico. Se produce cerca de 1-2 L de jugo pancreático cada día en un cuerpo adulto. La concentración es muy alta de 120-140 mM/L (Domschke S. *et al.*, 1977).

Células de los islotes pancreáticos

La porción endocrina del páncreas representa solo del 1-2% de la masa total del órgano. Dentro de los cuatro tipos principales de células endocrinas, las células- β constituyen cerca del 80% de la población total dentro de las células de los islotes. Las células beta producen insulina en respuesta al cambio de los principales nutrientes en el plasma, particularmente glucosa, aminoácidos y ácidos grasos.

Las células alfa producen glucagón, el cual actúa en oposición a la insulina. Sus principales efectos fisiológicos es incrementar los niveles de glucosa en el plasma, como hormona catabólica al estimular la síntesis de *novo* de glucosa hepática vía gluconeogénesis.

Señalización de calcio en células acinares

Las células acinares pancreáticas son polarizadas debido a que realizan funciones de síntesis, procesamiento, transporte vectorial y secreción de proteínas. Estudios previos indican que los neurotransmisores acetilcolina (ACh) y adrenalina, así como la hormona circulante colecistoquinina (CCK), inducen la liberación de Ca^{2+} de almacenes celulares internos y que el RE es la principal fuente de Ca^{2+} (Imagen 2). El rol fisiológico de las señales de Ca^{2+} en las células acinares es claro; estas señales activan la secreción enzimática a través de la exocitosis y la

secreción de fluidos a través de la activación de canales Ca^{2+} -dependiente- Cl^- . Sin embargo, la señalización de Ca^{2+} también posee peligros específicos para el páncreas debido a que las células acinares contienen una peligrosa mezcla de proenzimas digestivas, las cuales pueden provocar daño fatal si son activadas inapropiadamente antes de la secreción. Elevaciones prolongadas globales de la concentración de Ca^{2+} citosólico $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por estímulos patofisiológicos, como los ácidos biliares, metabolitos de la transformación del alcohol por la vía no oxidativa e hiperestimulación, causan la activación intracelular de proteasas y muerte celular (Petersen O. H. *et al.*, 2008).

La muerte celular, se define como la pérdida irreversible de la integridad de la membrana, es efectuada por la célula acinar mediante dos principales procesos, por apoptosis y necrosis. La apoptosis esta genéticamente programada y ocurre por dos vías, la dependiente de caspasas y la independiente de caspasas, mientras que la necrosis no está programada y es descontrolada. La perturbación en la señalización de Ca^{2+} se ha ligado a la muerte celular por apoptosis como por necrosis, en la célula acinar pancreática, oscilaciones globales que aumentan $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pueden inducir apoptosis intrínseca, mediante la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) dependiente de Ca^{2+} , la cual es considerada una característica crítica que conduce a la liberación del citocromo c hacia el citosol. Una vez liberado, el citocromo c, Apaf-1 (el factor activante de proteasas apoptóticas 1) y la pro-caspasa 9 se combinan para formar el apoptosoma que activa a la caspasa 9, con la subsecuente activación de la caspasa 3 que corta blancos apoptóticos específicos causando muerte celular. Por

otro lado el incremento sostenido de la $[Ca^{2+}]_i$ promueve necrosis, la cual está ligada a la activación intracelular del tripsinogéno, el sello distintivo de la pancreatitis aguda, un efecto que puede involucrar la activación de la ATPasa vacuolar. Estas diferencias en la inducción de muerte celular pueden estar relacionadas con efectos en la función mitocondrial asociada con las respectivas señalizaciones de Ca^{2+} (Criddle D. N. *et al.*, 2007).

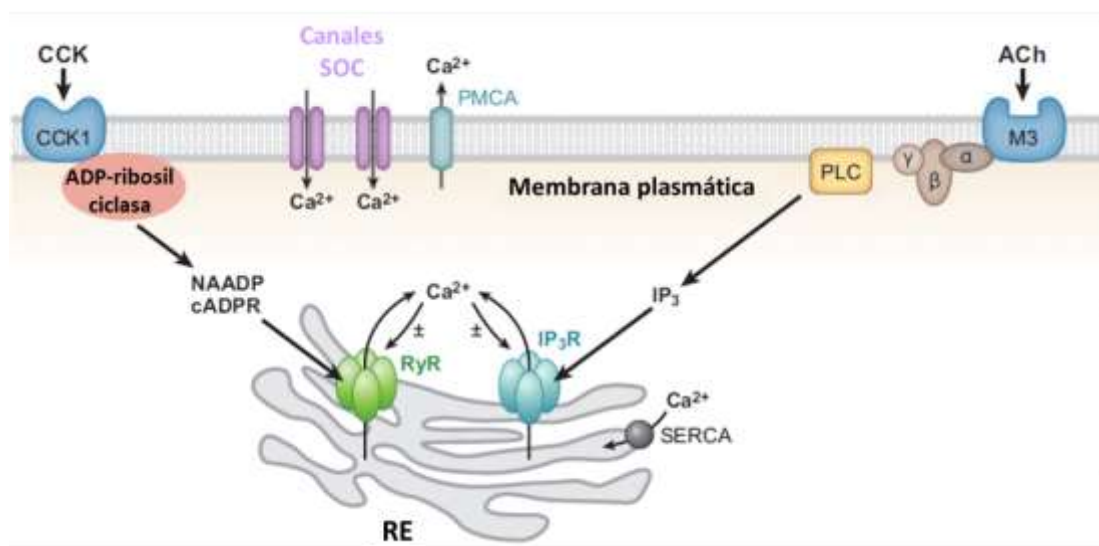


Imagen 2. Señalización de Ca^{2+} local en célula acinar. La CCK se une al receptor CCK subtipo 1 y ACh a receptores muscarínicos M3. La CCK activa a la enzima ADP-ribosil ciclasa, resultando en la formación de dos mensajeros, NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) y cADPR (cyclic ADP-ribose), los cuales activan a receptores de rianodina (RyRs) en los almacenes intracelulares. ACh activa a la fosfolipasa C (PLC) resultando en la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (y diacil glicerol, no mostrado). El IP₃ activa receptores a IP₃ (IP₃R) en los depósitos intracelulares. La liberación de Ca^{2+} vía IP₃R o RyRs causa cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Imagen modificada de Petersen *et al.*, 2008.

Un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ conduce a la regulación de numerosos procesos que requieren energía. Los cambios en las concentraciones de iones intracelulares, necesarios para la secreción de fluido y la necesidad de restablecer el gradiente

de iones después que los picos de Ca^{2+} han cesado son probablemente la razón principal para el aumento en la demanda de ATP (adenosín trifosfato). La estimulación con ACh o CCK induce significativamente la toma de glucosa y el consumo de oxígeno. Esta regulación es sorprendentemente exacta y debe involucrar precisión y un rápido ajuste de las funciones mitocondriales (Petersen O. H. *et al.*, 2008).

Como se puede evidenciar el páncreas es un órgano muy complejo, existe una interrelación de las células que lo conforman. El mal funcionamiento en un tipo celular puede comprometer con relativa facilidad al resto de ellas y por consecuencia al órgano.

La pancreatitis aguda

Durante las últimas décadas, el cambio en el estilo de vida provenientes de la derivación de un gran desarrollo tecnológico, ha propiciado una disminución de la calidad alimenticia conduciendo a un incremento importante en la obesidad debido al cambio en las actividades recreativas e incremento en el consumo de alcohol, tabaco y otras drogas, estos factores etiológicos pueden estar asociados con el considerable incremento en la incidencia de enfermedades gastrointestinales como la pancreatitis aguda (PA) (Yadav D. *et al.*, 2013), que es una de las enfermedades más comunes del tracto gastrointestinal, y que conduce a una tremenda carga emocional, física y financiera. Sin embargo durante la última década, se ha adquirido nuevo conocimiento y desarrollo en el diagnóstico, etiología y manejo temprano y tardío de la pancreatitis (Tenner S. *et al.*, 2013).

La PA está siendo, en la actualidad, una de las principales causas gastrointestinales de admisión en hospitales en varios países (Yadav D. *et al.*, 2013), se estima que se invierten cerca de 150 millones de dólares en atención en PA en Estados Unidos (Peery A. F. *et al.*, 2015). Mientras que en México la PA constituye una importante causa de morbilidad y mortalidad para el sistema de salud en México. De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística (INEGI) en 1999 la pancreatitis aguda constituyó la causa número 20 de mortalidad. En los años 2003 y 2014 su incidencia se incrementó llevándola al sitio 17 de las causas de muerte (Sánchez-Lozada Raúl *et al.*, 2005).

Paradójicamente, exceptuando escasos reportes y series, la mayor parte de los datos sobre la epidemiología y características de los pacientes con pancreatitis aguda provienen de otros países. Aunque no hay razones para suponer que el comportamiento de la enfermedad sea diferente en México (Sánchez-Lozada Raúl *et al.*, 2005).

La PA se caracteriza por un rápido inicio de proceso de inflamación en el órgano, generando la activación y liberación de enzimas digestivas en el propio tejido pancreático, así como en la circulación. Esto ocasiona también que se eleve la producción y secreción de citocinas inflamatorias que, eventualmente, pueden agravar el cuadro. Adicionalmente y como consecuencia, se produce necrosis, apoptosis, edema, sangrado, entre otros signos clínicos (Yagci G. *et al.*, 2004). Si bien el mecanismo molecular esta pobremente caracterizado, se sabe que existe una clara correlación entre la cascada de activación de enzimas digestiva en el páncreas y el estrés oxidante, aspecto que ha sido parcialmente comprobado

tanto en modelos animales de la enfermedad como en pacientes (Bopanna S. *et al.*, 2017, Xie Q. *et al.*, 2017).

El estado redox celular y el estrés oxidante

El balance entre especies químicas pro-oxidantes y anti-oxidantes se presenta como una parte de la homeostasis general que tiene una regulación fina en las células de los mamíferos. Es importante mencionar, que, como en cualquier proceso homeostático, lo importante es mantener el equilibrio o balance, es decir, si por cualquier estímulo, las especies reactivas de oxígeno (ERO) se elevan, y esto va acompañado de un incremento en la defensa antioxidante, entonces se mantiene el estado homeostático, aun cuando se hayan elevado las ERO, por lo que lo importante no es mantener bajo las ERO, sino mantener el equilibrio.

En nuestro grupo de investigación hemos estudiado intensamente dicho equilibrio redox, que muchas veces, aun rompiéndose, no llega a su estado de compromiso celular, o patológico, caracterizado como estrés oxidante (Clavijo-Cornejo D. *et al.*, 2013)

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) ha sido posicionado como un regulador maestro del estado redox celular y un freno fisiológico del estrés oxidante a nivel hepático (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008), y en el presente trabajo nos enfocamos en caracterizar si dicha función igualmente se presenta en páncreas y en PA.

El HGF como regulador maestro del estado redox celular y el estrés oxidante.

El HGF es un factor de crecimiento que se identificó originalmente como un potente mitógeno, El gen del HGF codifica una proteína de 728 aminoácidos que está localizado en el cromosoma humano 7 y consiste de 18 exones y 17 intrones. El HGF maduro es un heterodímero consiste de una cadena α (69 kDa) y una cadena β (34 kDa), las cuales están unidas por un puente disulfuro. Esta proteína consiste de 6 dominios. Un dominio N-terminal hairpin y dos dominios Kringle son necesarios para que el HGF ejerza su función biológica. La cadena β forma un dominio serina proteasa sin actividad catalítica y este es el sitio de unión para c-Met (Zhang Y. *et al.*, 2018) El HGF que ejerce sus funciones a través de su receptor c-Met el cual pertenece a la familia MET, junto con RON. El gen MET está localizado en el cromosoma humano 7 (7q21-q31), incluye 21 exones y 20 intrones, que codifica una proteína de aproximadamente de 120 kDa. El producto de la traducción es procesado a una forma heterodimérica que está unida por la cadena α extracelular y la cadena β transmembranal. La cadena transmembranal consiste de un dominio SEMA (región homologa sema; SEMA), un dominio PSI (plexina-semaforina-integrina; PSI), cuatro dominios IPT (regiones similares a inmunoglobulinas en plexinas y factores de transcripción; IPT), un dominio transmembranal, un dominio yuxtamembranal, un dominio de tirosina quinasa (TK) y un sitio de unión C-terminal (CT). SEMA es el sitio donde se une directamente el HGF a c-Met y PSI puede estabilizar esta interacción, dando lugar a la autofosforilación de Tyr (tirosinas)-1234 y Tyr1235 en el dominio intracelular

tirosina quinasa, el cual resulta en la autofosforilación de Tyr-1349 y Tyr-1356 en el sitio de unión C-terminal (Zhang Y. *et al.*, 2018).

La señalización ejercida por el receptor c-Met es canónica dentro de la familia de los receptores con actividad de tirosina quinasa (Bertotti A. *et al.*, 2003). La señalización de HGF/c-Met es diversa, pero puede agruparse en tres rutas centrales: la dirigida por la ruta de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), particularmente por ERK; la ruta de Stat3; y la ruta de PI3K/Akt (Chen R. *et al.*, 2013).

Si bien son rutas distintas, suelen converger en la activación de factores de transcripción con funciones protectoras, como el factor nuclear kappa B (NF-kB), la proteína activadora 1 (AP1) o el factor de transcripción Nrf2, siendo este último el que ha sido poco explorado en PA (Wang Y. Z. *et al.*, 2014, Du D. *et al.*, 2018).

Una vez activadas estas rutas por HGF/c-Met, y la eventual unión al ADN de los factores de transcripción, se establece una respuesta de protección celular donde se pueden identificar respuestas antioxidantes, de detoxificación de fase II y III, de proliferación celular, de sobrevivencia, particularmente antiapoptótica (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008, Factor V. M. *et al.*, 2010, Enriquez-Cortina C. *et al.*, 2013).

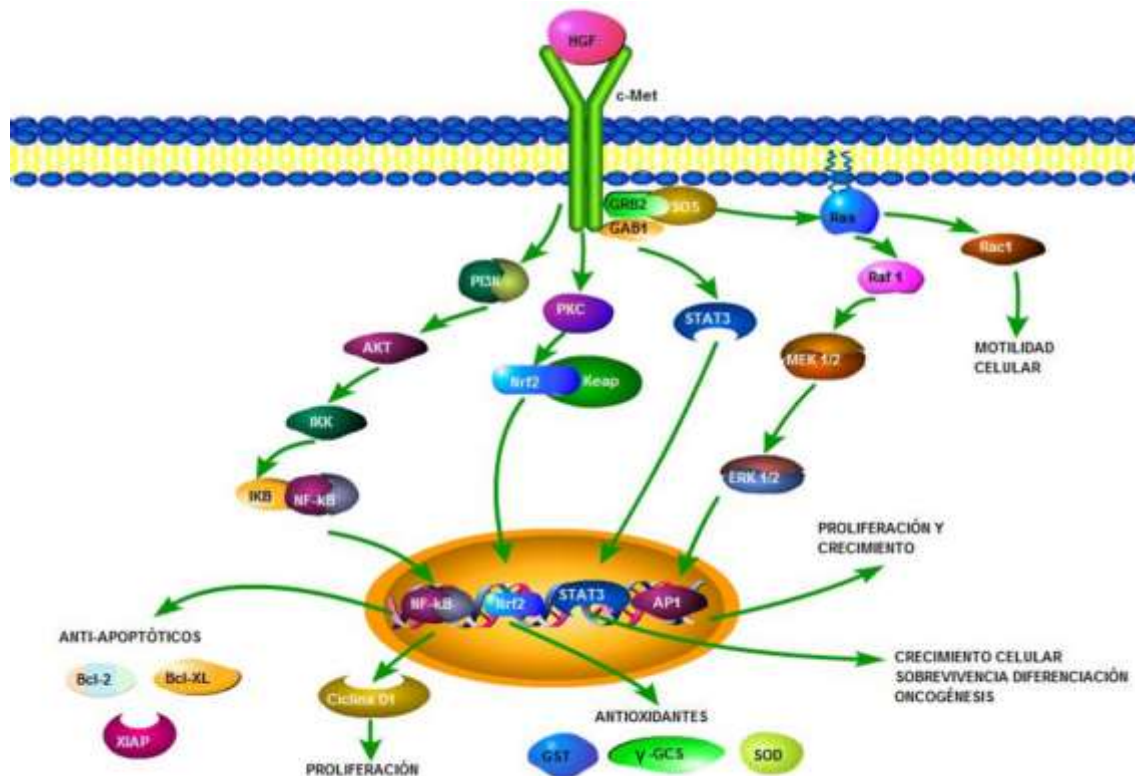


Imagen 3. Señalización desplegada por el HGF y su receptor c-Met en una célula epitelial. El HGF se une a su receptor c-Met y causa su dimerización y autofosforilación en residuos específicos de tirosinas, dando la activación de proteínas como PI3k, PKC, GAB1 o GRB2, las cuales a su vez desencadenan la activación de factores de transcripción como NF-κb, Nrf2, Stat3 y AP1, factores de transcripción que regulan apoptosis, proliferación, crecimiento celular y al sistema antioxidante. Imagen modificada de Palestino-Domínguez Mayrel *et al.*, 2012.

Adicionalmente, hemos detectado en nuestro grupo de investigación, funciones de inmunomodulación (Ilanguvaran S. *et al.*, 2016) (y datos del grupo sin publicar), que puede explicar en parte, los datos reportados en la presente tesis.

Tenemos la hipótesis de que todos estos efectos desplegados por el HGF/c-Met, son justamente por la modulación del estado redox celular, como el principal mecanismo para inducir procesos de protección, prevención del daño y reparación en la PA. El mecanismo de los efectos ejercidos por el HGF en el páncreas no

está del todo caracterizado. Se ha reportado que la ausencia de la señalización del HGF, por ejemplo por eliminación genética de c-Met, afecta el tamaño los islotes pancreáticos y disminuye la secreción de insulina (Dai C. *et al.*, 2005). En el páncreas exocrino, la expresión de HGF y c-Met están dramáticamente incrementados durante la PA, y la PA inducida por ceruleína en ratas (Menke A. *et al.*, 1999). Otro estudio reportó que el HGF disminuye el daño incrementado la expresión de interleucina (IL) 10, disminuyendo concomitantemente los niveles de amilasa y lipasa en suero (Warzecha Z. *et al.*, 2001).

Datos obtenidos en mi investigación de maestría revelaron que el HGF despliega efectos protectores en células derivadas de un insulinoma ante el daño causado por el alcohol y el acetaldehído, por un mecanismo tendiente al control del estado redox celular (Palestino Domínguez Mayrel, 2014).

Como se puede observar, si bien existe evidencia puntual de los efectos del HGF en páncreas, tanto en el exocrino como el endocrino, desconocemos aún mucho sobre su mecanismo que permita identificar blancos de intervención terapéutica.

En el presente estudio tuvimos el objetivo central de identificar y caracterizar los eventos moleculares desplegados por el HGF en ratones sometidos al daño pancreático empleando modelos bien caracterizados de PA experimental. Así como de corroborar el incremento de HGF en suero pacientes con PA.

Pregunta de investigación

¿Ejercerá el HGF una respuesta de protección y de reversión del daño en pancreatitis aguda inducida por ceruleína en un modelo murino?

Hipótesis

El HGF inducirá una respuesta de protección en la pancreatitis aguda, regulando el estrés oxidante y disminuyendo la inflamación al activar rutas de sobrevivencia como Akt, Erk1/2 y al factor de transcripción Nrf2 que modula los sistemas del glutatión. Así como la inducción de proteínas de sobrevivencia y disminución de proteínas pro-apoptóticas.

Asimismo, el HGF será capaz de revertir el daño iniciado por la ceruleína, al disminuir el estrés oxidante y modular la respuesta inflamatoria, así como induciendo la activación de rutas de sobrevivencia como Akt, Erk 1/2 y Stat3.

Objetivo general

Determinar el mecanismo por el cual el HGF ejerce un efecto de prevención o reversión en un modelo de pancreatitis aguda.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del HGF sobre marcadores enzimáticos y daño histológico en un modelo de pancreatitis aguda.
2. Estudiar el estado de activación que guardan las rutas de señalización PI3K/Akt, Erk1/2 y los factores de transcripción Stat3 y Nrf2 y sus genes blanco relacionados con sobrevivencia y reparación como respuesta al HGF en un modelo de pancreatitis aguda.
3. Identificar proteínas reguladas por el HGF que podrían ser blancos terapéuticos en un modelo de pancreatitis aguda.
4. Determinar los niveles séricos de HGF en muestras de pacientes diagnosticados con pancreatitis aguda.
5. Evaluar si células acinares aisladas de ratón inducen señalización de calcio al ser tratadas con HGF, así como evaluar el efecto de la cafeína en dicho fenómeno.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó al cabo en ratones macho de 12 semanas de edad de la cepa CD1, que fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Todos los procedimientos con animales se realizaron con estricto apego a la NOM-062-ZOO-1999 y a los lineamientos de uso de animales del NIH (Guidelines for the use of animals in intramural research NIH).

Modelo de prevención

Se hicieron 4 grupos. Cada grupo se formó con 10 ratones repartidos de manera aleatoria. Los grupos se describen a continuación:

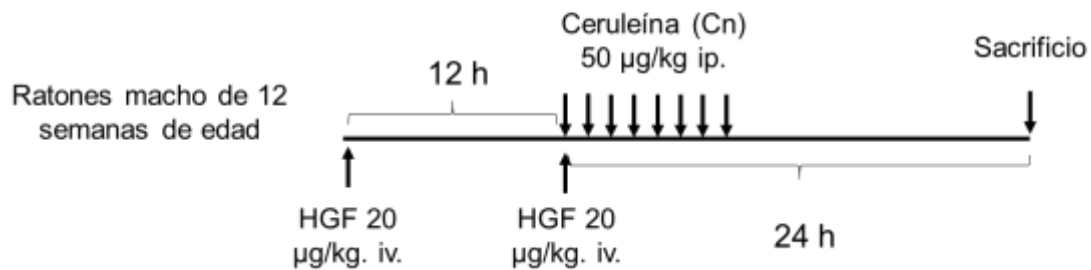
Grupo Control (NT): Los ratones control fueron inyectados vía ip e iv con 200 μ L de solución salina isotónica estéril, que se utilizó como volumen final para los tratamientos de ceruleína y HGF.

Grupo Ceruleína (Cn): Ratones con inyecciones ip de Cn (Sigma Aldrich). Se administraron 8 inyecciones de 50 μ g/kg cada h, con sacrificio a las 24 h de haber iniciado la primera dosis de Cn.

Grupo HGF + Cn: Los ratones recibieron una dosis de HGF (PeproTech, México) 20 μ g/kg iv, 12 h después recibieron una segunda administración de HGF conjuntamente con la primera dosis, de ocho de Cn. Los ratones se sacrificaron a las 24 h después de la primera dosis de Cn.

Grupo HGF. Los ratones fueron tratados con HGF iv, se administró una primera dosis y 12 h después una segunda inyección de HGF, los ratones fueron sacrificados 24 h después de la última administración.

Modelo de prevención



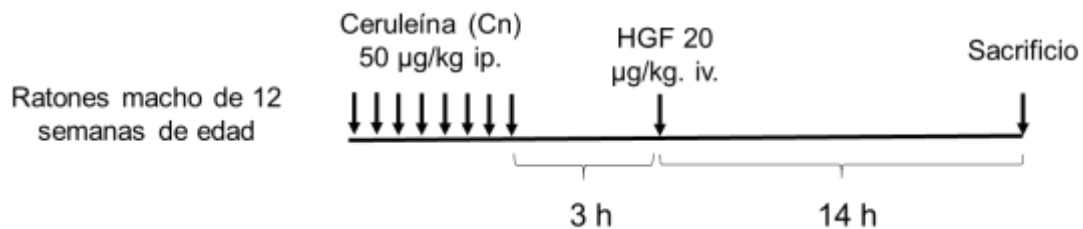
Modelo de reversión

Adicionalmente se incluyeron dos grupos de ratones para el modelo de reversión, cada grupo se constituyó con 10 ratones repartidos de manera aleatoria.

Grupo Cn + HGF: este grupo recibió 8 inyecciones de Cn 50 ug/kg cada h, 3 h después de la última dosis de Cn se administró una dosis de HGF 20 ug/kg iv. El sacrificio se realizó 14 h después de la administración del HGF.

Grupo HGF: Los ratones se trataron con HGF iv y se sacrificaron 14 h después de dicha administración.

Modelo de reversión



Modelo de pancreatitis aguda inducida por L-Arginina

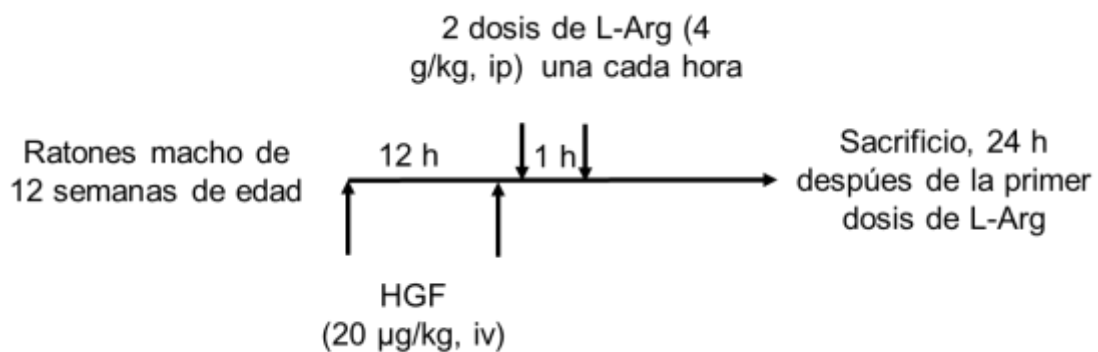
Para el modelo de pancreatitis aguda inducida por L-Arginina los ratones fueron separados aleatoriamente en cuatro grupos:

Grupo Control: que recibió dos inyecciones de solución salina como vehículo

Grupo L-Arg: que recibió dos dosis de L-Arg de 4 g/kg, ip una cada h, los ratones se sacrificaron 12 h después de iniciar el tratamiento.

Grupo HGF+L-Arg: que recibió dos administraciones de HGF 20 ug/kg iv cada 12 h, la última administración de HGF se acompañó con la primer dosis de L-Arg de 4 g/kg ip, la segunda administración de L-Arg fue 1 h después de la primera, los ratones se sacrificaron 12 h después de la primer aplicación de L-Arg.

Grupo HGF: a este grupo se le administraron dos inyecciones de HGF 20 ug/kg iv una cada 12 h y dos dosis de solución salina isotónica como vehículo, una cada h, los animales fueron sacrificados 12 h después de la primera dosis de solución salina.



Respuesta al HGF dependiente del tiempo

Un grupo de 12 ratones fueron tratados con HGF 20 ug/kg iv a diferentes tiempos 6, 12 y 24 h, al grupo control se le administro solución salina isotónica estéril iv.

Al termino de los tratamientos los ratones fueron sacrificados por exanguinación bajo anestesia con avertina, se colectó el páncreas para extracción de proteína.

Cociente páncreas peso corporal

Para la determinación del cociente páncreas peso corporal, en cada experimento se registró el peso de los ratones antes de aplicar la anestesia y el peso del páncreas inmediatamente después del sacrificio, el órgano fue diseccionado tomando en cuenta siempre el mismo criterio, utilizando como referencia el bazo y el duodeno.

Histología

El páncreas fue fijado en formalina neutra al 10% durante toda la noche a 4°C. Los pulmones se perfundieron con etanol absoluto y almacenados a 4°C. Los tejidos fueron secuencialmente deshidratados en etanol grado histológico a diferentes porcentajes 30%, 50%, 80% y 100% durante 1 h a temperatura ambiente, posteriormente incubados en xilol-alcohol dilución 1:1 y finalmente en xilol absoluto, los tejidos fueron incluidos en Parafina Paraplast Highmelt (Leica). Los cortes se realizaron en micrótopo Leica con un grosor de 5µm, y teñidos con hematoxilina y eosina (Merck Millipore) (Nuno-Lambarri N. *et al.*, 2016).

Actividad de alfa amilasa pancreática

La sangre obtenida de los ratones fue centrifugada a 3,000 rpm, a 4°C por 10 min, el suero obtenido fue alicuotado y utilizado de inmediato o preservado a 4°C hasta por una semana. El suero se diluyó en solución salina isotónica estéril 1:100. La actividad de amilasa pancreática se midió utilizando un sistema colorimétrico automatizado Reflotron Utilizando “tiras reactivas para amilasa pancreática” (Roche, Inc.). Utilizando una micropipeta de alta precisión 200 µL de la dilución de suero fueron aplicados a la tira reactiva, cuidando no tocar la malla protectora de la tira reactiva, la tira fue introducida de inmediato en la cámara de medición del equipo (Nuno-Lambarri N. *et al.*, 2016).

Cuantificación de lipasa pancreática

El contenido de lipasa pancreática se determinó utilizando un kit de ELISA o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, (Cloud-Clone Corp). El suero recuperado de cada experimento fue almacenado en alícuotas a -80°C, descongelado exclusivamente para el ensayo de lipasa y diluido 1:1000 en solución salina isotónica estéril. Se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares. 100 µL de estándares y de las muestras diluidas fueron agregados a cada pozo por triplicado, se incubó 1 h a 37°C. Se aspiró y se agregó 100 µL del Reactivo de Detección A, se incubó por 1 h a 37°C, posteriormente se aspiró y se lavó 3 veces, se retiró el exceso de solución y se adicionaron 100 µL del Reactivo de Detección B, se incubó por 30 min a 37°C, se aspiró y se lavó 5 veces. Posteriormente se agregaron 90 µL de la Solución Substrato, se incubó 25 min a

37°C terminado el tiempo se adicionaron 50 µL de la Solución de Paro. La placa se leyó inmediatamente a 450 nm en un lector de placas para ELISA.

Extracción de proteínas totales

Al término de cada experimento los páncreas seccionados fueron guardados de inmediato en nitrógeno líquido, para su almacenamiento a -80°C o utilizados de inmediato para extracción de proteínas totales en buffer T-PER (Thermo Scientific) suplementado con EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, por cada 10 mL se adicionó una pastilla de inhibidor de proteasas (Complete, Roche) y una pastilla de inhibidor de fosfatasas (PhosphoStop, Roche). Durante todo el procedimiento el buffer de lisis se mantuvo en hielo y los fragmentos de tejido se agregaron congelados a un homogeneizador de vidrio previamente enfriado y con buffer de lisis. Los homogenizados fueron centrifugados a 15,000 rpm, 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se hicieron alícuotas y se congelaron a -80°C hasta ser utilizadas por no más de un mes (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008, Clavijo-Cornejo D. *et al.*, 2013, Enriquez-Cortina C. *et al.*, 2013, Nuno-Lambarri N. *et al.*, 2016).

Inmunoblot

Se tomaron 100 µL de proteína total y se le agregó amortiguador de muestra 2X (Laemmli sample buffer, Bio-Rad). Las muestras se incubaron 5 min a 95°C y se separaron en geles de poliacrilamida de 10 a 12% en presencia de SDS al 0.1%, utilizando 120 V por 90 min. La proteína se transfirió a membrana de difloruro de polivinilideno (Amersham Hybond PVDF, G.E. Healthcare Life Sciences), durante

120 min a 120 V en cámara húmeda (Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell, Bio-Rad), usando un amortiguador de transferencia Tris-base 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y metanol al 20%. Posteriormente la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% durante 30 min a temperatura ambiente, se retiró el exceso de leche con TBS-Tween, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, ver tabla 1 para más información sobre los anticuerpos, durante toda la noche a 4°C en agitación lenta. Se lavó con TBS-Tween dos veces por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente 1 h con el anticuerpo secundario (G.E. Healthcare Life Science) acoplado a peróxidasa de rábano, dilución 1:10,000 en TBS-Tween. Se lavó dos veces con TBS-Tween por 10 min y un lavado con TBS por 5 min. Se reveló utilizando 1 mL de sustrato luminiscente (ECL Western Blotting Substrate, Pierce), las bandas se cuantificaron por densitometría en un equipo Imagin System Gel Logic 1500 (Kodak) (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008, Clavijo-Cornejo D. *et al.*, 2013, Enriquez-Cortina C. *et al.*, 2013, Nuno-Lambarri N. *et al.*, 2016).

Tabla 1: anticuerpos utilizados en el presente estudio

Anticuerpo	Fuente	Marca y catálogo
Akt	Conejo policlonal	Cell Signaling 9272
p-Akt (T308)	Conejo monoclonal	Cell Signaling C31E5E
Erk1/2	Conejo monoclonal	Cell Signaling 4695
p-Erk1/2 (Thr202/Tyr 204)	Conejo monoclonal	Cell Signaling 20G11
p38	Conejo policlonal	Santa Cruz 535
p-p38	Ratón monoclonal	Santa Cruz 7973
Bax	Conejo policlonal	Santa Cruz 6236
Bcl-2	Ratón monoclonal	Santa Cruz 23960
Mcl-1	Conejo policlonal	Santa Cruz 819
Caspasa 3	Conejo monoclonal	Abcam 32042
γ -GCS	Conejo policlonal	Santa Cruz 22755
GPX1/2	Ratón monoclonal	Santa Cruz 1331
GSTM	Ratón monoclonal	Santa Cruz 517262
HO-1	Conejo policlonal	Santa Cruz 10789
Trx1	Ratón monoclonal	Santa Cruz 13526
GADPH	Ratón monoclonal	Abcam 125247
β -Actina	Ratón monoclonal	Sigma Aldrich A3854

Lipoperoxidación

La lipoperoxidación se determinó mediante la detección de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando espectrofotometría como describió (Buege J. A. *et al.*, 1978), 0.5 g de tejido fue disgregado mecánicamente utilizando un homogeneizador en 1 mL de solución salina al 0.9%, se tomó una alícuota de 100 μ L del homogenado para cuantificación de proteína. Los 900 μ L restantes se colocaron en tubos de ensaye y se adicionaron 2 mL de solución reactiva compuesta por ácido tricloroacético 1.5 M (TCA, Sigma Aldrich), ácido tiobarbitúrico 34 mM (TBA, Sigma Aldrich) y ácido clorhídrico 1.4 M (HCl, Sigma Aldrich), se mezcló en vortex, se incubó 30 min en un baño de agua hirviendo, se retiraron los tubos del baño y se dejaron enfriar 15 min, posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm 10 min. Se recuperó 1.5 mL del sobrenadante y la absorbancia fue leída a 535 nm, como blanco se utilizó la solución reactiva.

Ensayo del cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Se aisló proteína nuclear de tejido fresco utilizando el kit NE-PER para extracción de proteína citoplasmática y nuclear (Thermo Fisher Scientific). El ensayo de EMSA se realizó con el kit LightShift kit (Thermo Fisher Scientific).

Se preparó un gel de nativo de poliacrilamida con 0.5X TBE, se pre-corrió por 30 min en 0.5X TBE a 100 V. Mientras se prepararon las reacciones de unión, todos los reactivos y muestras se mantuvieron en hielo. Las reacciones se prepararon de acuerdo a la tabla 2.

Se usó la secuencia de ADN consenso para Nrf2: TTT TCT GCT GAC TCA AGG TCCG. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 20 min y se adicionaron 5 µL del buffer de carga 5X por cada 20 µL de reacción de unión, se mezcló pipeteando arriba y abajo varias veces para mezclar.

Tabla 2. Reacción para el EMSA

Componente	Concentración Final	Reacción
Agua Ultrapura	-----	a 20 µL
Buffer de unión 10X (A)	1X	2 µL
1 µg/µL Poly (dI-dC) (E)	50 ng/µL	1 µL
Opcional: 100 mM MgCl ₂ (I)		
Opcional: 200 mM EDTA (J)		
ADN blanco no marcado	4 pmol	
Extracto de proteína		
ADN blanco Biotinilado	20 fmol	
Volumen Total 20 µL		20 µL

Se prosiguió con la electroforesis, se cargaron 20 µL de cada reacción y se corrió a 100 V hasta que la marca de azul de bromofenol recorrió tres cuartos del gel. Se activó la membrana de nylon en 0.5X TBE por 10 min y se realizó la transferencia en el equipo Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), se realizó el crosslink por 15 min a 312 nm en un transiluminador. La membrana se bloqueó con buffer de bloqueo por 15 min en agitación lenta, se incubó con la solución de peroxidasa de rábano por 15

min en agitación lenta. Se prosiguió con cuatro lavados de 5 min y posteriormente se incubó por 5 min en buffer de equilibrio, por último se trató con Luminol/solución potenciadora por 5 min, la membrana fue expuesta en un equipo Imaging Gel Logic 1500 (Kodak) (Clavijo-Cornejo D. *et al.*, 2013).

Expresión de c-Met por RT-PCR en tiempo real

Se purificó ARN total con TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Un µg de ARN total se sometió a la reacción de transcripción reversa con iScript Advanced cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Inc). Para la amplificación y cuantificación por PCR en tiempo real se utilizó SsoAdvance Universal SYBR green Supermix (Bio-Rad) con 3 mM MgCl₂, par de cebadores específicos y 2.5 µg de cADN. Las condiciones para PCR fueron como sigue: 10 min a 95°C seguido por 45 ciclos de 15 s a 95°C, 15 s a 60°C, y 15 s a 72°C. Las reacciones se corrieron por duplicado en un sistema de detección Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad) (Gordin M. *et al.*, 2010).

Secuencia de cebadores utilizados para c-Met:

Sentido: 5'-GAC TTC AGC CAT CCC AAT GT-3'

Antisentido: 3'-GGT GAA CTT CTG CGT TTG C-5';

Los niveles de la subunidad ribosomal 18S se utilizaron para normalizar las muestras y calcular los niveles de expresión relativa del gen c-Met.

Sentido: 5' TGT GGT GTT GAG GAA AGC AG 3'

Antisentido: 5' TCC CAT CCT TCA CAT CCT TC 3'

Determinación de ERO *in situ*

Los ratones fueron sacrificados en paralelo exclusivamente para la determinación de ERO *in situ*. El páncreas fresco y completo fue rápidamente seccionado y congelado en nitrógeno líquido, embebido en el agente de temperatura optima de corte (OCT, Sakura Finetec). Consecutivamente, se obtuvieron secciones de 8 μm en un criostato (Leica CM-3050S) a -20°C y los cortes fueron inmediatamente incubados por 15 min en oscuridad, a 37°C con dihidroetidio 5 μM en PBS, posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y los cortes se montaron para ser observados de inmediato en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 a una excitación de 485 nm y emisión de 570nm como previamente reportaron (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008, Enriquez-Cortina C. *et al.*, 2013).

Determinación de Glutación

Los niveles de glutatión reducido y oxidado se determinaron utilizando el kit para ensayo de glutatión (Sigma-Aldrich #CS0260). Se prepararon las soluciones de trabajo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los estándares de glutatión se prepararon con diluciones secuenciales de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3 Reacción para la determinación de Glutación.

No. de pozo	1	2	3	4	5
Concentración de GSH (μM)	50	25	12.5	6.25	3.125
Solución GSH (μL)	50	25 (del pozo 1)	25 (del pozo 2)	25 (del pozo 3)	25 (del pozo 4)
SSA 5% (μL)	0	25	25	25	25
nmoles de GSH en una muestra de 10 μL	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312

Los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de la excisión y pulverizados en mortero, se adicionaron 3 volúmenes de una solución al 5% de ácido 5-sulfosalicílico (SSA), las muestras fueron centrifugadas para remover la proteína precipitada, se programó el lector de placas a 412 nm con una cinética de lectura de 1 min por intervalos de 5 min. Cada reacción se realizó por duplicado como muestra la tabla 4.

Tabla 4. Preparación de la reacción de glutatión.

	Mezclar e incubar 5 min			Inicio
Muestra medida	Volumen de muestra	5% SSA	Mezcla de Trabajo	NADPH (0.16 mg/mL)
Reactivo blanco	-	10 μ L	150 μ L	50 μ L
Curva estándar	10 μ L	-	150 μ L	50 μ L
Muestra de concentración desconocida	X μ L	10-X	150 μ L	50 μ L

Se agregaron 5 y 10 μ L de las muestras de concentración desconocida por duplicado y se llevaron a un volumen final de 10 μ L con SSA al 5%. Se adicionaron 150 μ L de la Mezcla de Trabajo a cada pozo utilizando pipeta multicanal, se mezcló pipeteando arriba y abajo, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se agregaron 50 μ L de la solución de NADPH. Se leyó el ensayo en lector de placas.

Actividad de Caspasa 3.

La determinación de la actividad de caspasa 3 se realizó con un kit comercial (BD Pharmingen, #556485) en placa de 96 pozos. Se lisaron 0.5 g de tejido pancreático fresco en 1.5 mL de buffer de lisis y se mantuvo en hielo. A cada pozo

se adicionaron 5 μ L del reactivo Ac-DEVD-AMC que ya contenía 0.2 mL del amortiguador 1X HEPES (será referido como amortiguador de ensayo de proteasa). A cada pozo se adicionaron 10 μ L del lisado celular y se incubó por 1 h a 37°C. Se midió la cantidad de AMC liberada de Ac-DEVD-AMC usando un lector de placas a una excitación de 380 nm y una emisión de 420-460 nm (Nuno-Lambarri N. *et al.*, 2016).

Cuantificación de proteína.

Se determinó la concentración de proteína mediante el método del ácido bicinconínico o BCA (Pierce Biotechnology, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas de 96 pozos, de cada muestra se tomó una alícuota de 5 μ L y se le agregó 20 μ L de agua ultrapura, se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina de 0-2000 μ g/mL de cada estándar se tomaron 25 μ L por pozo, cada muestra por triplicado. Se adicionaron 200 μ L del reactivo BCA diluido 50:1 reactivo A:B respectivamente y se incubó por 30 min a 37°C, la placa se leyó a 460 nm en un lector de placas para ELISA (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008, Clavijo-Cornejo D. *et al.*, 2013, Enriquez-Cortina C. *et al.*, 2013, Nuno-Lambarri N. *et al.*, 2016).

Ingreso de pacientes y recolección de muestras séricas.

Se incluyeron de manera consecutiva a todos los pacientes con PA que fueron atendidos por primera vez en relación al cuadro de PA en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), que además

aceptaron participar, firmaron el consentimiento informado y cumplieron con los criterios de inclusión que se exponen más adelante. Los pacientes se manejaron de acuerdo a las normas de los servicios de hospitalización sin considerar los objetivos de esta investigación.

Criterios de selección.

Inclusión:

Hombres y mujeres mayores de 18 años, que acepten participar en el protocolo de investigación

Pacientes con diagnóstico de PA con menos de 48 h de evolución

No ser referido ni haber sido atendido en otra institución que no sea el INCMNSZ

Tener expediente clínico completo en el INCMNSZ

Exclusión:

Tener una condición clínica causante de inmunodeficiencia (p. Ej. HIV, quimioterapia, entre otras)

Haber tenido laparotomía 72 h antes o durante la PA

Eliminación:

No contar con los datos clínicos completos para el análisis

Participantes con muestras contaminadas o insuficientes

Participantes que pidan su retiro voluntario del estudio, aún después tomar la muestra y de firmar un consentimiento inicial

DEFINICIONES.

Diagnóstico de PA en pacientes.

Se realizó con base en cuadro clínico compatible más la evidencia de la elevación sérica de amilasa y/o lipasa (al menos 3 veces arriba de lo normal) y hallazgos de inflamación pancreática en los estudios de imagen, el diagnóstico lo realizó un gastroenterólogo experto asesor del presente trabajo el Dr. Mario Peláez Luna.

Definición de gravedad en pacientes.

La gravedad se estableció de acuerdo con la presencia de alguno de los criterios Revisados de Atlanta:

1. Criterios pronósticos de gravedad: Puntaje en Escala de Ranson > 3 puntos y/o APACHE > 8 puntos

2. Complicaciones locales:

a) Necrosis: áreas difusas o locales de parénquima pancreático no viable (sin perfusión).

b) Necrosis infectada: presencia bacterias y/o cultivos microbiológicos positivos en muestras de necrosis pancreáticas, obtenidas mediante biopsia por aspiración y/o cirugía.

c) Absceso: colección intraabdominal de pus, delimitada y usualmente próxima al páncreas pudiendo o no contener tejido pancreático necrótico.

d) Pseudoquiste: Colección de jugo pancreático, encapsulado por una pared de tejido fibroso o de granulación que suele ocurrir usualmente 4 semanas después del inicio del cuadro de PA.

3. Complicaciones Sistémicas:

- a) Falla renal: creatinina > 2 mg/dl,
- b) Falla respiratoria: $paO_2 < 60$ mmHg,
- c) Falla cardiovascular o Choque: Presión arterial sistólica < 90mmHg;
- d) Coagulopatía: plaquetas < 100,000 mL fibrinógeno < 1 g/lt, productos degradación de fibrinógeno > 80 ng/lt,
- e) Sangrado gastrointestinal: pérdida de > 500 mL/día,
- f) Falla orgánica múltiple (FOM): presencia simultánea de más de una falla orgánica.

La presencia de necrosis se estableció por tomografía axial computada dinámica con medio de contraste o por evidencia quirúrgica. La presencia de infección se estableció por cultivos positivos de aspirado percutáneo o drenaje quirúrgico del tejido necrótico y por la evidencia de sepsis.

Recolección de muestras de pacientes.

Se tomaron muestras de sangre de 10 mL en tubos Vacutainer con y sin anticoagulante por punción de vena periférica (brazo), cuando no se contó con catéter central. Las tomas se realizaron al ingresar al hospital (tiempo cero) y después a las 24, 48 y 72 h, día 7, 14 y 21 de hospitalización. Se centrifugaron a

2500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se extrajo el suero y se hicieron alícuotas (250 μ L) de cada muestra de suero, se almacenaron a -70°C , hasta el momento de la determinación de HGF.

En el laboratorio de Fisiología Celular, se cuenta con una base de datos con niveles séricos de HGF reportados como basales, dichos datos fueron utilizados en este estudio, para representar a los controles o individuos sanos.

Determinación de HGF en muestras séricas de pacientes.

La cuantificación de los niveles de HGF en suero de pacientes, se determinó mediante un kit comercial por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Invitrogen, #KAC2211). Los estándares del kit fueron reconstituidos a 20,000 pg/mL con el respectivo amortiguador, utilizando diluciones secuenciales se realizó una curva estándar de HGF, se prepararon las soluciones de trabajo requeridas para el ensayo. Se agregaron 150 μ L del buffer de incubación a cada pozo, excepto a los pozos que fueron utilizados como blanco para cromógeno. Se pusieron 50 μ L del amortiguador diluyente para estándares a los pozos estándar cero. 50 μ L de cada estándar, muestra o control se adicionaron a los pozo respectivos. Se cubrió la placa y se incubo por 3 h a temperatura ambiente, se decantó la solución de los pozos y se procedió con 4 lavados. Posteriormente se incubaron 100 μ L de anti-HGF conjugado con biotina, excepto a los pozos blanco para cromógeno, por 1 h a temperatura ambiente. Después se lavó 4 veces y se adicionaron 100 μ L de la solución de trabajo Estreptavidina-HRP a cada pozo, excepto los blancos para cromógeno y se incubo por 30 min a temperatura

ambiente. Se descartó la solución y se lavó 4 veces. Se adicionaron 100 μ L del cromógeno estabilizado y se incubó por 30 min a temperatura ambiente, por último se adicionaron 100 μ L de la solución de paro y se registró la absorbancia a 450 nm.

Aislamiento de células acinares pancreáticas de ratón para microscopia confocal con indicador a calcio.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se extirpó el páncreas y se enjuago dos veces en una solución amortiguadora de Na⁺HEPES a 36.5°C. Utilizando una jeringa estéril se inyectó el páncreas con 1 mL de una solución de colagenasa (Sigma, C9407) 0.15 mg/mL en Na⁺HEPES sin CaCl, se incubó en baño de agua a 36.5°C, con agitación por 18 min. Posteriormente usando un tubo Falcon de 15 mL el páncreas fue enjuagado en una solución de Na⁺HEPES suplementado con CaCl (1 mM) y glucosa (10 mM) a 36.5°C, se disgrego el tejido mediante agitación manual dentro de un tubo de 15 mL utilizando un volumen de 3 mL de Na⁺HEPES, se colectó el sobrenadante que resultó de 4-5 repeticiones para disgregar, posteriormente se centrifugo a 500 rpm por 1 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 4 mL de Na⁺HEPES pipeteando arriba y abajo (20–30 veces). Las células resuspendidas se pasaron a través de una malla con 70 μ m de poro, se colectaron las células en suspensión y se centrifugaron a 1000 rpm por 1 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 3 mL de Na⁺HEPES, se volvió a centrifugar, descartar el sobrenadante y a resuspender

hasta que el sobrenadante fue claro. Finalmente el pellet celular se resuspendió en 2 volúmenes de Na⁺HEPES.

Las células fueron cargadas con Fluo-4 (5 µM) a temperatura ambiente en agitación por 40 min, se realizó un lavado con NaHepes, posteriormente se dejaron adherir a cubreobjetos tratados con poly-lisina por 5 min para ser visualizadas en microscopio confocal con tratamientos de HGF y/o cafeína.

Se registraron imágenes cada 2 s en un microscopio confocal Carl Zeiss, con excitación de 488 nm y emisión de 506 nm.

Tabla 5. Reacción para la determinación de calcio.

Reactivo	Concentración	Para 200 mL
NaCl	130 mM	1.5 g
KCl	4.7 mM	0.07 g
MgCl ₂ (1 mM)	1.13 mM	226 µL
Hepes	10 mM	0.48 g
Glucosa	10 mM	0.36 g
Inhibidor de tripsina SIGMA T6522	0.02 mg/mL	4 mg
Pen/Strep/Glut (100X)	1X	2 mL
MEM amino ácidos (50X) Gibco	1X	4 mL
Piruvato (100 mM)	2 mM	4 mL
Na ₃ PO ₄	1 mM	76 mg
CaCl ₂ (1 M)	1 mM	200 µL

Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 5 N.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como el promedio $\pm$ el error estándar de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las comparaciones entre grupos (NT vs Cn), se hicieron utilizando la prueba t de Student. Para comparaciones múltiples se utilizó la prueba ANOVA con Mann Whitney y Tukey-Kramer. El software GraphPad Prism 6 para OSX se utilizó para correr los análisis. Las diferencias fueron consideradas significativas a una $p \leq 0.05$.

Resultados

El tratamiento con Cn induce un incremento de HGF en suero y la expresión del ARNm de c-Met

Para describir los efectos de la señalización de HGF/c-Met en la pancreatitis inducida por Cn, se cuantificaron los niveles de HGF en suero y el ARNm de c-Met en tejido pancreático de ratones tratados o no con Cn. Los niveles de HGF en suero no muestran un cambio significativo (Figura 1A) debido al tratamiento con Cn, sin embargo, se observa una tendencia al incremento, en contraste, el ARNm de c-Met mostró un incremento significativo (1.57 veces, $p=0.0211$) en respuesta al tratamiento con Cn (Figura 1B).

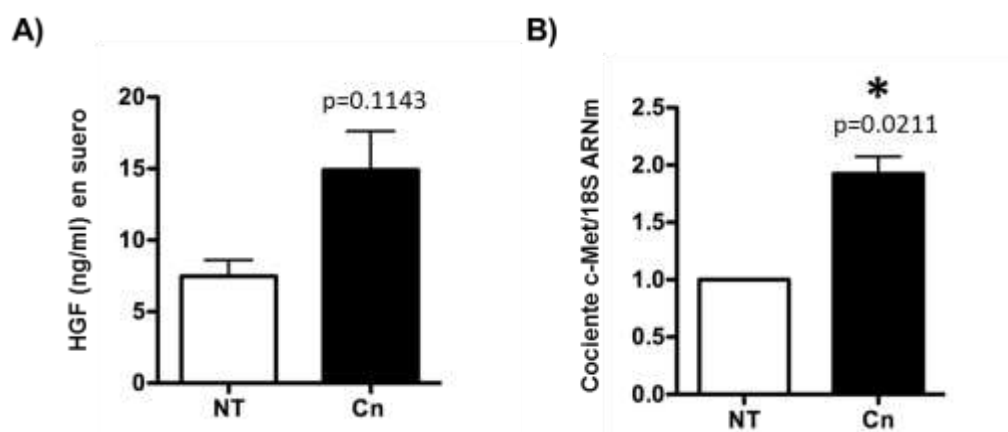


Figura 1. El tratamiento con Ceruleína incrementa el contenido de HGF en suero y la expresión del ARNm de c-Met. Los ratones fueron tratados con Ceruleína (Cn) como se indica en material y métodos, el tejido pancreático y el suero fueron recuperados después de 24 h de la primera dosis de Cn. A) Contenido de HGF en suero; B) Expresión del ARNm de c-Met determinado por RT-PCR en tiempo real cuantitativo. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos 4 ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT.

El HGF activa rutas de supervivencia e incrementa la defensa antioxidante en ratones.

Para determinar si en ausencia de daño al páncreas el HGF induce la activación de su receptor c-Met y la consecuente transducción de señales, se trataron ratones con el factor de crecimiento por diferentes tiempos 0, 6, 12 y 24 h. Por Western Blot se determinaron los niveles de activación de Akt y Erk1/2. En la Figura 3A se muestra que en estado basal estas dos rutas de señalización no se encuentran activas pero 6 h posteriores a la administración del HGF mostraron una evidente activación, la cual decae a las 12 h y se mantiene así hasta las 24 h.

La activación de estas rutas de señalización coincide con el incremento en los niveles de glutatión que lo hace significativo a partir de las 12 h y se mantiene elevado hasta las 24 h (Figura 2B), así como con el incremento de la enzima limitante para la síntesis de glutatión, la γ -GCS que a partir de las 12 h se observa un modesto incremento y alcanza su máximo a las 24 h después de la estimulación con HGF. Igualmente la proteína antioxidante GPX1/2 se elevó significativamente a las 24 h. Mientras que otra proteína importante para el balance redox, la GTSM incrementó importantemente desde las 12 h y se mantuvo así hasta las 24 h (Figura 2C y 2D).

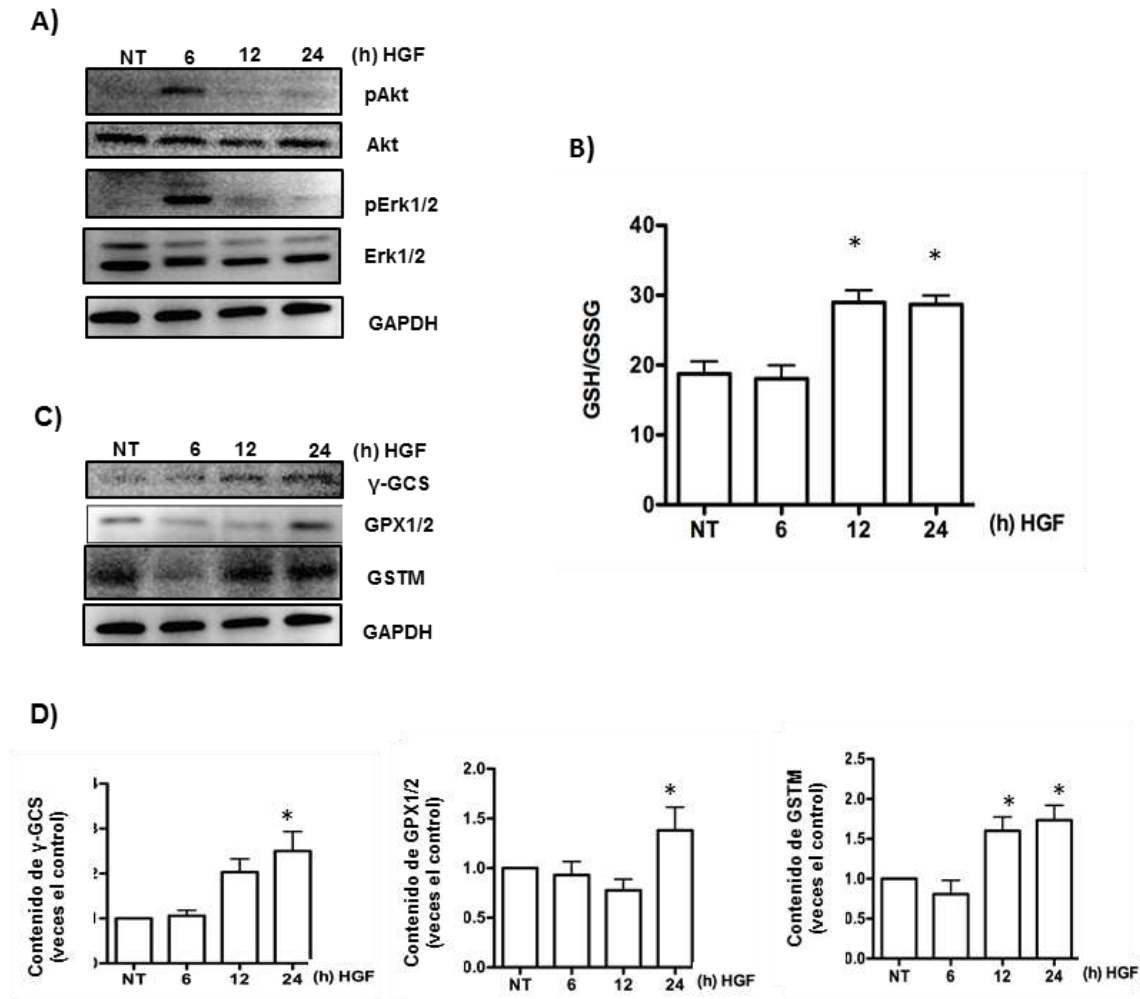


Figura 2. El HGF activa rutas canónicas de supervivencia y la expresión de genes blanco. A) Activación de Akt y Erk1/2 determinadas por Western Blot. B) determinación del cociente de GSH reducido a GSH oxidado. C) Western Blot de las principales proteínas antioxidantes. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usó como control de carga. D) Análisis densitométrico de los Western Blot de las proteínas antioxidantes. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos tres ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs NT ratones control.

El HGF provee protección contra la pancreatitis aguda

Posteriormente, se evaluó la respuesta desplegada por el HGF en el modelo experimental de pancreatitis aguda inducida por ceruleína. El tratamiento con HGF previo a la inducción de pancreatitis (HGF+Cn) condujo a una disminución evidente del tamaño del órgano (Figura 3A) con respecto al tratamiento de solo Cn, y que se ve reflejado en un cambio significativo en el cociente de peso del páncreas con respecto al peso corporal (Figura 3B). Consistentemente, la evaluación histológica (Figura 3C) muestra signos típicos de PA por ceruleína como son: edema intersticial, formación de vacuolas, infiltración de neutrófilos y células mononucleares, mientras que con el pre-tratamiento de HGF estos marcadores de daño inducidos por la Cn se ven drásticamente disminuidos.

Como está bien documentado por reportes de diferentes grupos (Lunova M. *et al.*, 2012, Gaziova I. *et al.*, 2016, Komar H. M. *et al.*, 2017), la administración de Cn causó un importante incremento en la actividad de amilasa medida en suero de ratones. Sin embargo, el pretratamiento con HGF mantuvo la actividad de esta enzima a valores comparables con los ratones control (Figura 3D). Así mismo se observó que la Cn incrementó significativamente la concentración de lipasa en suero y que el pre-tratamiento con HGF mantuvo el contenido de esta enzima en suero comparable a valores control (Figura 3E).

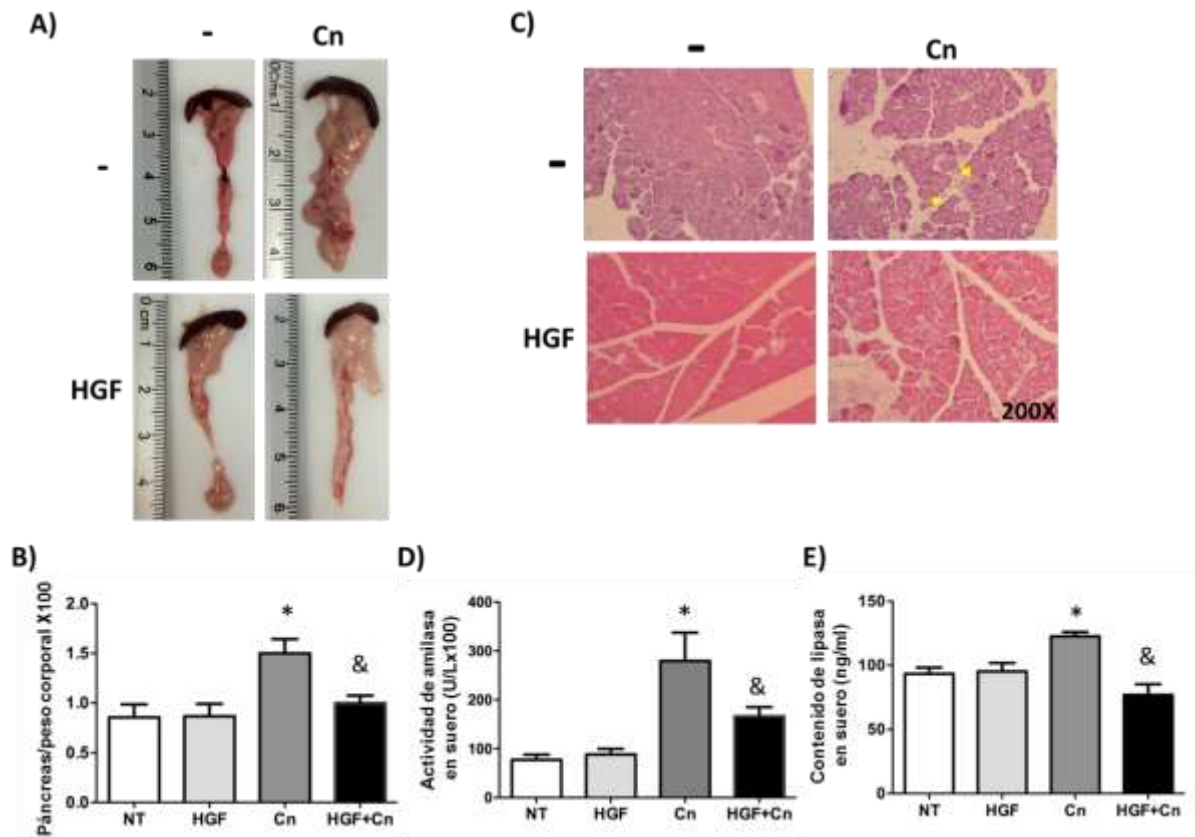


Figura 3. El HGF despliega una respuesta de protección contra la pancreatitis aguda inducida por ceruleína. A) Vista macroscópica de los páncreas de diferentes grupos. El bazo se preservó como referencia; B) Cociente de páncreas peso corporal; C) Tinción histológica por H&E, las flechas indican infiltrado de neutrófilos. Imágenes son representativas de al menos tres ratones diferentes, magnificación original 200X; D) Actividad de amilasa en suero; E) Cuantificación de lipasa en suero. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos cuatro ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT, &, $p \leq 0.05$ vs tratamiento con Cn.

Durante la pancreatitis aguda los pulmones son órganos frecuentemente afectados (Elder A. S. *et al.*, 2012), debido a esto se decidió evaluar si el tratamiento con HGF induce prevención sistémica en el modelo de PA. De forma consistente con la disminución de la severidad de los signos de daño en el páncreas, el análisis histológico del pulmón reveló menos áreas neumónicas en los ratones que recibieron el tratamiento con HGF, que presentaron una estructura

alveolar bien definida comparada con el tratamiento de Cn donde se observó infiltrado inflamatorio significativo dentro del tejido alveolar (Figura 4).

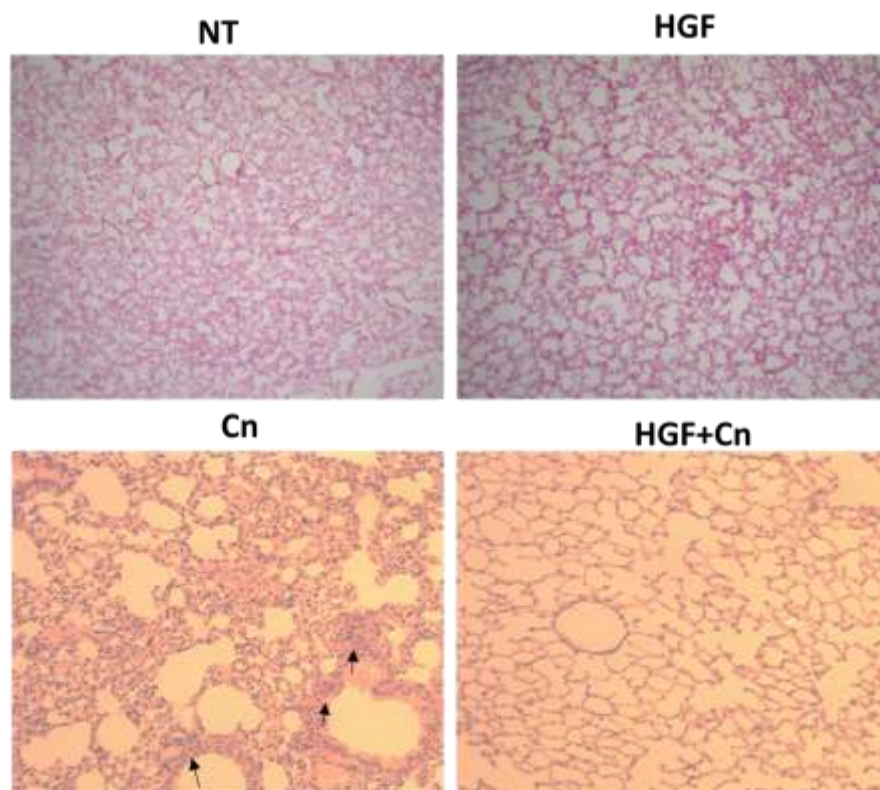


Figura 4. El HGF induce protección sistémica, previniendo inflamación en el pulmón. Tinción histológica por H&E de tejido pulmonar de diferentes grupos. Las flechas señalan infiltrado de neutrófilos, magnificación original 200X. Imágenes representativas de al menos cuatro ratones.

Para confirmar el efecto de protección debido al HGF, se implementó otro modelo murino de pancreatitis aguda utilizando el aminoácido esencial L-Arginina (L-Arg). Los ratones tratados con L-Arg mostraron un incremento en el cociente de peso páncreas peso corporal (Figura 5A), mientras que los ratones que recibieron el pre-tratamiento con HGF mostraron un cociente comparable a los grupos control, al cuantificar los niveles de lipasa pancreática en suero (Figura 5B), se encontró que estos se mantuvieron a niveles basales en contraste con el grupo que solo

recibió L-Arg. Al determinar la actividad de amilasa pancreática en suero del grupo de ratones pre-tratados con HGF, se encontró disminuida con respecto al grupo que solo recibió L-Arg (Figura 5C). Con los resultados obtenidos hasta el momento se corrobora, con dos modelos de pancreatitis aguda que poseen diferente mecanismo de daño al páncreas, el efecto de protección tanto de manera local en el propio páncreas, así como de manera sistémica como se observó en el tejido pulmonar, al encontrar que el HGF disminuye las áreas neumónicas causadas por el infiltrado de células inflamatorias en dicho órgano.

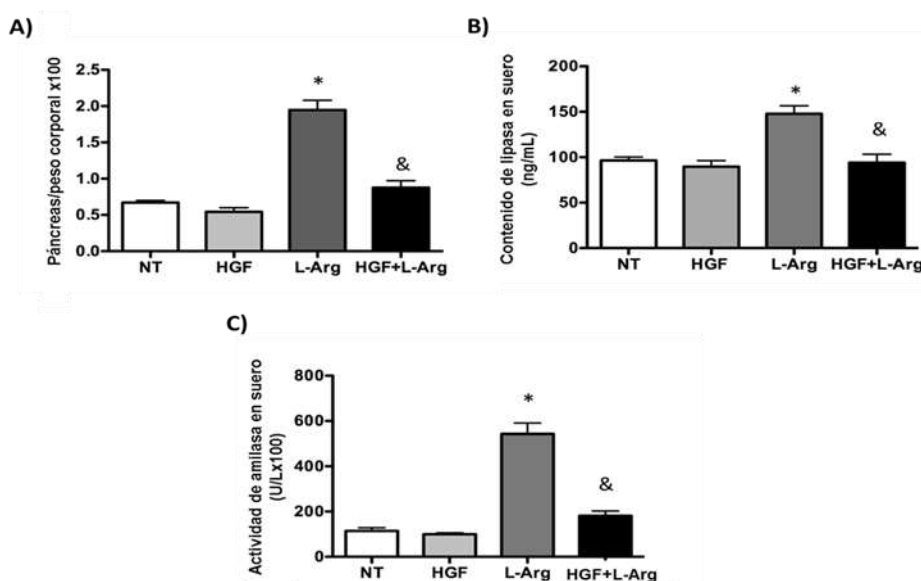


Figura 5. El HGF protege contra pancreatitis aguda inducida por L-Arginina (L-Arg). A) Cociente peso del páncreas peso corporal; B) Cuantificación de lipasa pancreática en suero; C) Actividad de amilasa pancreática en suero. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos cuatro ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT, &, $p \leq 0.05$ vs tratamiento con Cn.

El HGF despliega una respuesta antioxidante que contrarresta el estrés oxidante inducido por la Cn.

Para describir el efecto del HGF en el modelo de PA inducida por Cn, se evaluaron los niveles de ERO mediante microscopia confocal utilizando dihidroetidio (DHE) en tejido fresco de páncreas, la administración previa de HGF mostro una prevención significativa en la producción de las ERO (Figura 6A) en comparación al tratamiento de solo Cn en el cual se incrementó significativamente hasta aproximadamente tres veces los niveles control. Consistentemente con el fenómeno anterior, el tratamiento con Cn incrementó la lipoperoxidación significativamente hasta casi el doble respecto a los controles, en contraste la lipoperoxidación se previno de manera importante al aplicar HGF previo a la Cn (Figura 6B) a valores similares al control.

Al ver estos resultados surgió la pregunta de si este efecto de protección antioxidante se debía a que el HGF incrementa los niveles de GSH. Se conoce que uno de los principales reguladores de los niveles de glutatión es el factor de transcripción Nrf2 (Yang H. *et al.*, 2005), por lo cual se evaluó su activación y se encontró que, el HGF por si solo incrementó la unión al ADN del factor de transcripción Nrf2 respecto al control, en contraste la Cn por sí sola no propició su activación sin embargo, al aplicar el tratamiento HGF+Cn el factor de transcripción Nrf2 se activó de manera significativamente diferente comparado con solo HGF (Figura 7A). Posteriormente se obtuvo el cociente de glutatión reducido glutatión oxidado, y se observó que la Cn promovió un incremento significativo en los niveles de glutatión comparado con el control. Sin embargo el tratamiento

HGF+Cn incrementó los niveles de GSH significativamente con respecto a solo Cn (Figura 7B), este efecto antioxidante se confirmó al determinar enzimas antioxidantes reguladas por Nrf2; que en el caso de la γ -GCS y GSTM fueron inducidas por el HGF, pero el pre-tratamiento con HGF mantuvo los niveles de estas enzimas y se previno su disminución por efecto de la Cn (Figura 7C). La enzima antioxidante GPX1/2 incrementó con el tratamiento de Cn, sin embargo el efecto se potencio con el tratamiento HGF+Cn (Figura 7C).

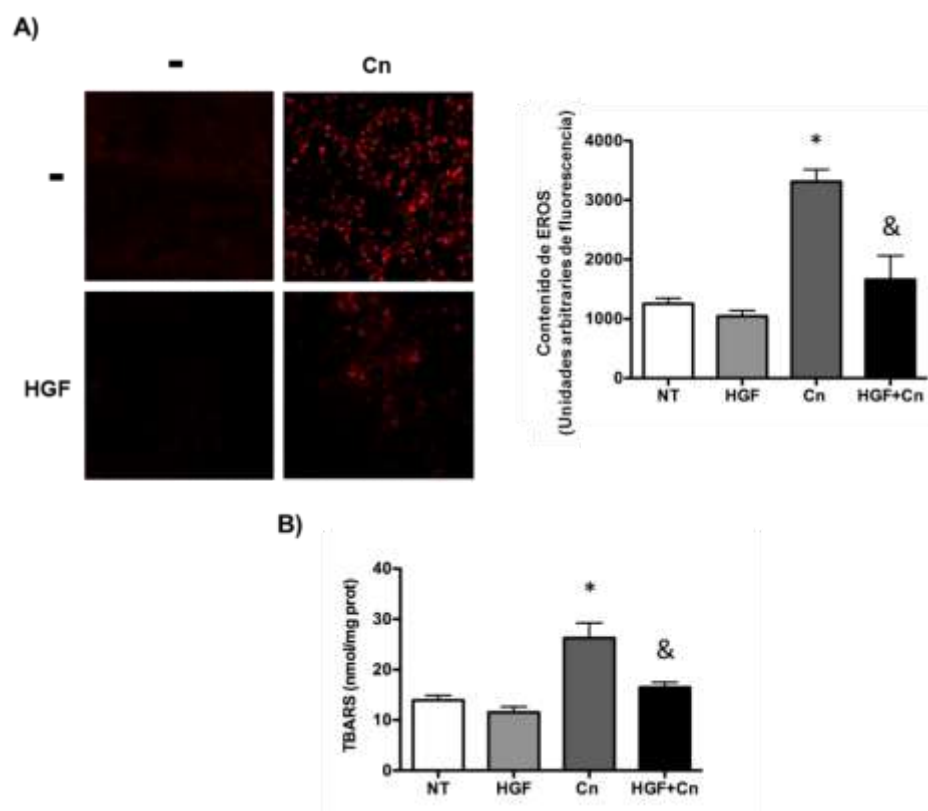


Figura 6. El HGF previene el incremento de las especies reactivas de oxígeno causadas por la pancreatitis aguda. A) Determinación *in situ* de especies reactivas de oxígeno mediante dihidroetidio (DHE, 5 μ M, en rojo), imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal y cuantificación de la fluorescencia de la determinación de ERO. Magnificación original 100X; B) Determinación de lipoperoxidación mediante sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos cuatro ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT, &, $p \leq 0.05$ vs tratamiento con Cn.

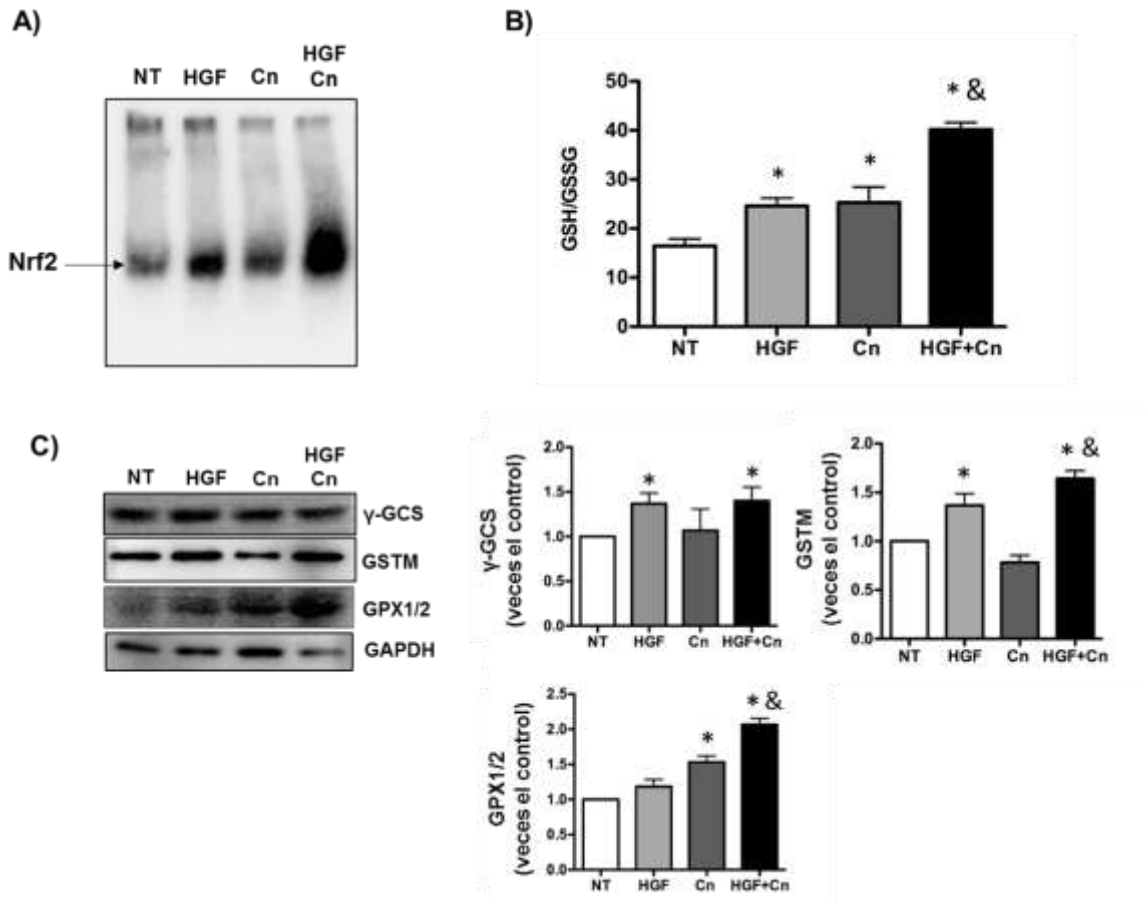


Figura 7. El HGF activa al factor de transcripción Nrf2 e induce la síntesis de glutatión. A) Actividad de unión del factor de transcripción Nrf2 por ensayo de movilidad electroforética (EMSA); B) Determinación de glutatión reducido (GSH) glutatión oxidado (GSS), reportado como cociente GSH a GSS; C) Western Blot de las principales proteínas antioxidantes y análisis densitométrico. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) se utilizó como control de carga. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos cuatro ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT, &, $p \leq 0.05$ vs tratamiento con Cn.

El HGF induce protección anti-apoptótica en el modelo de PA.

Se sabe que el estrés oxidante juega un papel importante en el proceso de apoptosis, particularmente en la PA (Liu M. *et al.*, 2016, Xie Q. *et al.*, 2017) por ello se analizó el contenido y la activación de las principales proteínas involucradas en la apoptosis. Se observó que la Cn incrementa la activación de p38, así como su contenido total, en contraste el pre-tratamiento con HGF previno la activación de p38 inducida por la Cn (Figura 8A), de la misma manera el HGF disminuyó a la proteína reguladora de apoptosis Bax en comparación con el tratamiento de solo Cn que mostró un incremento. Adicionalmente se encontró que el tratamiento con HGF ejerció una disminución en p38 total, en comparación con el control. Por otro lado, con respecto a la proteína reguladora de apoptosis Bcl2 la Cn disminuye su contenido y el HGF no tuvo efecto sobre ella. Sin embargo en el caso de la proteína anti-apoptótica Mcl-1, el HGF no ejerce efecto, observando que el tratamiento con Cn disminuye su contenido. Con el fin de evaluar si estas proteínas conducen a un efecto de sobrevivencia se midió la activación de caspasa 3 (Figura 8B). el pretratamiento con HGF previno significativamente la activación de la caspsa3, reduciendo casi un 50% esta actividad cuando se compara con el tratamiento de Cn, alcanzando valores comparables al control. Esta disminución también se confirmó mediante Western Blot (Figura 8C) donde se observa que la Cn induce la activación de la caspasa 3 y que el tratamiento con HGF previno su activación.

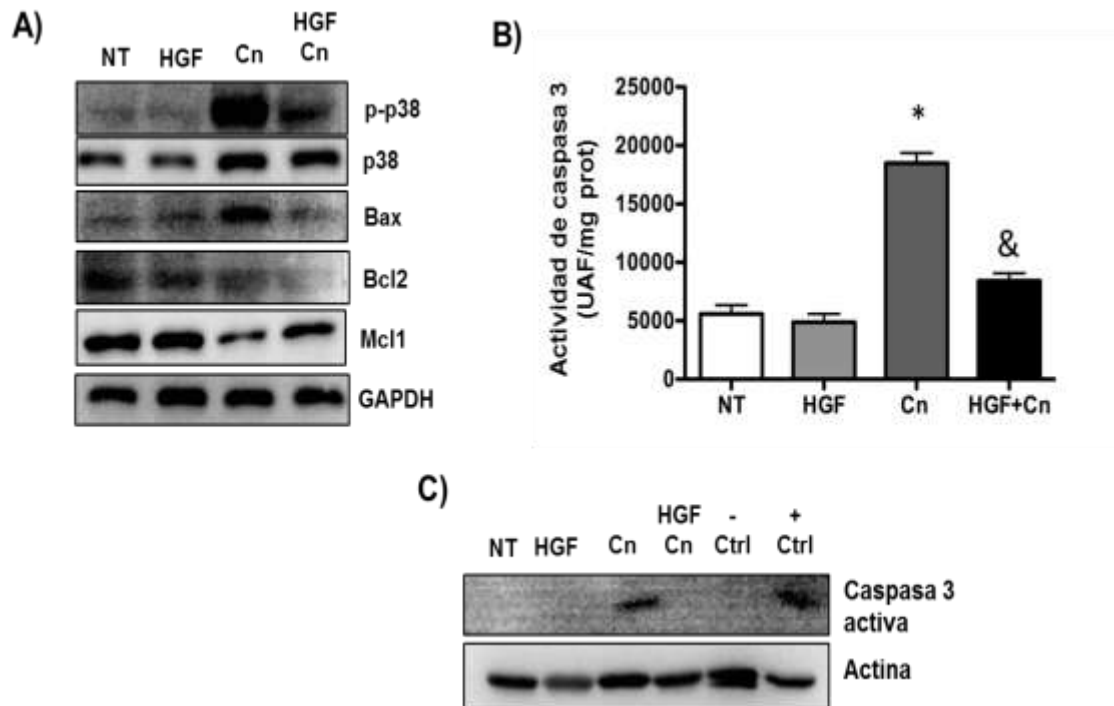


Figura 8. El HGF inicia una respuesta anti-apoptótica. A) Western Blot de proteínas relacionadas con apoptosis, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se utilizó como control de carga; B) Actividad de caspasa 3 en homogenado de tejido completo. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos cinco ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT, &, $p \leq 0.05$ vs tratamiento con Cn; C) Western Blot para caspasa 3 activa, control positivo (+Ctrl) hepatocitos tratados con 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo Jo2 como control positivo. Control negativo (-Ctrl) lisado de la línea celular hepática Huh7. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Se utilizó actina como control de carga.

El HGF modula la activación de las rutas Stat3, Erk1/2 y Akt así como a factores de transcripción canónicos en la PA.

Se sabe qué factores de transcripción como NF- κ B y Stat3 juegan un papel muy importante en el inicio y curso de la pancreatitis aguda (Yubero S. *et al.*, 2009, Williard D. E. *et al.*, 2010, Huang H. *et al.*, 2013). Además de Nrf2, otro factor de transcripción importante en la regulación del estado redox es el factor de transcripción AP-1. Adicionalmente se tiene evidencia que el HGF y su receptor c-Met regulan a los factores de transcripción NF- κ B, Stat3 y AP-1 (Kermorgant S. *et al.*, 2005, Li X. Y. *et al.*, 2010, Mellado-Gil J. *et al.*, 2011, Li N. *et al.*, 2018) debido a esto se midió la activación de rutas como Stat3, Akt y Erk1/2 las cuales conducen a la activación de los factores de transcripción mencionados anteriormente. Por Western Blot se observó que las rutas de Stat3, Akt y Erk1/2 se activan de manera importante por efecto de la Cn, no obstante el HGF previno el incremento en la fosforilación tanto de Stat3, Akt y de Erk1/2 (Figura 9A) inducida por la Cn. Mediante un ensayo de movilidad electroforética (EMSA), se estudió el efecto del HGF en la activación de los factores de transcripción NF- κ B, AP-1 y Stat3. Los resultados muestran que el HGF indujo la activación de NF- κ B, AP-1 y Stat3 (Figura 9B). El tratamiento de Cn disminuyó la activación tanto de NF- κ B como de AP-1 a diferencia de Stat3 que la incrementó comparado con el control. Adicionalmente se observó que el tratamiento con HGF+Cn indujo una fuerte activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, en contraste para Stat3 se vio disminuida la unión al ADN en comparación con solo Cn (Figura 9B).

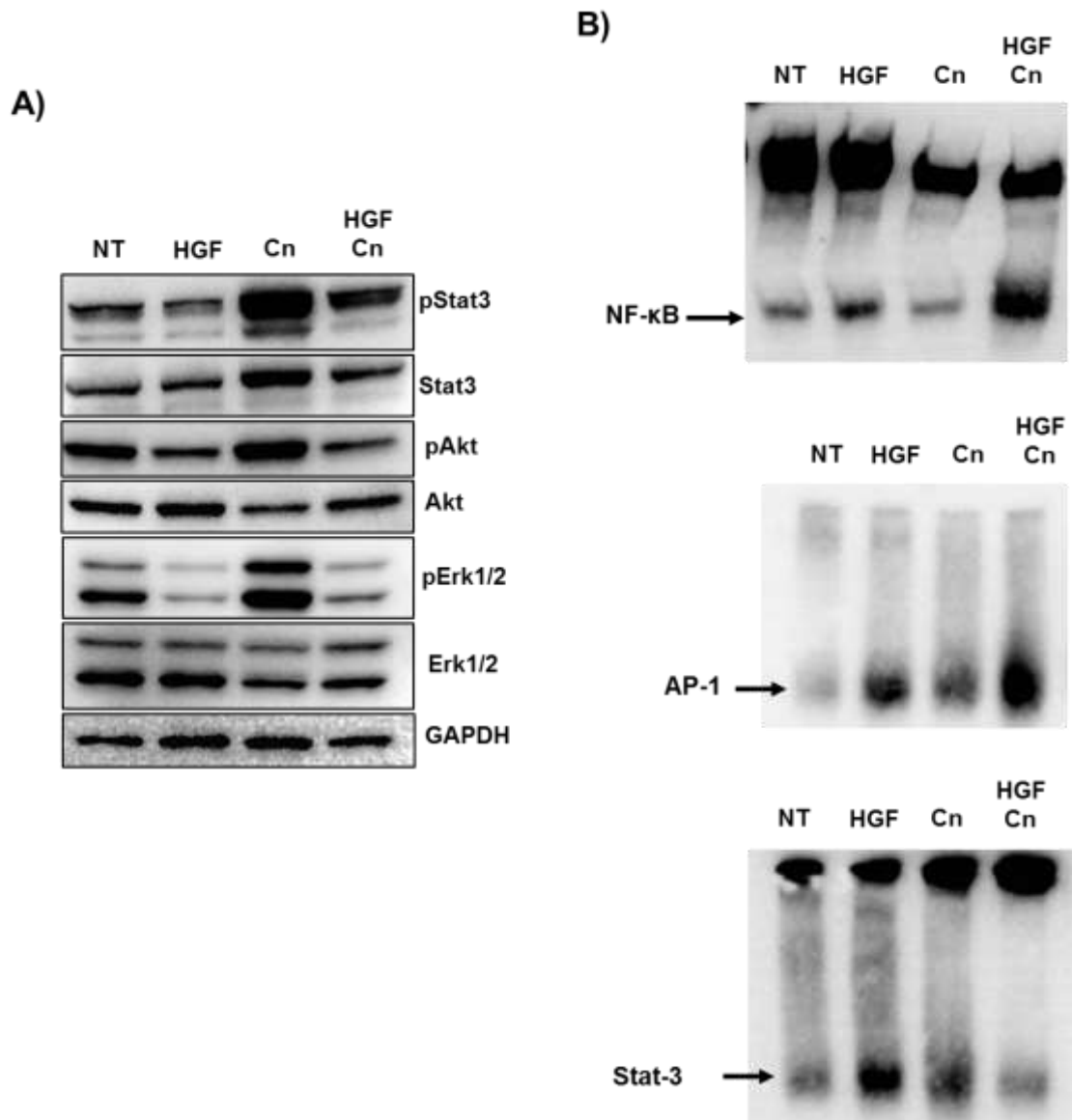


Figura 9. El HGF modula la activación de Stat3, Akt y Erk1/2 así como a factores de transcripción canónicos en la pancreatitis aguda. A) Determinación de las rutas de señalización Stat3, Erk1/2 y Akt por Western Blot de los diferentes grupos; B) Actividad de unión de los factores de transcripción NF-κB, AP-1 y Stat3 por ensayo de movilidad electroforética (EMSA). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes.

En resumen, los niveles de HGF se incrementan en el suero de los ratones tratados a los que se les indujo PA por Cn, adicionalmente hay un aumento importante en el mensajero del receptor c-Met por efecto de la Cn.

Se demostró que en condiciones basales el páncreas responde a la estimulación con HGF e induce la activación de las rutas de sobrevivencia Akt y Erk1/2. Así como el incremento en los niveles de glutatión, y enzimas antioxidantes como la γ -GCS, GSTM y GPX1/2.

En el modelo de prevención de la PA inducida por Cn se observó que, la administración de HGF indujo protección tanto al páncreas como al pulmón. En primer lugar al preservar el tamaño del páncreas que se ve reflejado cuantitativamente en el cociente de peso del páncreas peso corporal, el cual se encontró a valores comparables al control. Segundo, al disminuir los signos típicos de la PA como son: edema intersticial e infiltrado de neutrófilos en el tejido pancreático. Así como también, previno el incremento en los niveles de lipasa y la actividad de amilasa en suero. En tercer lugar se puede observar que, el HGF indujo protección al pulmón contra la Cn al disminuir las áreas neumónicas causadas por el abundante infiltrado inflamatorio.

Se determinó que el HGF despliega una respuesta antioxidante, al prevenir el incremento de las ERO causadas por la Cn, que se vio reflejado en la disminución de la lipoperoxidación y el incremento en los niveles de glutatión. Esto corresponde con una activación incrementada del factor de transcripción Nrf2. Y el aumento en el contenido de las proteínas antioxidantes γ -GCS, GSTM y GPX1/2. Adicionalmente se reporta que el HGF disminuye la fosforilación y contenido de

p38, así como el contenido de Bax. En cambio, la proteína anti-apoptótica Mcl-1 se mantuvo como el control debido al HGF y no disminuyó por efecto de la Cn. Otro efecto importante es que la activación de la caspasa 3 se mantuvo a valores comparables al control debido al pre-tratamiento con HGF.

Se describe que en la PA el HGF disminuye la activación de las rutas Stat3, Erk1/2 y Akt. Y activa de manera diferencial a factores de transcripción, por un lado incrementando aquellos factores que regulan el estrés oxidante como NF- κ B y AP-1. Por otro lado disminuyendo la activación de factores de transcripción involucrados en la síntesis de precursores pro-inflamatorios como Stat3.

Por otro lado, utilizando otro modelo para inducir PA con L-Arg, que posee un mecanismo de daño diferente al de la Cn, se demostró que también el HGF indujo protección, debido a que se conservó el cociente del páncreas peso corporal a valores similares al control. De la misma manera el contenido de lipasa y la actividad de amilasa en suero fueron comparables a valores control.

Los datos obtenidos nos muestran que el HGF es capaz de prevenir el daño inducido por la Cn pero, este estudio no sería relevante si no se atiende la necesidad clínica en la cual, inicialmente se establece la patología y posteriormente se da un tratamiento apropiado, debido a esto se decidió evaluar el potencial del HGF para estudiar el efecto de reversión en la PA. Para cumplir con este objetivo se estableció un modelo, en el cual se administró el HGF (20 μ g/kg) 3 h después de la última dosis de Cn y 16 h posteriores al tratamiento con HGF se procedió a analizar el daño inducido por la PA.

El HGF compensa el daño causado por la Cn en un modelo de reversión de PA.

Sorprendentemente, se observó que el tratamiento de HGF es capaz de revertir el daño inducido por la Cn, al disminuir el cociente del páncreas peso corporal en el grupo Cn+HGF comparado con el grupo de solo Cn (Figura 10A), como se observa en la Figura 10B el HGF preservó el tamaño del órgano que es comparable a los controles. Además el contenido de lipasa (Figura 10C) así como la actividad de amilasa en suero (Figura 10D) muestran una mejoría significativa debido al tratamiento con HGF en contraste a solo Cn. Asimismo, al analizar microscópicamente la estructura del tejido pancreático se encontró que: en el grupo de PA tratado con HGF se conservó la estructura del páncreas mostrando menor infiltrado inflamatorio y edema en comparación al grupo que solo recibió Cn, donde se observa infiltrado inflamatorio y edema intersticial (Figura 10E).

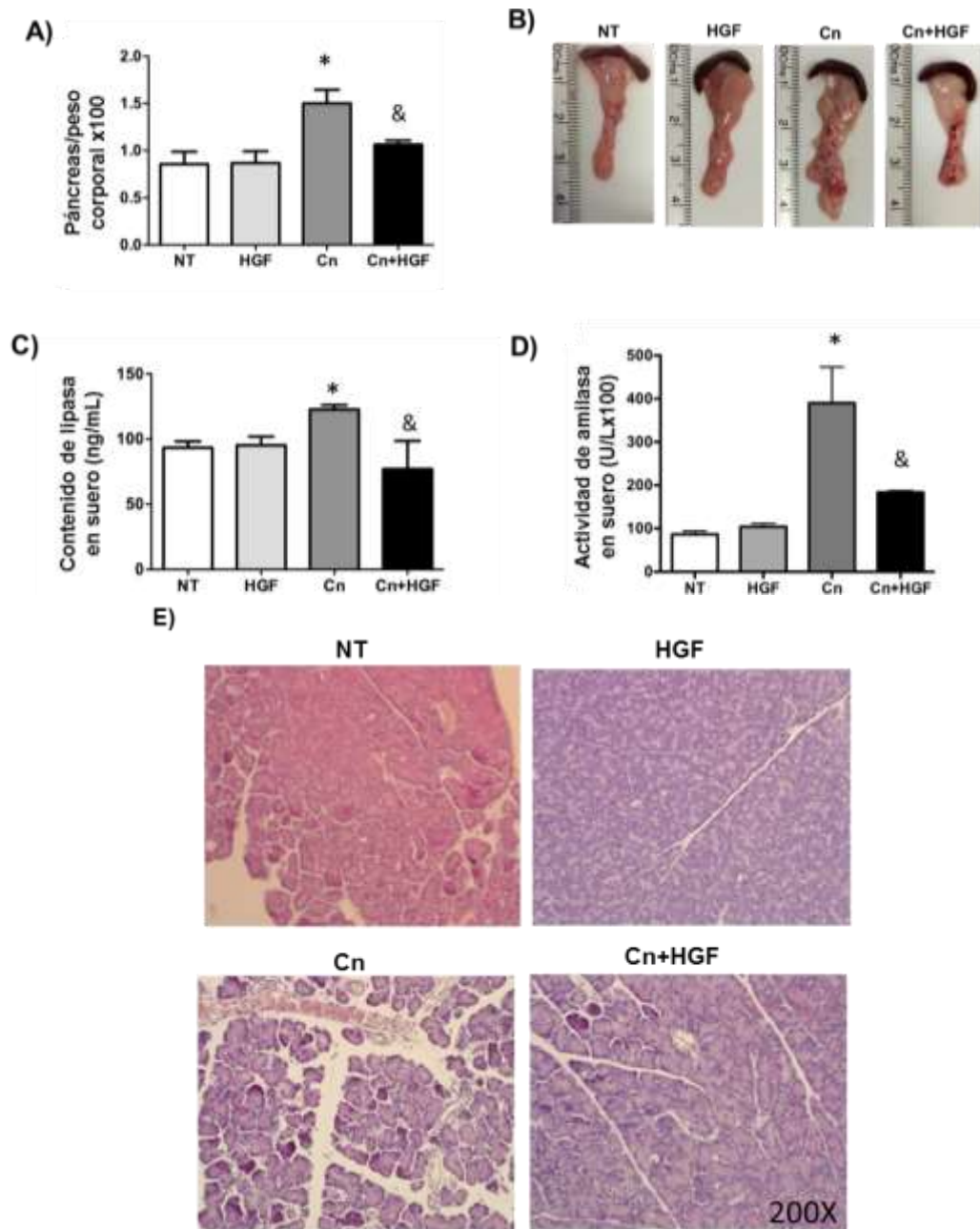


Figura 10. El HGF revierte del daño inducido por la ceruleína (modelo de reversión). A) Cociente de páncreas peso corporal; B) aspecto macroscópico del páncreas de los diferentes grupos. El bazo se preserva como referencia, las imágenes son representativas de al menos cuatro ratones diferentes; C) Contenido de lipasa en suero; D) Actividad de amilasa en suero; E) Apariencia histológica con tinción de H&E, magnificación original 200X. Cada columna representa la media $\pm$ SEM de al menos cuatro ratones diferentes. *, $p \leq 0.05$ vs ratones control NT, &, $p \leq 0.05$ vs tratamiento con Cn.

El HGF contrarresta al estrés oxidante inducido por la Cn en un modelo de reversión

Al determinar las especies reactivas de oxígeno *in situ* utilizando dihidroetidio (5 μ M) se observó que el tratamiento con HGF es capaz de contrarrestar la explosión de radicales libres inducidos por la Cn (Figura 11A) y esto es debido a que la respuesta desplegada por el HGF fue capaz de preservar los niveles de proteínas antioxidantes como GPX1/2, HO-1, Trx1 (Figura 11B). Por otro lado, la G6PD una proteína importante en la ruta de las pentosas, que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato y en el proceso genera NADPH reducido utilizado para regenerar al glutatión (Chaudiere J. *et al.*, 1999), se vio incrementada por el tratamiento con Cn pero el HGF restituyó el valor a niveles basales (Figura 11B). Otro órgano blanco de la inflamación causada por la PA es el pulmón y al determinar las ERO *in situ* se observó que el HGF ejerció un efecto a nivel sistémico reduciendo los radicales libres en el tejido pulmonar (Figura 12).

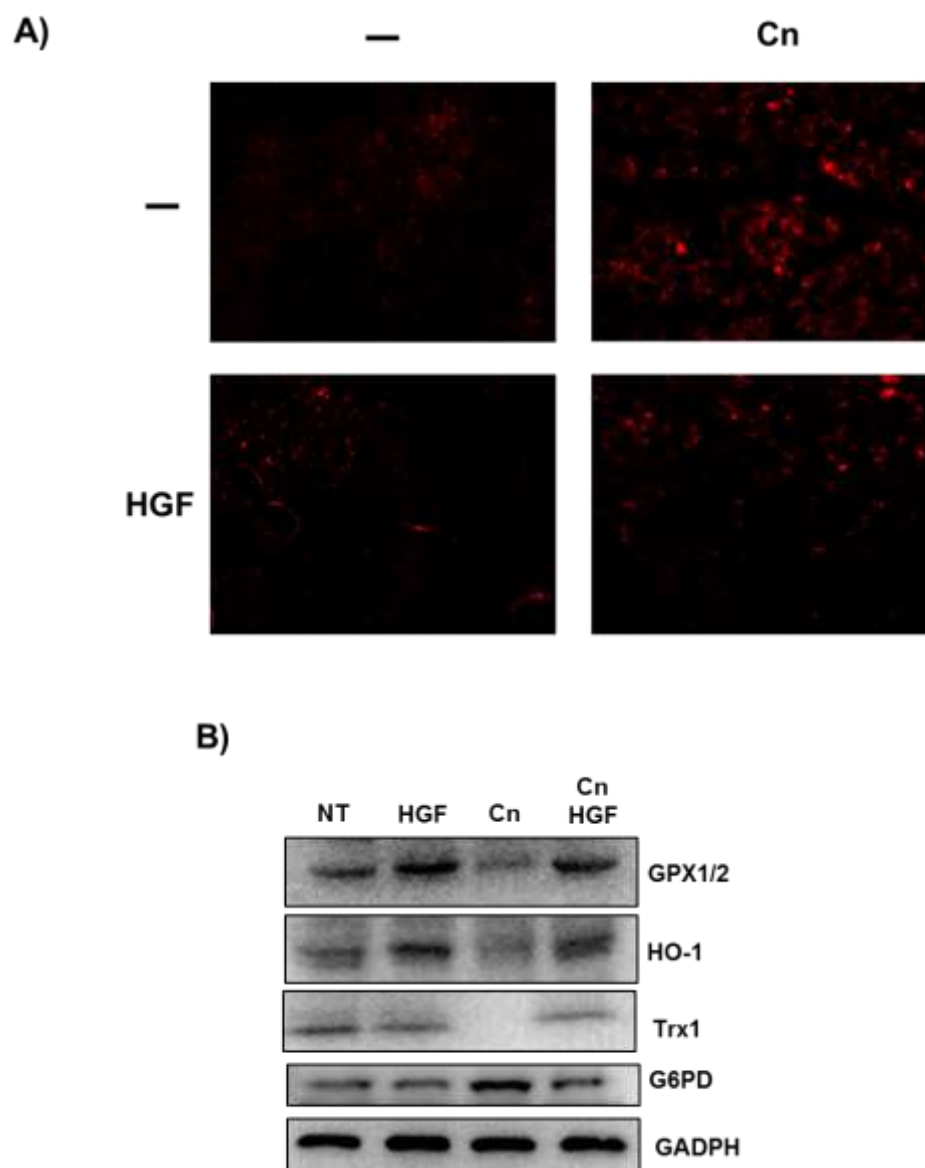


Figura 11. El HGF controla el estrés oxidante al mantener proteínas antioxidantes (modelo de reversión). A) Especies reactivas de oxígeno en tejido pancreático determinadas mediante fluorescencia con dihidroetidio (DHE, 5 μ M en rojo), imágenes representativas obtenidas por microscopia confocal. Magnificación original 100X, control (—), ceruleína (Cn), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF); B) Western Blot de proteínas antioxidantes. Glicerinaldehido-3-fosfato deshidrogenasa se utilizó como control de carga. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

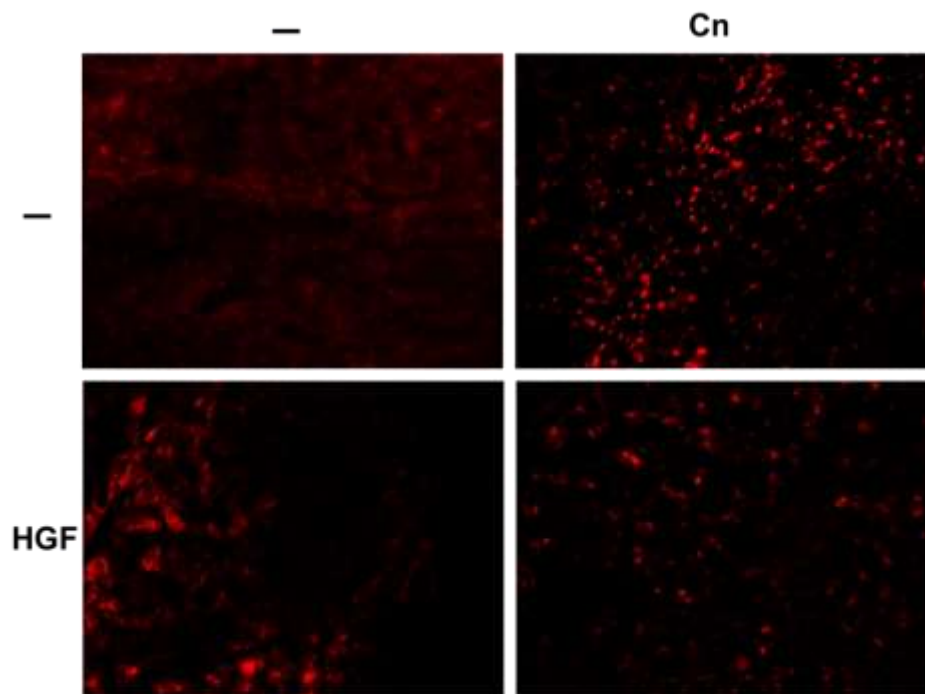


Figura 12. El HGF disminuye a las especies reactivas de oxígeno en pulmón (modelo de reversión). A) Especies reactivas de oxígeno en tejido pulmonar determinadas mediante fluorescencia con dihidroetidio (DHE, 5 μ M), imágenes representativas de al menos tres experimentos, obtenidas por microscopia confocal. Magnificación original 100X, control (—), ceruleína (Cn), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF).

El HGF activa rutas de sobrevivencia y regula enzimas productoras de citocinas pro-inflamatorias en el modelo de reversión.

Con la finalidad de conocer el mecanismo molecular desplegado por el HGF para inducir reversión del daño por la PA mediante Western Blot se analizó la activación de las rutas de señalización Akt, Stat3 y de las MAPKs Erk1/2 y p38, se encontró que el HGF no tiene efecto en la desregulación de estas vías de señalización en comparación con el tratamiento de Cn (Figura 13A). Sin embargo, al examinar a dos proteínas clave en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como son la

ciclooxigenasa 1 y 2 se observó que el HGF evita el incremento de estas proteínas por efecto de la Cn (Figura 13B).

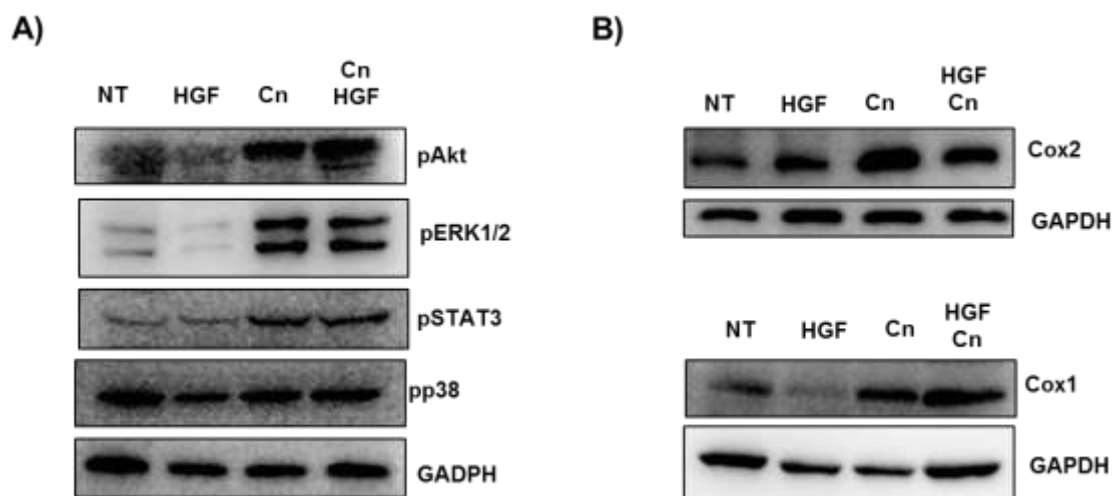


Figura 13. El HGF no tiene efecto en la activación de Akt, Erk1/2, Stat3 y p38 pero regula a la ciclooxigenasa 1 y 2. A) Determinación de la activación de rutas canónicas en la PA por Western Blot; B) Western Blot de proteínas involucradas en la síntesis de prostaglandinas pro-inflamatorias. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa se utilizó como control de carga. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

Los niveles de HGF se incrementan en pacientes con pancreatitis

En reportes previos se ha demostrado que los niveles de HGF en suero de pacientes con pancreatitis aguda correlaciona con el daño y se ha propuesto como un marcador pronóstico (Ueda T. *et al.*, 1996, Menke A. *et al.*, 1999, Ueda T. *et al.*, 2000), debido a esto decidimos evaluar en pacientes los niveles de HGF en suero para corroborar si se cumple esta correlación, los niveles de HGF se cuantificaron en los pacientes al ingresar al hospital y a diferentes tiempos 0, 24, 48, 72 h y 7 días después de su ingreso al hospital.

Los niveles de HGF en pacientes con pancreatitis se encontraron significativamente elevados con respecto a individuos “sanos” (Figura 14), sin embargo no se encontró relación alguna con la gravedad de la pancreatitis (datos no mostrados) debido al bajo número de muestras procesadas para los niveles de HGF.

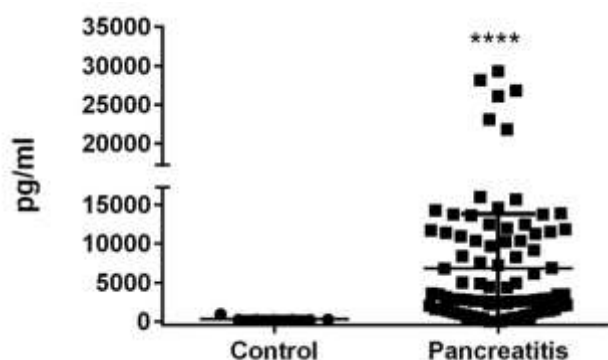


Figura 14. Los niveles de HGF en suero se incrementan significativamente en pacientes con pancreatitis. Se tomaron muestras de suero de pacientes con pancreatitis. Los niveles de HGF fueron cuantificados por ELISA, la gráfica representa cada valor en cuadros y la desviación estándar, ****, $p \leq 0.001$ vs individuos sanos.

En resumen, la administración del HGF posterior a la inducción de PA inducida por Cn disminuyó significativamente los signos de daño de la PA, debido a que se preservó el aspecto macroscópico del páncreas, igualmente se mantuvo el cociente del peso del páncreas peso corporal como el control, así como también en la histología se mostró menor edema e infiltrado inflamatorio comparado con solo Cn. De igual manera en el grupo Cn+HGF el contenido de lipasa y la actividad de amilasa en suero se mantuvieron a niveles similares al control.

El tratamiento con HGF evitó el incremento de las ERO a causa de la Cn determinadas por DHE. Así como también el HGF ayudo a mantener los niveles

de proteínas antioxidantes como la GPX1/2, HO-1 y Trx1, proteínas que se vieron afectadas de manera importante por efecto de la Cn. La G6PD se incrementó a causa del tratamiento con Cn pero, en el tratamiento Cn+HGF se mantiene comparable al control.

El HGF mantuvo la activación de rutas de sobrevivencia como la vía de Akt y Stat3, de la misma manera la ruta de las MAPKs se mantuvo activa como son Erk1/2 y p38. En cambio el tratamiento HGF+Cn condujo a la disminución de la Cox1 y la Cox2 en comparación con solo Cn.

El HGF tuvo un efecto benéfico a nivel sistémico, al controlar la explosión de las ERO en el pulmón inducidas por el tratamiento con Cn.

Por último se demostró que los niveles de HGF se incrementan en suero de pacientes con pancreatitis, al igual que se observó en el modelo experimental utilizando Cn.

El HGF induce señalización por calcio en células acinares, esta señalización se inhibe al administrar cafeína.

Para evaluar si células acinares aisladas de páncreas de ratones responden al HGF, se registró la señalización a calcio mediante el sensor Fluo-4 por microscopia confocal. El HGF indujo señalización a calcio en células acinares (Figura 15), a una concentración de 50 ng/ml, como muestran los trazos cada célula responde al HGF a diferentes tiempos, también se puede observar que la liberación de calcio se da en picos y que la cantidad de calcio liberada disminuye consecutivamente, hasta que la señalización cesa aproximadamente a los 2800 s.

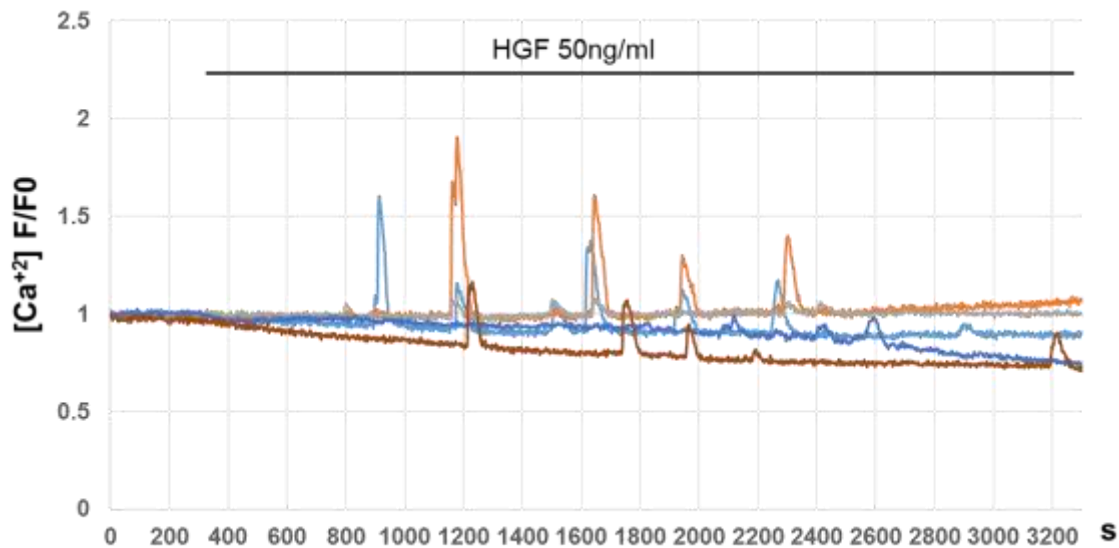


Figura 15. El HGF induce señalización a calcio en células acinares. Ejemplo de la señalización a Ca^{2+} inducida por el HGF, determinación con Fluo-4 (5 μM) mediante microscopía confocal. Cada trazo representa la respuesta de una célula. La concentración de Ca^{2+} extracelular fue de 1 mM. En esta figura y en las siguientes gráficas se muestra la fluorescencia normalizada al cociente de la fluorescencia entre la fluorescencia inicial (F/F_0), segundos (s). Cada línea representa la respuesta de una célula.

Para demostrar que la concentración de 50 ng/ml es suficiente para saturar la respuesta celular al HGF (Figura 16), se expusieron primero a una concentración de 50 ng/ml y posteriormente a 100 ng/ml, observando que no hay efecto debido a la concentración más alta. Se demuestra que 50 ng/ml de HGF es suficiente para inducir la máxima respuesta a Ca^{2+} en células acinares.

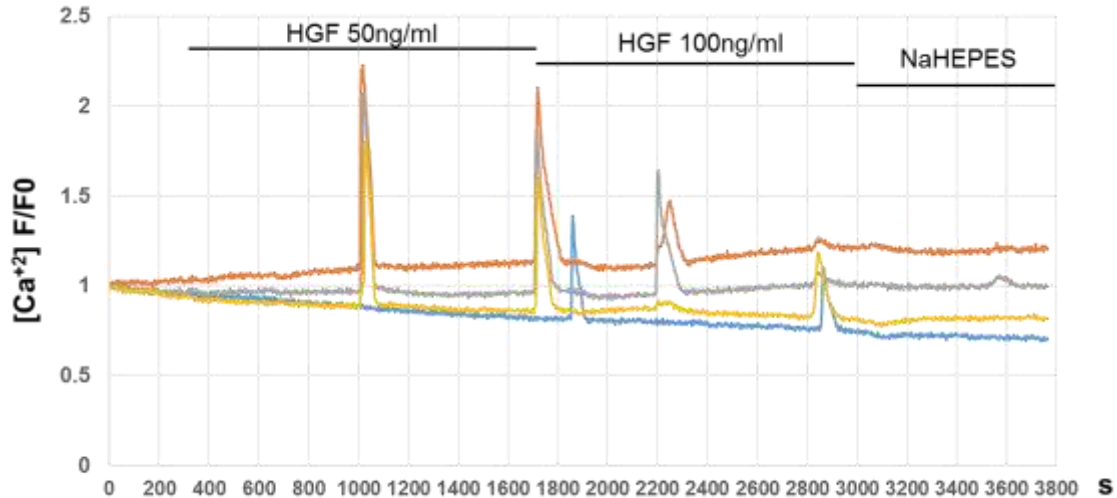


Figura 16. La respuesta a Ca^{2+} inducida por el HGF es independiente de la concentración. Ejemplo representativo de la señalización de Ca^{2+} inducida por el HGF a 50 ng/ml y 100 ng/ml. Cada trazo representa la respuesta de una célula. La concentración de Ca^{2+} extracelular fue de 1 mM, segundos (s). Cada línea representa la respuesta de una célula.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de la cafeína como un inhibidor a receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) que activan canales de Ca^{2+} . Se observó que el HGF induce el incremento de calcio intracelular no obstante, al aplicar cafeína (10 mM) la liberación de calcio cesa sin embargo, al lavar la cafeína se da nuevamente el incremento de calcio intracelular a manera de pulsos (Figura 17), la señalización continua y se reduce la concentración de Ca^{2+} liberada tras cada pico hasta su fin, posterior a los 2800 s.

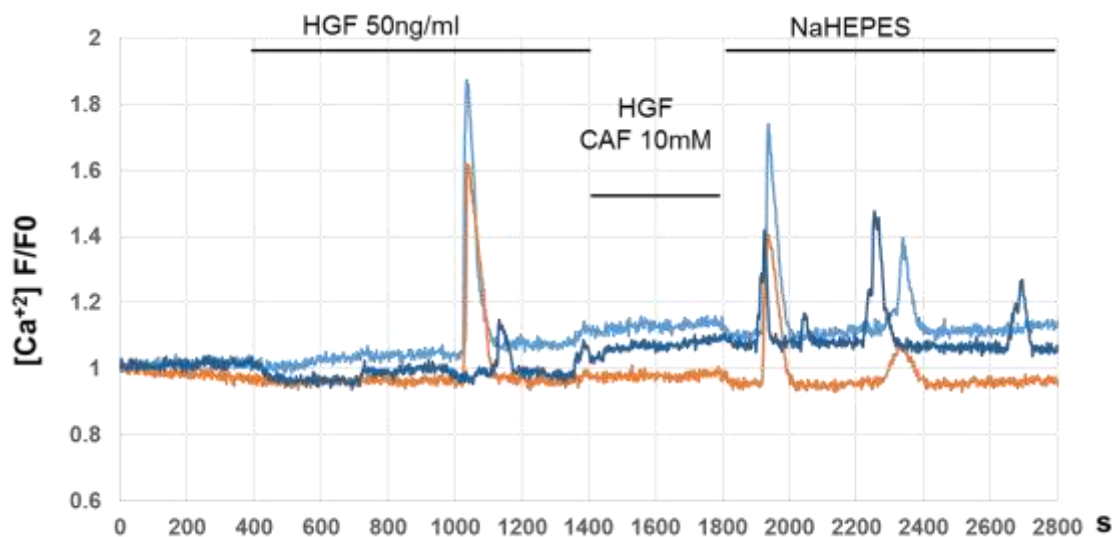


Figura 17. La señalización de calcio inducida por el HGF es sensible a la inhibición de receptores a IP3. Ejemplo representativo de trazos de la respuesta al HGF 50 ng/ml y a la exposición a cafeína (CAF, 10 mM). Cada trazo representa la respuesta de una célula. La concentración de Ca^{2+} extracelular fue de 1 mM, segundos (s). Cada línea representa la respuesta de una célula.

Discusión

La pancreatitis aguda es la enfermedad pancreática más frecuente en el mundo y está pasando a ser una de las principales causas gastrointestinales de admisión hospitalaria a nivel mundial (Yadav and Lowenfels, 2013). Esto indica que es urgente identificar nuevas opciones de tratamiento y mejorar la terapia de soporte.

Entre los diferentes modelos animales de pancreatitis experimental que exhiben similitudes bioquímicas, morfológicas y patofisiológicas en varios aspectos de la pancreatitis aguda en humanos, el modelo de pancreatitis aguda inducida por ceruleína es uno de los modelos experimentales mejor caracterizados, por ello ampliamente utilizado para el estudio de esta enfermedad. La Cn es un péptido análogo a la colecistoquinina (CCK) la administración de dosis altas causa la máxima secreción de amilasa y lipasa pancreática resultando en pancreatitis, la cual es caracterizada por una producción y secreción desregulada de enzimas digestivas y un incremento de los niveles en suero de enzimas digestivas, vacuolización citoplásmica y la muerte de células acinares, formación de edema, e infiltrado de células inflamatorias en el páncreas. La PA severa puede desencadenar un síndrome de respuesta sistémica inflamatoria y síndrome de disfunción multiorgánica (Chan Y. C. *et al.*, 2007), en el presente trabajo se corroboró la manifestación de dichos signos de daño al páncreas y al pulmón.

El estrés oxidante se considera uno de los principales factores patogénicos en la PA. En la PA humana se ha reportado, el incremento en los niveles de lipoperoxidación en el tejido pancreático y la disminución en el contenido de

vitaminas antioxidantes en sangre (Kim H., 2008), en el presente estudio se demostró que la Cn incrementó a las ERO en el tejido pancreático así como también, la lipoperoxidación e incluso incrementó las ERO en pulmón, lo cual demuestra que el modelo utilizado es adecuado para el estudio de la PA.

Los efectos de protección-daño y daño-reparación inducidos por la ruta HGF/c-Met se han estudiado en diversos órganos, particularmente en hígado. Su efecto se ha descrito ampliamente por nuestro de investigación y otros grupos (Marquardt J. U. *et al.*, 2012, Clavijo-Cornejo D. *et al.*, 2013, Enriquez-Cortina C. *et al.*, 2013, Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2016). Así mismo, se han publicado algunos estudios que tienen como objetivo dilucidar los efectos del HGF en enfermedades pancreáticas, por ejemplo: en el caso de diabetes, Santangelo *et al.*, 2007 demostraron que el HGF ejerce un efecto de supervivencia al contrarrestar el estrés oxidante y consecuentemente inhibir la apoptosis inducida por la exposición crónica a ácidos grasos libres, en una línea celular derivada de células beta. Además con la creación del ratón con eliminación específica del receptor c-Met en páncreas (PancMet KO) por Mellado-Gil *et al.*, 2011; se demostró que los ratones con dicha condición, son más susceptibles al desarrollo de diabetes inducida por estreptozotocina que los ratones control, así como también los ratones PancMet KO mostraron una exacerbación en el infiltrado inflamatorio, incrementó en la producción de óxido nítrico y de citocinas en los islotes en comparación a los ratones control. Por otro lado en el páncreas exocrino, Gaziova *et al.*, 2016 reportaron que la expresión del receptor c-Met en el páncreas es crucial para la reparación del tejido pancreático tanto en la PA como en la pancreatitis crónica.

Ya que, la eliminación de c-Met ante la pancreatitis incrementó la inflamación, la muerte de células acinares así como también, retardó la regeneración del tejido pancreático exocrino comparado con los animales que si expresan al receptor c-Met.

Se ha propuesto que los niveles de HGF en suero pueden ser considerados un marcador útil en el diagnóstico de la severidad en PA y que puede estar relacionado a disfunción orgánica (Ueda T. *et al.*, 1996, Nieminen A. *et al.*, 2014).

Un incremento de HGF en plasma significa una exposición sistémica de numerosos órganos al HGF circulante pero, el HGF es acumulado predominantemente en órganos dañados. En otras palabras, los órganos intactos pueden escapar de la activación de c-Met por el HGF en sangre, posiblemente debido a que no hay necesidad de reparación del tejido (Nakamura T. *et al.*, 2010). Se ha reportado que para la activación del receptor c-Met inducida por el HGF, se requiere que el tejido epitelial cense el daño y se induzca la desfosforilación de la serina-985 (Ser-985) en c-Met, mediante la proteína fosfatasa-2A (PP2A), para así permitir la fosforilación en tirosinas e iniciar la transducción de señales por c-Met (Hashigasako A. *et al.*, 2004).

Es claro que los niveles fisiológicos patológicos circulantes de HGF en la PA no son suficientes para restaurar la función del páncreas, esto debido a que en la PA también se comprometen órganos como los pulmones, riñones, el corazón e hígado (Zhu A. J. *et al.*, 2003), pudiendo ser el HGF insuficiente para cubrir los requerimientos fisiológicos ante una considerable agresión a nivel sistémico como lo es la PA.

Debido a lo señalado anteriormente se han realizado investigaciones en las cuales se tiene como objetivo descifrar el papel que juega el HGF y su receptor c-Met en la PA. Varios estudios han demostrado que la ausencia de la señalización c-Met puede agravar el daño en diferentes órganos (Huh C. G. *et al.*, 2004, Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008) incluyendo el páncreas (Mellado-Gil J. *et al.*, 2011, Gaziova I. *et al.*, 2016). En el presente trabajo, nos enfocamos en el potencial del efecto protector y reparador inducido por la administración exógena de HGF en PA. Como se describió anteriormente en este trabajo, el HGF induce una respuesta de protección fisiológica importante cuando es administrado previo a la Cn (prevención). En el caso de reversión del daño, se encontró que el HGF es capaz de revertir el daño producido por la Cn, demostrando que el HGF exógeno previene y revierte el daño producido en páncreas en un modelo de PA.

Una de las principales fuentes sistémicas de HGF son los pulmones (Nakamura T. *et al.*, 2010), los cuales responden ante el daño secretando HGF por las células del estroma de origen mesénquimal. Está demostrado que principalmente los pulmones se comprometen en la PA (Elder A. S. *et al.*, 2012) de hecho, en nuestro modelo observamos áreas neumónicas en los animales tratados con Cn (Figura 5). El compromiso observado en los pulmones puede estar relacionado a una deficiencia en la síntesis de HGF.

Por otro lado, en páncreas datos en la literatura muestran que la CCK-8 induce una rápida internalización, fosforilación en Ser-985 y degradación de c-Met en células acinares (Hoffmann K. M. *et al.*, 2006) sin embargo, solo se reporta que el efecto de la CCK sobre el receptor c-Met inicia a los 10 min y se mantiene a poco

más de 45 min, lo cual sugiere que el efecto de represión del receptor c-Met termina poco después que cesa la activación del receptor CCK, para llevar a cabo la síntesis y localización en membrana del nuevo receptor c-Met. En este estudio se administró HGF previo a la Cn para asegurar su efecto protector. Como se ha demostrado en otros estudios el HGF es capaz de activar rutas de señalización en células acinares, las cuales inducen sobrevivencia (Aparicio I.M. *et al.*, 2003), debido a que las células acinares expresan al receptor a HGF. Adicionalmente Warzecha en el 2001, demostró que la administración de exógena de HGF atenúa el daño inducido por la pancreatitis en un modelo de rata. En el modelo de reversión se administró el HGF 3 h posteriores a la última dosis de Cn, cuando el daño al tejido está iniciado, por tanto se incrementa la localización de c-Met en el tejido pancreático (Nakamura T. *et al.*, 2010), adicionalmente en páncreas Gaziova *et al.*, 2016 reportó que c-Met se incrementa desde 1 h posterior al daño con Cn. En el presente estudio reportamos que los niveles del RNAm de c-Met, 24 h después del tratamiento con Cn, incrementaron 1.57 veces ($p=0.0211$) sin embargo, los niveles de HGF en suero no fueron significativos 24 h posteriores a la Cn, estos datos coinciden con lo reportado por Gaziova *et al.*, 2016, donde al medir el RNAm de c-Met se encuentra incrementado de manera transitoria desde 1h hasta las 72 h posterior a la Cn, y alcanza la máxima expresión a las 24 h, tanto en células acinares como ductales. Hasta el momento los resultados indican que la administración exógena de HGF asegura la biodisponibilidad del HGF propiciando así la activación del receptor y dando como resultado el efecto de protección o reparación.

En la PA el estrés oxidante es el principal detonador del daño, ya que amplifica el proceso inflamatorio a través del reclutamiento y liberación de mediadores pro-inflamatorios, llevando a una respuesta inflamatoria sistémica (Kim H., 2008, Criddle D. N., 2016). En el presente estudio se corroboró este hecho, los ratones tratados con Cn mostraron abundante infiltrado inflamatorio no solo en el páncreas, también en pulmón donde se exhiben múltiples focos de áreas neumónicas. Como es de esperar, la administración del HGF indujo un control eficiente de la generación de ERO y del daño oxidante juzgado por los niveles de lipoperoxidación, esto se correlacionó con el incremento en la síntesis de GSH, el cual correspondió con menor infiltrado inflamatorio en el páncreas y pulmones así como con una mejor histología. Previamente nuestro grupo de investigación demostró que la respuesta antioxidante desplegada por el HGF en el hígado se debe principalmente al sistema del GSH (Gomez-Quiroz L. E. *et al.*, 2008); dicho efecto antioxidante se demuestra ahora en el páncreas. Poco se ha descrito del mecanismo inducido por el HGF en el páncreas, Warzecha en el 2001 demostró que la administración exógena de HGF en ratas incrementa la concentración de IL-10 en plasma, una citosina anti-inflamatoria que reduce la activación de los macrófagos e inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias, así como de las ERO.

En este estudio, demostramos que el HGF está activando rutas canónicas de sobrevivencia como Akt y Erk1/2 y están relacionadas con la activación de Nrf2, por tanto al incremento de uno de los blancos canónicos de Nrf2, la γ -GCS, enzima limitante para la síntesis de GSH (Yang H. *et al.*, 2005). Además del efecto

antioxidante de Nrf2, se sabe que puede regular procesos inflamatorios (Zhang X. *et al.*, 2005) promoviendo una respuesta inflamatoria regulada. El incremento de las enzimas dependientes al GSH como son la γ -GCS, GPX1/2 y la GSTM así como la síntesis de GSH, soporta la idea de que el sistema de GSH es el principal mecanismo de protección al tejido inducido por el HGF, ahora demostrado también en páncreas.

Hay reportes donde se evidencia que debido a la activación de Nrf2 utilizando agentes como la lipoxina (BML-111), induce protección en un modelo de pancreatitis por Cn, mediante el incremento de Nrf2 y enzimas antioxidantes como HO-1, NQO1, y la actividad de SOD en pulmón (Wang Y. Z. *et al.*, 2014). Adicionalmente, otro reporte muestra que la activación de Nrf2 por flavonoides (extractos de *Coreopsis tinctoria* Nutt.), de igual manera inducen protección pancreática al disminuir las ERO y al evitar la depleción en los niveles de ATP, esto debido al incremento en la localización nuclear de Nrf2 y el consecuente incremento de HO-1 e incremento de enzimas antioxidantes como SOD y GPX (Du D. *et al.*, 2018).

Interesantemente, encontramos una disminución en el contenido de proteínas citotóxicas clave, como p38 y Bax y un incremento discreto en la proteína anti-apoptótica Mcl-1. Los efectos anti-apoptóticos del HGF fueron confirmados por la actividad de la caspasa 3, el control de la apoptosis es un factor importante en el control de la progresión y severidad de la PA así como de las complicaciones sistémicas, ya que se ha relacionado con la mortalidad y morbilidad en PA severa (Takeyama Y., 2005).

Adicionalmente, encontramos que el HGF regula la activación de rutas de sobrevivencia como Stat3, Akt y Erk1/2. Se sabe que en situaciones de daño celular se induce la activación de factores transcripción como NF- κ B, AP-1 y Stat3, los cuales en pancreatitis inducen la síntesis de mediadores pro-inflamatorios (Yubero S. *et al.*, 2009, Xu P. *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que la administración de Cn, en pocos minutos induce la activación del factor de transcripción NF- κ B, dando así la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Huang H. *et al.*, 2013). En nuestro modelo de prevención de PA al administrar HGF, encontramos que la activación de NF- κ B está incrementada en comparación con solo Cn. Posiblemente NF- κ B no está únicamente dirigiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, ya que para dicho fenómeno se requiere tanto de la activación de Akt como la de p38 (Williard D. E. *et al.*, 2010, Xu P. *et al.*, 2013), proteínas que están reprimidas en activación y en su contenido como p38, por efecto del HGF. Por otro lado, se conoce que Nrf2 y NF- κ B se regulan mediante competencia por el complejo co-activador transcripcional CBP (CREB-binding protein)-p300, esta regulación es importante para mantener el fino balance del estado redox celular y la respuesta a estrés e inflamación (Wardyn J. D. *et al.*, 2015). Adicionalmente, nuestro equipo de investigación ha caracterizado ampliamente en hígado, el efecto antioxidante que posee el factor de transcripción NF- κ B tras la estimulación con HGF, al incrementar enzimas antioxidantes como la catalasa, SOD1 y la γ -GCS (Valdes-Arzate A. *et al.*, 2009). Así como la inducción de sobrevivencia mediante el incremento en la proteína Bcl-2 ante estímulos de estrés oxidante (Luna-Lopez A. *et al.*, 2013).

Poco se ha descrito sobre la participación del factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) y su importancia en el páncreas, especialmente en su actividad antioxidante. Nosotros demostramos que el HGF induce la activación del factor de transcripción AP-1 de manera importante para contribuir a la protección celular, posiblemente para controlar el estrés oxidante o inducir proliferación, debido a que AP-1 no es una sola proteína, sino un arsenal de proteínas diméricas con una región básica de cierre de leucinas (bZIP) que pertenecen a la sub-familias de: Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K and Nrl) y ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2). Los factores de transcripción de AP-1 están involucrados en la inducción y prevención de la apoptosis, y el destino exacto del factor es tejido específico así como dependiente de la etapa de desarrollo (Shaulian E. *et al.*, 2002). Por otro lado en un modelo de PA se ha descrito que la Cn induce la activación de JNK, p38 y Erk1/2. JNK se transloca al núcleo donde fosforila a c-Jun y potencia su actividad transcripcional. Esta inducción de AP-1 está dada por citocinas pro-inflamatorias (Shaulian E. *et al.*, 2002, Samuel I. *et al.*, 2006). En otro estudio utilizando células acinares de ratón se demostró que la activación de AP-1 es importante para mantener la diferenciación celular y para inducir proliferación bajo un estímulo de CKK (Guo L. *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se ha demostrado que AP-1 induce la síntesis de proteínas antioxidantes en diferentes tipos celulares como hepatocitos y células de músculo esquelético (Camandola S. *et al.*, 1999, Zhou L. Z. *et al.*, 2001, Yang H. *et al.*, 2005).

En la señalización inducida por el HGF en páncreas, aún no se han identificado los factores transcripción de AP-1 que participan en el proceso de prevención o reparación del daño, pero está claro que la participación activa del factor propicia un efecto de protección ante la PA inducida por Cn, como se ha demostrado en el presente trabajo.

Por otro lado, la literatura reporta que la activación persistente de Stat3 en pancreatitis es responsable de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y conduce al desarrollo de fibrosis en pancreatitis crónica (Komar H. M. *et al.*, 2017). En nuestro estudio revelamos que el HGF regula la fosforilación de Stat3 inducida por la Cn, así como también disminuye su unión al ADN. La fina selección en la regulación de factores de transcripción mediada por la señalización de HGF/c-Met, proporciona el efecto de protección tan marcado en la PA.

Consistentemente, en este trabajo demostramos que el HGF revierte el daño inducido por la Cn, preservando la estructura del tejido pancreático al evitar la formación de edema y al reducir el infiltrado de células inflamatorias así como también, ayudando a mantener los niveles de amilasa y lipasa en suero a niveles basales. En correlación, se demostró que el HGF es capaz de modular el estrés oxidante inducido por la Cn al mantener proteínas antioxidantes como GPX1/2, HO-1 y Trx1 en el páncreas. Una proteína importante a nivel metabólico pero, que también posee un papel importante como enzima antioxidante es la G6PD (Ho H. Y. *et al.*, 2007), esta enzima mantiene los niveles de NADPH en el citosol para mantener el balance redox. Interesantemente, y por primera vez reportamos que la G6PD se encuentra incrementada en PA, posiblemente para tratar de

contrarrestar la explosión de las ERO generadas por la Cn. En contraste el tratamiento con HGF posterior a la Cn mantuvo a la G6PD comparable al control. Conjuntamente, el HGF mostro tener efecto incluso a nivel sistémico, como se demuestra en pulmón al evitar el incremento en las ERO inducidas por la Cn.

Para determinar el mecanismo de reversión/reparación inducido por el HGF, se midió la activación de rutas de sobrevivencia y estrés celular. Encontrando que las rutas Akt, Ekr1/2, Stat3 y p38 se encuentran activadas por efecto de la Cn y la administración de HGF no mostró efecto alguno. Sin embargo, se vio una disminución importante en dos proteínas que median la formación de prostaglandinas como son: la Cox1 y Cox2, en comparación a los ratones tratados con solo Cn.

Asimismo la administración de HGF no solo fue efectiva en el modelo de Cn, sino que también mostró efecto de protección en el modelo de PA inducida por L-Arg. El mecanismo de inducción de pancreatitis por este modelo no se tiene completamente claro sin embargo, se caracteriza por la inhibición parcial en la actividad de la L-arginasa, enzima que convierte L-Arg a L-ornitina y urea. La L-ornitina en altas concentraciones igualmente causa PA. La L-Arg también es sustrato para la óxido nítrico sintasa que induce estrés nitrosativo y estrés oxidante (Chan Y. C. *et al.*, 2007). De esta manera se comprueba una vez más, que el efecto protector del HGF aplica para un modelo no solo con estrés oxidante, sino también para estrés nitrosativo y acidosis metabólica.

Adicionalmente, se demostró que células acinares pancreáticas aisladas de ratones responden al HGF e inducen señalización mediante Ca^{2+} . La respuesta se

observó de manera heterogénea, debido a que algunas células inician una respuesta rápida (a los 100 s) al estímulo con HGF y otras células requieren mayor tiempo (hasta 1200 s). Esta diferencia en el tiempo de la señalización puede deberse a la variación entre ratones. No obstante, queda claro que el HGF despliega una respuesta a modo de pulsos. Así como también, se demuestra que la cafeína es capaz de inhibir esta señalización, lo cual sugiere que la respuesta de Ca^{2+} se da mediante receptores a IP_3 (Huang W. *et al.*, 2017). Hace falta describir el efecto del HGF ante un estímulo de daño, para averiguar si en células aisladas el HGF es capaz de proteger o mejor aún revertir el daño y conocer el mecanismo. Adicionalmente encontramos que el pre-tratamiento con HGF ayudó a mantener los niveles del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, datos suplementarios, Figura 18). Dicho canal de Cl^- se ve afectado por el estrés de retículo endoplásmico, debido a que el CFTR es de gran tamaño requiere un proceso de síntesis altamente regulado. La expresión y la actividad del CFTR en el páncreas poseen un rol de suma importancia, ya que es vital para la secreción del jugo pancreático que mantiene un pH óptimo para el transporte de las pro-enzimas hacia el duodeno, un desbalance entre la producción de enzimas digestivas y la secreción de bicarbonato conducen a la acumulación y consecuente activación de las pro-enzimas en el interior del páncreas, causando pancreatitis (Freedman S. D. *et al.*, 2001, Ooi C. Y. *et al.*, 2011).

Otros grupos de investigación han demostrado que el HGF inicia una respuesta de sobrevivencia en células acinares y ductales aisladas, al activar la ruta de Erk1/2 y

Akt (Vila M. R. *et al.*, 1995, Aparicio I.M. *et al.*, 2003). Así mismo, Aparicio I.M. en el año 2003, reportó que el HGF no induce señalización por Ca^{2+} y que no promueve la secreción de amilasa. No obstante, en este trabajo se demuestra que el HGF efectivamente estimula la movilización de Ca^{2+} intracelular pero, posiblemente debido a la naturaleza de dicha señalización no se da la secreción de enzimas, a comparación de la respuesta inducida por la CCK (datos suplementarios, Figura 19) la cual posee mayor frecuencia a una concentración fisiológica o mayor amplitud a una concentración supramáxima (Voronina S. *et al.*, 2015). La señalización de Ca^{2+} inducida por el HGF es de menor frecuencia e independiente de la concentración del HGF, debido a que es dependiente de la expresión y localización del receptor c-Met en la membrana celular. Se sabe que señalización de Ca^{2+} en las células acinares está especialmente regulada y compartamentalizada. Así como también, hay evidencia que la mitocondria desempeña un papel clave para la distribución subcelular fisiológica del Ca^{2+} y que esta tiene implicaciones metabólicas, las cuales incrementan la toma de glucosa e inducen la producción de ATP al censar incremento de Ca^{2+} dentro de la mitocondria (Petersen O. H. *et al.*, 2008). Posiblemente la señalización de Ca^{2+} inducida por el HGF contribuye a activar el metabolismo celular y acondiciona a la célula acinar para evitar la depleción de ATP y controlar el estrés oxidante que conducen a muerte celular debido a la PA.

Conclusión

Nuestros datos muestran que la ruta de HGF/c-Met induce protección y reparación tanto al páncreas como al pulmón. Así como también evitó la explosión de las ERO inducidas por la Cn en el páncreas y pulmón. El mecanismo de protección inducido por la ruta HGF/c-Met es mediante a la activación de rutas de sobrevivencia como AKT y Erk1/2 que corresponden con la activación del factor de transcripción Nrf2, así como del consecuente incremento en los niveles de glutatión y la regulación de proteínas antioxidantes como la GPX1/2, Trx1, HO-1, GSTM, γ -GCS. Además se indujo la represión de proteínas cito-tóxicas o de estrés celular como p38, Bax, caspasa 3 y de proteínas clave en la síntesis de mediadores pro-inflamatorios como Cox1 y Cox2. Sin embargo, las proteínas de protección celular se mantienen por efecto del HGF como Mcl-1.

El HGF induce señalización a calcio en células acinares y posee una fisiología diferente a la inducida por CCK.

Perspectivas

Incrementar el número de muestras de sueros de pacientes para establecer una correlación entre los niveles de HGF, de citocinas pro-inflamatorias con la gravedad de la PA.

Determinar en células acinares si el HGF tiene un efecto en apoptosis y necrosis a la exposición con CCK y otro modelo de pancreatitis ácido tauroolithocholico ácido-3-sulfato (TLCS).

Medir la producción de ATP en células acinares tratadas con HGF.

Datos suplementarios

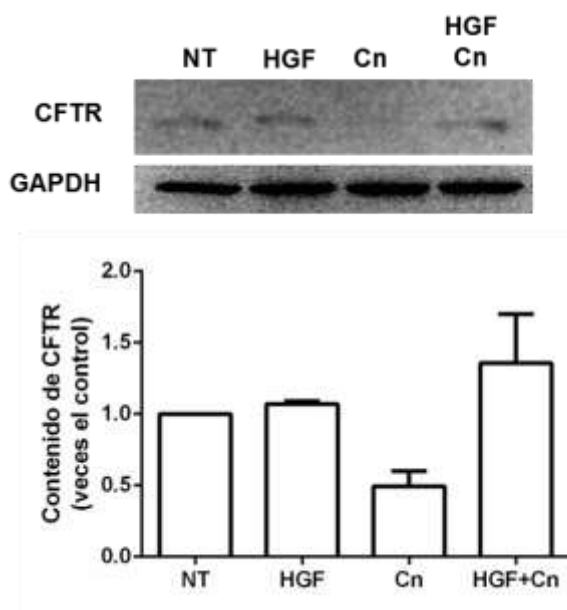


Figura 18. El HGF evita la disminución del CFTR en el páncreas por efecto de la PA. Determinación del CFTR por Western Blot y su cuantificación, las barras representan el promedio $\pm$ SEM. Imagen representativa de dos experimentos.

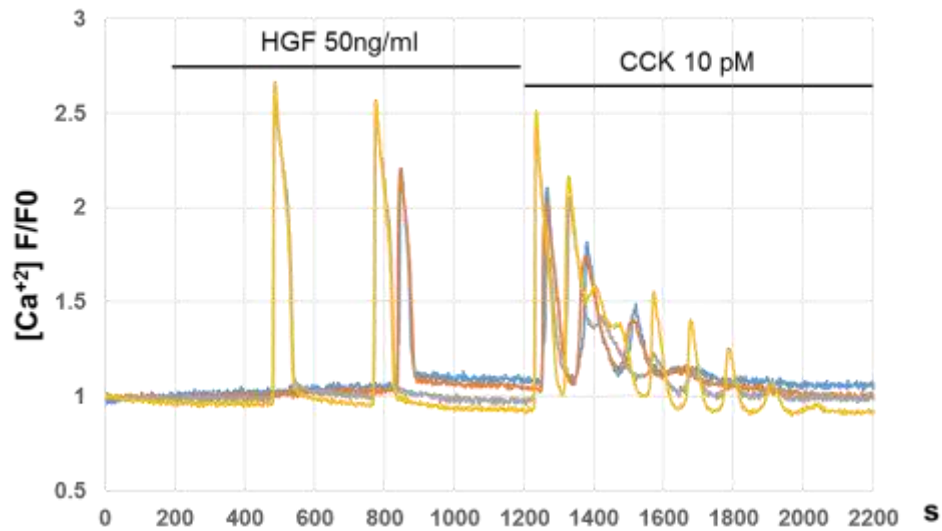


Figura 19. El HGF induce señalización por calcio que difiere de la señalización inducida por la CCK, para la producción y movilización de zimógenos en células acinares. Ejemplos de trazos de la señalización a calcio inducida por el HGF y por la estimulación con CCK (concentración fisiológica, 10pM), segundos (s). Cada línea representa la respuesta de una célula. Abajo, imagen representativa de células acinares para el registro de la movilización de calcio por microscopia confocal.

Referencias

- Aparicio I.M., Garcia-Marin L.J., Andreolotti A.G., Bodega G., Jensen R.T. and Bragado M.J. (2003). "Hepatocyte growth factor activates several transduction pathways in rat pancreatic acini." Biochim Biophys Acta **1643**: 37-46.
- Berger, Hans G, John P. Neoptolemos, Andrew L. Warshaw, Keiko Shiratori, Markus W. Büchler, David C. Whitcomb, Richard A. Kozarek, Betina M. Rau and Markus M. Lerch (2008). The Pancreas: An Integrated Text Book of Basic Science, Medicine, and Surgery. Oxford, U.K.
- Bertotti, A. and P. M. Comoglio (2003). "Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor." Trends Biochem Sci **28**(10): 527-533.
- Bolender, R. P. (1974). "Stereological analysis of the guinea pig pancreas. I. Analytical model and quantitative description of nonstimulated pancreatic exocrine cells." J Cell Biol **61**(2): 269-287.
- Bopanna, S., B. Nayak, S. Prakash, Shalimar, S. J. Mahapatra and P. K. Garg (2017). "Increased oxidative stress and deficient antioxidant levels may be involved in the pathogenesis of idiopathic recurrent acute pancreatitis." Pancreatology **17**(4): 529-533.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). "Microsomal lipid peroxidation." Methods Enzymol **52**: 302-310.
- Camandola, S., M. Aragno, J. C. Cutrin, E. Tamagno, O. Danni, E. Chiarpotto, M. Parola, G. Leonarduzzi, F. Biasi and G. Poli (1999). "Liver AP-1 activation due to carbon tetrachloride is potentiated by 1,2-dibromoethane but is inhibited by alpha-tocopherol or gadolinium chloride." Free Radic Biol Med **26**(9-10): 1108-1116.
- Clavijo-Cornejo, D., C. Enriquez-Cortina, A. Lopez-Reyes, M. Dominguez-Perez, N. Nuno, M. Dominguez-Meraz, L. Bucio, V. Souza, V. M. Factor, S. S. Thorgeirsson, M. C. Gutierrez-Ruiz and L. E. Gomez-Quiroz (2013). "Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes." Biochimie.
- Criddle, D. N. (2016). "Reactive oxygen species, Ca(2+) stores and acute pancreatitis; a step closer to therapy?" Cell Calcium **60**(3): 180-189.
- Criddle, D. N., J. V. Gerasimenko, H. K. Baumgartner, M. Jaffar, S. Voronina, R. Sutton, O. H. Petersen and O. V. Gerasimenko (2007). "Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis?" Cell Death Differ **14**(7): 1285-1294.
- Chan, Y. C. and P. S. Leung (2007). "Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research." Pancreas **34**(1): 1-14.
- Chaudiere, J. and R. Ferrari-Iliou (1999). "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms." Food Chem Toxicol **37**(9-10): 949-962.
- Chen, R., J. Li, C. H. Feng, S. K. Chen, Y. P. Liu, C. Y. Duan, H. Li, X. M. Xia, T. He, M. Wei and R. Y. Dai (2013). "c-Met function requires N-linked glycosylation modification of pro-Met." J Cell Biochem **114**(4): 816-822.
- Dai, C., C. G. Huh, S. S. Thorgeirsson and Y. Liu (2005). "Beta-cell-specific ablation of the hepatocyte growth factor receptor results in reduced islet size, impaired insulin secretion, and glucose intolerance." Am J Pathol **167**(2): 429-436.

Domschke, S., W. Domschke, W. Rosch, S. J. Konturek, W. Sprugel, P. Mitznegg, E. Wunsch and L. Demling (1977). "Inhibition by somatostatin of secretin-stimulated pancreatic secretion in man: a study with pure pancreatic juice." Scand J Gastroenterol **12**(1): 59-63.

Du, D., L. Yao, R. Zhang, N. Shi, Y. Shen, X. Yang, X. Zhang, T. Jin, T. Liu, L. Hu, Z. Xing, D. N. Criddle, Q. Xia, W. Huang and R. Sutton (2018). "Protective effects of flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. on experimental acute pancreatitis via Nrf-2/ARE-mediated antioxidant pathways." J Ethnopharmacol **224**: 261-272.

Elder, A. S., G. T. Saccone and D. L. Dixon (2012). "Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms underlying augmented secondary injury." Pancreatology **12**(1): 49-56.

Enriquez-Cortina, C., M. Almonte-Becerril, D. Clavijo-Cornejo, M. Palestino-Dominguez, O. Bello-Monroy, N. Nuno, A. Lopez, L. Bucio, V. Souza, R. Hernandez-Pando, L. Munoz, M. C. Gutierrez-Ruiz and L. E. Gomez-Quiroz (2013). "Hepatocyte Growth Factor Protects Against Isoniazid/Rifampicin-Induced Oxidative Liver Damage." Toxicol Sci.

Factor, V. M., D. Seo, T. Ishikawa, P. Kaposi-Novak, J. U. Marquardt, J. B. Andersen, E. A. Conner and S. S. Thorgeirsson (2010). "Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice." PLoS One **5**(9).

Freedman, S. D., H. F. Kern and G. A. Scheele (2001). "Pancreatic acinar cell dysfunction in CFTR(-/-) mice is associated with impairments in luminal pH and endocytosis." Gastroenterology **121**(4): 950-957.

Gaziova, I., D. Jackson, P. J. Boor, D. Carter, Z. Cruz-Monserrate, C. J. Elferink, A. D. Joshi, B. Kaphalia, C. D. Logsdon, K. Pereira de Castro, L. Soong, X. Tao, S. Qiu and L. A. Elferink (2016). "The MET Receptor Tyrosine Kinase Confers Repair of Murine Pancreatic Acinar Cells following Acute and Chronic Injury." PLoS One **11**(10): e0165485.

Githens, S. (1988). "The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture." J Pediatr Gastroenterol Nutr **7**(4): 486-506.

Gomez-Quiroz, L. E., V. M. Factor, P. Kaposi-Novak, C. Coulouarn, E. A. Conner and S. S. Thorgeirsson (2008). "Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis." J Biol Chem **283**(21): 14581-14589.

Gomez-Quiroz, L. E., D. Seo, Y. H. Lee, M. Kitade, T. Gaiser, M. Gillen, S. B. Lee, M. C. Gutierrez-Ruiz, E. A. Conner, V. M. Factor, S. S. Thorgeirsson and J. U. Marquardt (2016). "Loss of c-Met signaling sensitizes hepatocytes to lipotoxicity and induces cholestatic liver damage by aggravating oxidative stress." Toxicology **361-362**: 39-48.

Gordin, M., M. Tesio, S. Cohen, Y. Gore, F. Lantner, L. Leng, R. Bucala and I. Shachar (2010). "c-Met and its ligand hepatocyte growth factor/scatter factor regulate mature B cell survival in a pathway induced by CD74." J Immunol **185**(4): 2020-2031.

Guo, L., M. D. Sans, Y. Hou, S. A. Ernst and J. A. Williams (2012). "c-Jun/AP-1 is required for CCK-induced pancreatic acinar cell dedifferentiation and DNA synthesis in vitro." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **302**(12): G1381-1396.

Hashigasako, A., M. Machide, T. Nakamura, K. Matsumoto and T. Nakamura (2004). "Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor." J Biol Chem **279**(25): 26445-26452.

Hegyi, P. and O. H. Petersen (2013). "The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology." Rev Physiol Biochem Pharmacol **165**: 1-30.

Ho, H. Y., M. L. Cheng and D. T. Chiu (2007). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases." Redox Rep **12**(3): 109-118.

Hoffmann, K. M., J. A. Tapia, M. J. Berna, M. Thill, T. Braunschweig, S. A. Mantey, T. W. Moody and R. T. Jensen (2006). "Gastrointestinal hormones cause rapid c-Met receptor down-regulation by a novel mechanism involving clathrin-mediated endocytosis and a lysosome-dependent mechanism." J Biol Chem **281**(49): 37705-37719.

Huang, H., Y. Liu, J. Daniluk, S. Gaiser, J. Chu, H. Wang, Z. S. Li, C. D. Logsdon and B. Ji (2013). "Activation of nuclear factor-kappaB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice." Gastroenterology **144**(1): 202-210.

Huang, W., M. C. Cane, R. Mukherjee, P. Szatmary, X. Zhang, V. Elliott, Y. Ouyang, M. Chvanov, D. Latawiec, L. Wen, D. M. Booth, A. C. Haynes, O. H. Petersen, A. V. Tepikin, D. N. Criddle and R. Sutton (2017). "Caffeine protects against experimental acute pancreatitis by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated Ca²⁺ release." Gut **66**(2): 301-313.

Huh, C. G., V. M. Factor, A. Sanchez, K. Uchida, E. A. Conner and S. S. Thorgeirsson (2004). "Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4477-4482.

Ilangumaran, S., A. Villalobos-Hernandez, D. Bobbala and S. Ramanathan (2016). "The hepatocyte growth factor (HGF)-MET receptor tyrosine kinase signaling pathway: Diverse roles in modulating immune cell functions." Cytokine **82**: 125-139.

Iwatsuki, N. and O. H. Petersen (1978). "Electrical coupling and uncoupling of exocrine acinar cells." J Cell Biol **79**(2 Pt 1): 533-545.

Kermorgant, S. and P. J. Parker (2005). "c-Met signalling: spatio-temporal decisions." Cell Cycle **4**(3): 352-355.

Kim, H. (2008). "Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis." Gut Liver **2**(2): 74-80.

Komar, H. M., G. Serpa, C. Kerscher, E. Schwoegl, T. A. Mace, M. Jin, M. C. Yang, C. S. Chen, M. Bloomston, M. C. Ostrowski, P. A. Hart, D. L. Conwell and G. B. Lesinski (2017). "Inhibition of Jak/STAT signaling reduces the activation of pancreatic stellate cells in vitro and limits caerulein-induced chronic pancreatitis in vivo." Sci Rep **7**(1): 1787.

Leung, Po Sing (2010). The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas, Advances in Experimental Medicine and Biology. Hong Kong, Springer Netherlands

Li, N., Z. Dou, J. Liu, B. Chai, Y. Li, X. An, P. Chu and X. Zhang (2018). "Therapeutic Effect of HGF on NASH Mice Through HGF/c-Met and JAK2-STAT3 Signalling Pathway." Ann Hepatol **17**(3): 501-510.

Li, X. Y., X. R. Zhan, C. Lu, X. M. Liu and X. C. Wang (2010). "Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated signaling in differentiation of pancreatic ductal epithelial cells into insulin-producing cells." Biochem Biophys Res Commun **398**(3): 389-394.

Liu, M., L. Shi, X. Zou, X. Zheng, F. Zhang, X. Ding, H. Zhu and Y. Shen (2016). "Caspase inhibitor zVAD-fmk protects against acute pancreatitis-associated lung injury via inhibiting inflammation and apoptosis." Pancreatology **16**(5): 733-738.

Luna-Lopez, A., V. Y. Gonzalez-Puertos, J. Romero-Ontiveros, J. L. Ventura-Gallegos, A. Zentella, L. E. Gomez-Quiroz and M. Konigsberg (2013). "A noncanonical NF-kappaB pathway through the p50 subunit regulates Bcl-2 overexpression during an oxidative-conditioning hormesis response." Free Radic Biol Med **63**: 41-50.

Lunova, M., E. Zizer, O. Kucukoglu, C. Schwarz, W. H. Dillmann, M. Wagner and P. Strnad (2012). "Hsp72 overexpression accelerates the recovery from caerulein-induced pancreatitis." PLoS One **7**(7): e39972.

Marquardt, J. U., D. Seo, L. E. Gomez-Quiroz, K. Uchida, M. C. Gillen, M. Kitade, P. Kaposi-Novak, E. A. Conner, V. M. Factor and S. S. Thorgeirsson (2012). "Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways." Biochim Biophys Acta **1822**(6): 942-951.

Mellado-Gil, J., T. C. Rosa, C. Demirci, J. A. Gonzalez-Pertusa, S. Velazquez-Garcia, S. Ernst, S. Valle, R. C. Vasavada, A. F. Stewart, L. C. Alonso and A. Garcia-Ocana (2011). "Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes." Diabetes **60**(2): 525-536.

Menke, A., H. Yamaguchi, K. Giehl and G. Adler (1999). "Hepatocyte growth factor and fibroblast growth factor 2 are overexpressed after cerulein-induced acute pancreatitis." Pancreas **18**(1): 28-33.

Nakamura, T. and S. Mizuno (2010). "The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(6): 588-610.

Nieminen, A., M. Maksimow, P. Mentula, L. Kyhala, L. Kylanpaa, P. Puolakkainen, E. Kemppainen, H. Repo and M. Salmi (2014). "Circulating cytokines in predicting development of severe acute pancreatitis." Crit Care **18**(3): R104.

Nuno-Lambarri, N., M. Dominguez-Perez, A. Baulies-Domenech, M. J. Monte, J. J. Marin, P. Rosales-Cruz, V. Souza, R. U. Miranda, L. Bucio, E. E. Montalvo-Jave, M. Concepcion Gutierrez-Ruiz, C. Garcia-Ruiz, J. C. Fernandez-Checa and L. E. Gomez-Quiroz (2016). "Liver Cholesterol Overload Aggravates Obstructive Cholestasis by Inducing Oxidative Stress and Premature Death in Mice." Oxid Med Cell Longev **2016**: 9895176.

Ooi, C. Y., R. Dorfman, M. Cipolli, T. Gonska, C. Castellani, K. Keenan, S. D. Freedman, J. Zielenski, Y. Berthiaume, M. Corey, S. Schibli, E. Tullis and P. R. Durie (2011). "Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis." Gastroenterology **140**(1): 153-161.

Palestino-Domínguez, Mayrel , Denise Clavijo-Cornejo, María Concepción Gutiérrez-Ruiz and Luis Enrique Gómez-Quiroz (2012). "El Factor de Crecimiento de Hepatocitos y su receptor c-Met en la protección contra el daño hepático inducido por el alcohol." Revista de Educación Bioquímica **31**(4).

Palestino Domínguez, Mayrel (2014). Efecto del Factor de Crecimiento de Hepatocitos en una línea celular de páncreas. Maestría Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Peery, A. F., S. D. Crockett, A. S. Barritt, E. S. Dellon, S. Eluri, L. M. Gangarosa, E. T. Jensen, J. L. Lund, S. Pasricha, T. Runge, M. Schmidt, N. J. Shaheen and R. S. Sandler (2015). "Burden of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States." Gastroenterology **149**(7): 1731-1741 e1733.

Petersen, O. H. and A. V. Tepikin (2008). "Polarized calcium signaling in exocrine gland cells." Annu Rev Physiol **70**: 273-299.

Samuel, I., A. Zaheer and R. A. Fisher (2006). "In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production." J Gastrointest Surg **10**(10): 1376-1383.

Sánchez-Lozada, Raúl, María Isabel Camacho-Hernández, Ricardo Gerardo Vega-Chavaje, José Humberto Garza-Flores, Carlos Campos-Castillo and Rafael Gutiérrez-Vega (2005). "Pancreatitis aguda: experiencia de cinco años en el Hospital General de México." Gaceta médica de México **141**(2).

Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol **4**(5): E131-136.

Takeyama, Y. (2005). "Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis." J Gastroenterol **40**(1): 1-10.

Tenner, S., J. Baillie, J. DeWitt, S. S. Vege and Gastroenterology American College of (2013). "American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis." Am J Gastroenterol **108**(9): 1400-1415; 1416.

Ueda, T., Y. Takeyama, Y. Hori, M. Shinkai, K. Takase, M. Goshima, M. Yamamoto and Y. Kuroda (2000). "Hepatocyte growth factor increases in injured organs and functions as an organotrophic factor in rats with experimental acute pancreatitis." Pancreas **20**(1): 84-93.

Ueda, T., Y. Takeyama, A. Toyokawa, S. Kishida, M. Yamamoto and Y. Saitoh (1996). "Significant elevation of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with acute pancreatitis." Pancreas **12**(1): 76-83.

Valdes-Arzate, A., A. Luna, L. Bucio, C. Licona, D. L. Clemens, V. Souza, E. Hernandez, D. Kershenovich, M. C. Gutierrez-Ruiz and L. E. Gomez-Quiroz (2009). "Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism." Free Radic Biol Med **47**(4): 424-430.

Vila, M. R., T. Nakamura and F. X. Real (1995). "Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for normal human pancreas cells in vitro." Lab Invest **73**(3): 409-418.

Voronina, S., D. Collier, M. Chvanov, B. Middlehurst, A. J. Beckett, I. A. Prior, D. N. Criddle, M. Begg, K. Mikoshiba, R. Sutton and A. V. Tepikin (2015). "The role of Ca²⁺ influx in endocytic vacuole formation in pancreatic acinar cells." Biochem J **465**(3): 405-412.

Wang, Y. Z., Y. C. Zhang, J. S. Cheng, Q. Ni, P. W. Li, W. Han and Y. L. Zhang (2014). "Protective effects of BML-111 on cerulein-induced acute pancreatitis-

associated lung injury via activation of Nrf2/ARE signaling pathway." Inflammation **37**(4): 1120-1133.

Wardyn, J. D., A. H. Ponsford and C. M. Sanderson (2015). "Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-kappaB response pathways." Biochem Soc Trans **43**(4): 621-626.

Warzecha, Z., A. Dembinski, P. C. Konturek, P. Ceranowicz, S. J. Konturek, R. Tomaszewska, D. Schuppan, J. Stachura and T. Nakamura (2001). "Hepatocyte growth factor attenuates pancreatic damage in caerulein-induced pancreatitis in rats." Eur J Pharmacol **430**(1): 113-121.

Williard, D. E., E. Twait, Z. Yuan, A. B. Carter and I. Samuel (2010). "Nuclear factor kappa B-dependent gene transcription in cholecystokinin- and tumor necrosis factor-alpha-stimulated isolated acinar cells is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase." Am J Surg **200**(2): 283-290.

Xie, Q., M. Fei, Z. Fa, L. Wang, J. Wang, Y. Zhang, J. Wang and X. Deng (2017). "Methane-rich saline alleviates cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting inflammatory response, oxidative stress and pancreatic apoptosis in mice." Int Immunopharmacol **51**: 17-24.

Xu, P., J. Wang, Z. W. Yang, X. L. Lou and C. Chen (2013). "Regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in rats with severe acute pancreatitis." PLoS One **8**(11): e81767.

Yadav, D. and A. B. Lowenfels (2013). "The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer." Gastroenterology **144**(6): 1252-1261.

Yagci, G., H. Gul, A. Simsek, V. Buyukdogan, O. Onguru, N. Zeybek, A. Aydin, M. Balkan, O. Yildiz and D. Sen (2004). "Beneficial effects of N-acetylcysteine on sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats." J Gastroenterol **39**(3): 268-276.

Yang, H., N. Magilnick, C. Lee, D. Kalmaz, X. Ou, J. Y. Chan and S. C. Lu (2005). "Nrf1 and Nrf2 regulate rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit transcription indirectly via NF-kappaB and AP-1." Mol Cell Biol **25**(14): 5933-5946.

Yubero, S., L. Ramudo, M. A. Manso and I. De Dios (2009). "The role of redox status on chemokine expression in acute pancreatitis." Biochim Biophys Acta **1792**(2): 148-154.

Zhang, X., X. Chen, H. Song, H. Z. Chen and B. H. Rovin (2005). "Activation of the Nrf2/antioxidant response pathway increases IL-8 expression." Eur J Immunol **35**(11): 3258-3267.

Zhang, Y., M. Xia, K. Jin, S. Wang, H. Wei, C. Fan, Y. Wu, X. Li, X. Li, G. Li, Z. Zeng and W. Xiong (2018). "Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities." Mol Cancer **17**(1): 45.

Zhou, L. Z., A. P. Johnson and T. A. Rando (2001). "NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells." Free Radic Biol Med **31**(11): 1405-1416.

Zhu, A. J., J. S. Shi and X. J. Sun (2003). "Organ failure associated with severe acute pancreatitis." World J Gastroenterol **9**(11): 2570-2573.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00106

Matrícula: 2123801125

EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
HEPATOCITOS INDUCE EFECTOS
DE PROTECCIÓN Y DE REVERSIÓN
EN PANCREATITIS AGUDA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas
del día 7 del mes de septiembre del año 2018 en la Unidad
Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los
suscritos miembros del jurado:

DR. MARIO CESAR PELAEZ LUNA
DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR
DRA. MARIA DEL REFUGIO CLAVIJO CORNEJO
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de
Secretario el último, se reunieron a la presentación de la
Disertación Pública cuya denominación aparece al margen,
para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MAYREL PALESTINO DOMINGUEZ

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

Aprobar

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

MAYREL PALESTINO DOMINGUEZ
ALUMNA

REVISÓ
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. MARIO CESAR PELAEZ LUNA

VOCAL

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

VOCAL

DRA. MARIA DEL REFUGIO CLAVIJO
CORNEJO

SECRETARIO

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ