

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**



**UNIDAD IZTAPALAPA Casa abierta al tiempo**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**Posgrado en Biología Experimental**

**“REGULACIÓN DUAL DE LA NADPH OXIDASA POR EL FACTOR DE  
CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF) EN CULTIVO PRIMARIO DE  
HEPATOCITOS DE RATÓN”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA**

**Biól. Exp. Maria del Refugio Denise Clavijo Cornejo**

**Director de tesis: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

**Asesora interna: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**

**Asesor Externo: Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade**

**México, D. F., 3 de Agosto del 2011**

## **COMITÉ TUTORAL**

### **DIRECTOR**

**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**  
**Departamento de Ciencias de la Salud**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**  
**legq@xanum.uam.mx**

### **ASESORA**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**  
**Departamento de Ciencias de la Salud**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**  
**mcgr@xanum.uam.mx**

### **ASESOR**

**Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade**  
**Instituto de Fisiología Celular**  
**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**jmoran@ifc.unam.mx**

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular, en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.**

**El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 61544 y 131707)**

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

**Fondo Sectorial de Investigación SEP-CONACYT CB-2006-1-60181 y CONACYT con número de becario/CVU 233306/289773.**

## **MIEMBROS DEL JURADO**

### **PRESIDENTE**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**  
**Departamento de Ciencias de la Salud**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**  
**mcgr@xanum.uam.mx**

### **SECRETARIO**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**  
**Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental**  
**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**azentell@biomedicas.unam.mx**

### **VOCAL**

**Dr. Javier Barrios González**  
**Departamento de Biotecnología**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**  
**jbg@xanum.uam.mx**

### **VOCAL**

**Dr. José Luis Gómez Olivares**  
**Departamento de Ciencias de la Salud**  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa**  
**gool@xanum.uam.mx**

Los miembros del jurado de designado por la División de Ciencias Biológicas y de la de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo Firmantes, aprobaron la tesis titulada: “REGULACIÓN DUAL DE LA NADPH OXIDASA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO (HGF) EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EN HEPATOCITOS DE RATON”, con fecha \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del 2011.

#### JURADO DE EXAMEN

---

##### **PRESIDENTE**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**  
**Departamento de Ciencias de la Salud**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-**  
**Iztapalapa**

---

##### **SECRETARIO**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**  
**Departamento de Medicina Genómica y**  
**Toxicología Ambiental**  
**Universidad Nacional Autónoma de**  
**México**

---

##### **VOCAL**

**Dr. Javier Barrios González**  
**Departamento de Biotecnología**  
**Universidad Autónoma Metropolitana-**  
**Iztapalapa**

---

##### **VOCAL**

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

## **AGRADECIMIENTOS**

**Esta tesis representa un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas, leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.**

**Agradezco a mi director de tesis y una de las personas que más admiro por su inteligencia y conocimientos el Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz a quién le debo el hecho de que esta tesis esté terminada, gracias por su tiempo y apoyo.**

**A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz por haber confiado en mi persona, su paciencia, consejos y opiniones participaron en mi desarrollo profesional, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.**

**A la Dra. Leticia Bucio y la Dra. Verónica Souza, por su ayuda y consejos dentro del laboratorio.**

**Al Dr. Julio E. R. Morán por sus valiosas aportaciones a este trabajo.**

**Al Dr. Alejandro Zentella, Dr. Javier Barrios y Dr. José Luis Gómez por formar parte de mi jurado de examen y por sus observaciones al trabajo.**

**A mis queridos compañeros y amigos, con quien he convido dentro y fuera del laboratorio a Mayra, Natalia, Karina, Cristina, Ileana, Sandra, Nelly, Marcela, Alberto, Jorge y Armando, gracias por sus aportaciones a este trabajo y por hacer agradable el ambiente de trabajo, a Ana Laura, Aleli, Mariana, Aldo, Gerardo, Oscar, Nick y Lilia, gracias por su compañía, sus buenos consejos y por estar siempre con una palabra de aliento cuando los he necesitado**

**Dedicada a mi Familia**

**Papás:**

**Miguel Clavijo y Margarita Cornejo**

**Hermanas:**

**Aide y Anabel**

**Hermano y esposa:**

**Israel e Isabel**

**Mis queridos sobrinos:**

**Jocelyn, Miguel y Jaeneth.**

**No encuentro palabras, simplemente...**

**Los Amo, gracias por todo.**

# ÍNDICE

## RESUMEN

### 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del hígado.....	5
1.2. Tipos celulares.....	6
1.3. Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF).....	7
1.4. c-Met, receptor de HGF.....	8
1.5. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	9
1.6. El Factor Nuclear Nrf2.....	11
1.7. Propiedades generales de la NADPH oxidasa.....	12

### 2. ANTECEDENTES.....

### 3. OBJETIVO GENERAL.....

### 4. OBJETIVOS PARTICULARES.....

### 5. HIPÓTESIS.....

### 6. MATERIAL Y MÉTODOS.....

6.1. Materiales.....	17
6.2. Cultivo primario de hepatocitos de ratón.....	17
6.3. Extracción de proteínas.....	19
6.4. Análisis de proteínas por Inmunoblot.....	19
6.5. Inmunoprecipitación.....	20
6.6. Entrecruzamiento.....	21
6.7. Obtención de proteínas nuclear.....	21
6.8. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	22

6.9. Actividad de la NADPH oxidasa.....	23
6.10. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR).....	23
6.11. Análisis de la viabilidad celular.....	25
6.12. Determinación de peróxidos.....	25
6.13. Colocalización de NRF2.....	25
6.14. Cuantificación de proteínas.....	26
6.15. Análisis estadístico.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1. HGF regula la actividad de NADPH oxidasa.....	27
7.2. Efecto del HGF sobre ERO.....	29
7.3. Las ERO producidas participan en la activación de Nrf2.....	31
7.4. Efecto del HGF sobre los genes blanco de Nrf2.....	33
7.5. Efecto protector del HGF en los hepatocitos de ratón.....	35
7.6. Represión transcripcional de de las subunidades de la NADPH oxidasa..	37
7.7. HGF induce una disminución en el contenido proteico de las subunidades de la NADPH oxidasa.....	39
7.8. Efecto protector del HGF ante una agresión con TGF- $\beta$ .....	41
7.9. Regulación de la NADPH oxidasa por medio de la interacción de p22 con c-Met.....	43
7.10. La interacción de entre p22 y c-Met se da de manera extracelular.....	45
8. DISCUSIÓN.....	47
9. CONCLUSIONES.....	56
10. REFERENCIAS.....	59

## RESUMEN

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-Met protegen contra el daño celular provocado por el estrés oxidante mediante la inducción de proteínas antiapoptóticas y antioxidantes. Nrf2 es un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de genes antioxidantes en el hígado, sin embargo, ahora se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ERO) a niveles basales son necesarias para la activación de vías de señalización. Datos previos de nuestro grupo de investigación revelan que los hepatocitos de ratón con eliminación condicional de c-Met muestran un incremento en la activación de la NADPH oxidasa y la sobreexpresión de algunos de sus subunidades como Nox4, Nox2, p22 y p67. El objetivo de este trabajo fue identificar el mecanismo de regulación de la NADPH oxidasa ejercida por el HGF/c-Met y la inducción de la activación de Nrf2 por un mecanismo dependiente de este complejo enzimático. Los cultivos primarios de hepatocitos se aislaron usando el método de perfusión en dos pasos con colagenasa, se usaron ratones macho de la cepa CD1, las células se pre-trataron o no con 50 ng/ml de HGF. Los datos obtenidos muestran que HGF indujo un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa y en la producción de ERO en tiempos tempranos (1-30 min) pero una disminución en tiempos más largos incluso por debajo de los niveles normales con respecto a las células no tratadas. El incremento temprano en el contenido de las ERO se relacionó con la activación de Nrf2 la cual fue analizada por medio de un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) y por microscopia confocal. Para verificar la activación de Nrf2 llevada a cabo por el HGF, se analizó la expresión de sus principales proteínas blanco SOD,  $\gamma$ -GCS y NQO1, donde se encontró que

estas enzimas se incrementaron 2, 2.8 y 3 veces respectivamente con respecto a las células no tratadas. Para confirmar que el HGF tenía un efecto protector en los hepatocitos, se evaluó la viabilidad celular por medio de un estudio de tinción celular con cristal violeta. Debido a que HGF induce la disminución en la actividad de la NADPH oxidasa en tiempos más largos, decidimos caracterizar la expresión de ARNm y de la proteína de sus subunidades por medio de qRT-PCR e Inmunoblot respectivamente, los datos muestran que HGF induce una desregulación en Nox2, Nox4, p47 y p22. Finalmente, decidimos explorar la posibilidad de que c-Met estuviera interactuando con la NADPH oxidasa por medio de una de sus subunidades ancladas a la membrana esto se analizó con una inmunoprecipitación, los datos muestran una interacción entre c-Met y p22 la cual disminuye después de 30 min de tratamiento con HGF, este dato fue comprobado por un ensayo de entrecruzamiento. En conclusión nuestros datos muestran que HGF ejerce una regulación dual sobre la NADPH oxidasa, activándola en tiempos cortos como respuesta de sobrevivencia mediada por Nrf2 y disminuye su expresión en tiempos más largos quizá para evitar el uso de ésta oxidasa por citocinas citotóxicas.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Generalidades del hígado

El hígado se localiza en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal y se divide en cuatro lóbulos anatómicos, muestra una estructura histológica sencilla, presenta parénquima con espacios porta, venas o vénulas centrolobulillares, eferentes o terminales y algunas venas de mayor calibre. El parénquima se ha dividido en varias partes según el concepto del lobulillo clásico, porción periférica, zonal media y centrolobulillar o el ácino de Rappaport (zona 1, 2 y 3 respectivamente). La designación más simple es la de zona periportal para la que rodea el espacio porta y zona perivenular la que se encuentra en la vecindad de la vena centrolobulillar o eferente. La distancia que hay entre los espacios porta y la vena eferente es semejante en cada lobulillo o ácino. Los espacios porta son zonas con colágena de tipo I en las que se encuentran conductos biliares y ramas de la arteria hepática y la vena porta, otras estructuras que pueden observarse son vasos linfáticos y nerviosos, en la colágena hay escasos linfocitos. En un estudio morfométrico efectuado por Crawford y col. en biopsias hepáticas percutáneas normales se observó que la proporción que hay entre el número de espacios porta y venas terminales es de 3 a 1. Estos autores señalaron que el número de triadas portales (espacios porta que contienen vena, arteria y conducto biliar) por biopsia es un poco mayor que el número de díadas portales, por lo que estos autores concluyeron que la estructura del hígado no es uniforme y que su variabilidad es mayor en la porción periférica (Crawford et al., 1998). A nivel fisiológico el hígado tiene varias funciones como centro de defensa ya que está

involucrado en la biotransformación de xenobióticos, lleva a cabo la captura y degradación de bacterias, virus, parásitos, partículas entre otras, además está involucrado en el metabolismo de carbohidratos, participa en el metabolismo de lípidos teniendo como funciones principales la captación, oxidación y transformación de los ácidos grasos, la síntesis de lipoproteínas del plasma, la transformación de lipoproteínas, la catabolización de LDL, VDL, entre otras. (Kuntz E, 2006).

## 1.2. Tipos celulares

El 20% de los tipos celulares en el hígado está compuesto por células no parenquimatosas, que incluyen a las células endoteliales, las células de Kupffer linfocitos y células estelares. Las células endoteliales se encuentran en el sinusoides hepático, lo cual provee un área grande para la absorción de nutrientes. El 80% de la población celular hepática está conformada por los hepatocitos quienes presentan forma poliédrica, con tamaño aproximado de 30  $\mu\text{m}$  de largo y 20  $\mu\text{m}$  de ancho entre sus funciones se encuentra la de producir glucosa por medio de la gluconeogénesis, además de liberar glucosa a través de la glucogenólisis. Los hepatocitos son las únicas células que inactivan al amoníaco tóxico por medio del ciclo de la urea. Llevan a cabo la síntesis de una amplia variedad de proteínas del suero además tienen un papel en el metabolismo de lípidos tanto endógeno como exógeno a través de la síntesis de lipoproteínas y el catabolismo de las proteínas enriquecidas con colesterol derivado de la sangre, están bien equipadas para la defensa contra el estrés oxidante y son responsables

de la desintoxicación de numerosas sustancias tanto exógenas como endógenas (Kuntz E, 2006).

Las funciones hepáticas son coordinadas por una red de moléculas de señalización compuesta principalmente por citocinas, factores de transcripción, radicales libres, entre otras, de particular importancia es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que se ha demostrado impacta en prácticamente todas las funciones del hígado.

### 1.3. Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)

En los hepatocitos el HGF fue identificado originalmente como un potente mitógeno, es una proteína dimérica de 84 kDa de peso molecular, está compuesto por una subunidad  $\alpha$  de 69 kDa y una subunidad  $\beta$  de 34 kDa, unida por un puente disulfuro, es producido en las células del estroma (Nakamura et al., 1984). Este factor de crecimiento es sintetizado como pro-HGF de 728 amino ácidos y después madura en HGF por medio de una escisión proteolítica. El HGF humano fue clonado también por Miyazawa (Miyazawa et al., 1989). En etapas fetales, la neutralización del HGF o el silenciamiento de c-Met lleva a hipoplasia de varios órganos lo que indica que la señalización mediada por este factor de crecimiento es esencial en el desarrollo de los órganos. El HGF es requerido para la reparación en el daño del hígado (Fausto et al., 2006), riñones (Mizuno et al., 2008), pulmón (Yanagita et al., 1992) entre otros, además de tener efectos protectores en órganos epiteliales y no epiteliales como el corazón y el cerebro mediado por vías de señalización anti-apoptóticas y anti-inflamatorias (Nakamura et al., 2000).

Es importante resaltar la función que tiene como modulador del sistema del glutatión (GSH), el cual es un determinante fundamental del estado redox celular (Gomez-Quiroz et al., 2008; Trusolino et al., 2010.). Existen evidencias que confirman el papel protector del HGF contra el daño celular causado por el estrés oxidante (Arends et al., 2008; Kaposi-Novak et al., 2006; Takami et al., 2007; Valdes-Arzate et al., 2009) cuyo mecanismo está principalmente mediado por la inducción de la síntesis de GSH y por la expresión de proteínas antioxidantes y antiapoptóticas como Bcl-2, la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y Mcl-1. Esto es evidencia de que la señalización de c-Met es un factor crítico en la protección contra la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Gomez-Quiroz et al., 2008).

#### 1.4 c-Met, receptor de HGF

El HGF actúa a través de su receptor anclado a la membrana llamado c-Met que es un receptor tirosina cinasa. Se ha demostrado que Met es procesado en las células epiteliales por medio de una proteólisis intermembranal dependiente de presenilina, lo cual es independiente de la estimulación del ligando. El proceso proteolítico involucra escisiones secuenciales por metaloproteasas lo que permite la generación de fragmentos lábiles (Foveau et al., 2009). Met es sintetizado de una cadena precursora simple que es glicosilada post-traduccionalmente seguida por una escisión endoproteolítica para producir la forma madura heterodimérica. El Met maduro es una proteína transmembranal compuesta por una subunidad extracelular  $\alpha$  de 45-kDa que está unida por medio de puente disulfuro a una

subunidad compuesta por dominios extracelulares e intracelulares que contienen el dominio catalítico (Giordano et al., 1989). Una vez que se une el ligando se lleva a cabo una dimerización de Met, y varias tirosinas son fosforiladas en la región intracelular de la subunidad  $\beta$ . Dentro del dominio de la tirosina cinasa, dos de las tirosinas son los principales sitios de autofosforilación y la mutación de estos residuos abaten su actividad biológica (Longati et al., 1994). Fuera del dominio de la cinasa, dos sitios de autofosforilación en la región C-terminal son responsables del reclutamiento de varias proteínas involucradas en la iniciación de la señalización intracelular (Ponzetto et al., 1994).

El HGF/c-Met tienen varias funciones en varios tipos celulares, que dirigen una vía de señalización pleiotrópica que controla una amplia gama de respuestas celulares, tales como la proliferación, la sobrevivencia, la diferenciación, la angiogénesis, la movilidad e invasión celular, además de impactar en procesos del metabolismo energético, entre muchos otros. (Matsumoto and Nakamura, 2001).

Uno de los principales aportes de nuestro grupo en términos de la caracterización de la biología del HGF es el papel que éste tiene en el control del estado redox celular y el estrés oxidante causado por el exceso en las especies reactivas de oxígeno (ERO).

### 1.5 Especies Reactivas de Oxígeno

Si bien se había considerado a las ERO como entidades generadas como productos secundarios del metabolismo y que su efecto era solo tóxico, ahora se reconoce que tienen una importancia de primer nivel en la conducción de señales

relacionadas con varios procesos fisiológicos de la célula (Bokoch and Knaus, 2003), como son la defensa antioxidante, apoptosis o proliferación. Pero se ha postulado que el tiempo de generación, su concentración y su localización lo que marca el límite entre moléculas de señalización vital y molécula tóxica.

Entre las principales ERO encontramos al superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el cual es producido fisiológicamente por medio de la reducción de un electrón en el oxígeno molecular.

El  $O_2^{\cdot-}$  es altamente reactivo y de vida muy corta, lo cual lo hace difícil de determinar debido a su vida media, se puede dismutar para dar origen a un segundo mensajero intermediario en la señalización, llamado peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), esta reacción se puede dar espontáneamente o por una reacción enzimática dirigida por la superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1983).

El  $O_2^{\cdot-}$  también es capaz de reaccionar con el óxido nítrico (ON), formando así el peroxinitrito ( $OONO^-$ ) que es altamente reactivo y por lo tanto potencialmente dañino (Mata-Greenwood et al., 2006).

Entre los blancos principales en la señalización mediada por ERO se encuentran la activación de rutas como la del factor nuclear kapa B, ( $NF-\kappa B$ ), la ruta de la cinasa de Jun (JNK), o de la proteína activadora 1 (AP1), sin embargo, recientemente ha tomado particular relevancia el factor nuclear relacionado a eritroides 2 (Nrf2), presentándose como el prototipo de factor de transcripción que requiere obligadamente de un estado oxidante para su activación.

## 1.6. El Factor Nuclear Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción que regula positivamente la expresión de un amplio rango de genes antioxidantes, citoprotectores, de fase de detoxificación II y III, particularmente en el hígado (Klaassen et al., 2010). En condiciones basales, Nrf2 se encuentra en el citoplasma formando un complejo inactivo con su inhibidor Keap1 (de su nombre en inglés, actin binding protein kelch-like ECH associating protein 1) que es una proteína adaptadora de la ligasa E3 Cullin 3 la cual media la degradación por medio del proteosoma 26S de Nrf2 (Kobayashi et al., 2004).

La activación de Nrf2 sigue de manera general, el siguiente mecanismo; tras un estímulo mediado por ERO, las cisteínas específicas en Keap1 son oxidadas o alquiladas generando una desestabilización entre la unión de Keap1 y Nrf2, que puede generar dos alternativas, la primera es que la desestabilización genere la liberación parcial de Nrf2 de su inhibidor lo cual evita que siga siendo degradado, y al mantener bloqueado a Keap1 permite que el Nrf2 sintetizado *de novo* pueda irse al núcleo e iniciar la expresión de sus genes blancos. La otra alternativa es que la liberación de Nrf2 de Keap1 es total, provocando que el Nrf2 que estaba secuestrado en el citosol se transporte al núcleo para iniciar la expresión génica (Maher et al., 2010; Schwabe et al., 2006).

Se ha reportado que la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa es una de las principales generadores de ERO quienes permiten la oxidación de las cisteínas en Keap1 en varios modelos (Kobayashi et al., 2004), sin embargo, otras fuentes como la mitocondria o el metabolismo de xenobióticos pueden ser capaces de inducir la activación de Nrf2.

### 1.7. Propiedades generales de la NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa es una enzima multiproteica que se encuentra unida a las membranas, donde cataliza la reducción de oxígeno en anión superóxido como donador de electrones, este complejo fue descrito por primera vez en células fagocíticas como productor importante de ERO para matar a las bacterias, ahora es bien conocido que están presentes en muchos tipos celulares incluyendo las células hepáticas (Opitz et al., 2007). Aún no está completamente clara su función en las células no fagocíticas, pero la evidencia muestra que la actividad de la enzima está relacionada con eventos de transducción de señales (Bokoch and Knaus, 2003; Brown and Griendling, 2009). Pero la sobre-expresión o sobre-activación conllevan al desarrollo de estrés oxidante, tal y como se ha reportado en el hígado (Gomez-Quiroz et al., 2008) en el sistema cardiovascular (San Jose et al., 2004), el pulmón (Griffith et al., 2009) y el páncreas (Yu et al., 2005), entre otros. La sobre-activación de la NADPH oxidasa está relacionada con la fibrosis hepática (De Minicis et al.), daño al hígado inducido por la infección de la hepatitis C (Boudreau et al., 2009; de Mochel et al., 2010) y desarrollo de cáncer (Kamata, 2009).

La NADPH oxidasa está compuesta por varios homólogos catalíticos unidos a la membrana, tales como; Nox1, 2, 3, 4 y 5, DUOX1 y 2 (Leto et al., 2009), muchos de los cuales son regulados por otros componentes del sistema que en condiciones basales están localizados en el citoplasma como p67, p47, p40, Noxo1, Rac 1 y 2, entre otras, la excepción es p22 el cual reside en la membrana y se cree que también participa en el plegamiento de las NOX o está participando en el transporte de electrones. La importancia de que p22 es una subunidad

esencial para la actividad de la NADPH oxidasa quedó evidenciada por Ushio-Fukai (1996) quien reportó que la inhibición de la expresión de p22 abrogaba la producción del anión superóxido producido por la NADPH oxidasa cuando existe un estímulo con angiotensina II (Matsumoto and Nakamura, 2001; Ushio-Fukai, 2006; Ushio-Fukai et al., 1996).

En el hígado sano, los hepatocitos producen pequeñas cantidades de ERO además de que el sistema antioxidante como la superóxido dismutasa y la catalasa remueven eficientemente el exceso de ERO, para así mantener la homeostasis de las células (Brown and Griendling, 2009). En las enfermedades crónicas del hígado como el abuso del alcohol, infección del virus de la hepatitis C, se ha observado un incremento de la producción de las ERO así como una disminución en los sistemas antioxidantes lo que resulta en un estrés oxidante (Boudreau et al., 2009; Valdes-Arzate et al., 2009). Se ha reportado (De Minicis et al., 2006) en la literatura y confirmado en la presente tesis de maestría que las Nox presentes en el hepatocito son Nox2, Nox1, Nox3 y Nox4, mientras que no se detectó Nox 5 en los hepatocitos de ratón en cultivo primario. También se ha reportado la presencia de los homólogos Duox 1 y 2 no obstante aún no se ha establecido por completo su participación en este tipo celular (Reinehr et al., 2005). Los homólogos de las Nox presentan características que las difieren entre sí. La Nox2 fue la primera identificada como fuente de superóxido y está expresada predominantemente en células fagocíticas, la NADPH oxidasa está compuesta por dos componentes esenciales unidos a la membrana llamados gp91phox (Nox2) y p22phox, las cuales componen al flavocitocromo b558 y por cuatro componentes citosólicos, p47phox, p67phox, p40phox y la proteína G

pequeña Rac1/2. Después del estímulo, las cuatro proteínas citosólicas se translocan a la membrana e interactúan con el citocromo b558 y así este complejo enzimático queda activo y produce superóxido extracelularmente (Ago et al., 2003). La Nox1 fue descrita casi 25 años después que la Nox2, es activada al formar un complejo con los activadores citosólicos de manera similar a Nox2 ya que puede interactuar con p47phox, p67phox y Rac pero su activación es más elevada si interactúa con NoxO1 y NoxA1 que son homólogos de p47phox y p67phox (Cheng et al., 2006). Nox3 es similar a Nox1 y Nox2, necesita de p47phox, NoxO1 y NoxA1 para su activación (Banfi et al., 2004), además de p22phox y Rac para producir el radical superóxido. La Nox4 es un miembro enigmático de la familia de las Nox fue descrita en el año 2000, a diferencia de las otras Nox este homólogo no necesita de las subunidades citosólicas para ser activada (Geiszt et al., 2000), sin embargo, la producción de ERO por la Nox4 si requiere de la proteína p22phox. Se ha reportado también que Nox4 al parecer no requiere de Rac1 y está activada de manera constitutiva (Martyn et al., 2006). El tipo de ERO liberada por Nox4 es  $H_2O_2$  mientras que el  $O_2^{\cdot -}$  es casi indetectable (Serrander et al., 2007). Con respecto a las Duox 1 y 2 tienen una masa molecular mayor en comparación con Nox2 y tienen un dominio N-terminal de peroxidasa en adición con la actividad C-terminal de la NADPH oxidasa, (Reinehr et al., 2005).

## **2. ANTECEDENTES**

Además del control del estrés oxidante, nuestro grupo de trabajo previamente ha reportado que HGF/c-Met también puede regular el estado redox celular. Los ratones knock out para c-Met (c-MetKO) en el hígado muestran una desregulación profunda en los genes involucrados en la respuesta antioxidante y el metabolismo de GSH (Kaposi-Novak et al., 2006), también reportamos que los hepatocitos c-MetKO presentan estrés oxidante debido a una sobre activación de NADPH oxidasa (Gomez-Quiroz et al., 2008) y más aún esta condición del estrés oxidante favorece la carcinogénesis hepática inducida químicamente por la N-nitrosodietilamina (Takami et al., 2007). Se ha reportado que el incremento en la producción de las ERO puede someter a la célula a un estrés oxidante, que puede incrementar la sensibilidad de los hepatocitos a la apoptosis inducida por agonistas de Fas (Tripathi and Hildeman, 2004).

Los datos que nuestro grupo ha obtenido previamente sugieren que el HGF y c-Met regulan a la NADPH oxidasa, por lo que en el presente trabajo nos enfocamos al estudio y caracterización de este sistema por el HGF/c-Met y su relevancia en la supervivencia celular.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el mecanismo de regulación de la NADPH oxidasa por factor de crecimiento de hepatocitos y c-Met en hepatocito de ratón en cultivo primario y su relevancia en la supervivencia celular ante estímulos citotóxicos.

### **4. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Determinar el efecto del HGF sobre la actividad de la NADPH oxidasa y su repercusión en la supervivencia celular
- Caracterizar la activación de Nrf2 inducida por el HGF y mediada por la NADPH oxidasa.
- Evaluar el efecto del HGF a nivel transcripcional y post-transcripcional sobre las diferentes subunidades de la NADPH oxidasa.
- Determinar la interacción entre la subunidad p22 de la NADPH oxidasa y el receptor c-Met.

### **5. HIPÓTESIS**

El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met regularán a la NADPH oxidasa de manera dual, induciendo tempranamente una respuesta de supervivencia que permite la activación del factor de transcripción Nrf2 y posteriormente una desregulación transcripcional de la oxidasa que mantendrá la respuesta de supervivencia.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Materiales

Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich excepto cuando se indique lo contrario. El diacetato de 6-Carboxy-2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR). El factor de crecimiento de hepatocitos recombinante humano (HGF) fue obtenido de PeproTech (Rocky Hill, NJ).

### 6.2. Cultivo primario de hepatocitos de ratón

Los ratones de la cepa CD1, se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos y bajo cuidados especificados en el manual de procedimientos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y la guía para cuidados y uso de animales de laboratorio establecido por el NIH (Bethesda, USA)

Para la obtención de hepatocitos de ratón se usó la técnica de perfusión con colagenasa en dos pasos. Se usaron ratones macho de 8 a 12 semanas de edad. Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con 0.7 ml de tribromoetanol (Avertina). La superficie abdominal se limpió con etanol al 70% y se realizó una incisión en el abdomen y tórax para dejar expuesto el hígado y corazón. La vena cava inferior se anudó con hilo de sutura para evitar el paso de las soluciones utilizadas hacia los riñones; por la aurícula derecha del corazón se introdujo un catéter Abbocath 22G que estaba acoplado a un equipo de perfusión y se cortó la vena porta para abrir la circulación. Como primer paso, el hígado se perfundió con aproximadamente 30 ml de amortiguador HBSS (Solución Salina Balanceada de

Hanks) que se encuentra libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , y además contiene HEPES 10 mM, pH 7.4, EGTA 75 mM a una temperatura de 37 °C. En el segundo paso de la perfusión se utilizó 50 ml de colagenasa tipo I al 0.05% en medio Williams con  $\text{NaHCO}_3$  25 mM y amortiguado con HEPES 10 mM, pH 7.4 a una temperatura de 37 °C. Después el hígado se removi6 y se coloc6 en una caja de Petri 10 cm de diámetro con 50 ml de medio Williams frío suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, antibiótico y antimic6tico (medio de adhesi6n). El hígado se disgreg6 utilizando 2 pipetas estériles de 1 ml y se obtuvo una soluci6n con células hepáticas dispersas que se pasaron por un filtro con poros de 100  $\mu\text{m}$  de tamaño. La soluci6n filtrada se centrifug6 a 45 g durante 5 min a 4 °C. Se elimin6 el sobrenadante y el bot6n celular se resuspendi6 en 25 ml de medio de adhesi6n frío para posteriormente mezclarse suavemente con una soluci6n de Percoll con soluci6n Hanks 10X, se centrifug6 a 170 g durante 15 min a 4 °C para obtener un pellet compuesto de hepatocitos viables. Se elimin6 el sobrenadante y las células se resuspendieron en 20 ml de medio de adhesi6n frío. Para determinar la viabilidad se realiz6 un conteo con azul de tripano en un contador automático Vi-Cell (Beckman Coulter). La viabilidad celular siempre fue superior al 95%. Las células viables se sembraron a una densidad de 254,000 células/ $\text{cm}^2$  y se mantuvieron en incubaci6n por 4 h a 37 °C en una atm6sfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Posteriormente se cambi6 el medio a uno sin suero y se dej6 el cultivo toda la noche, al día siguiente se cambi6 el medio por uno fresco y se procedi6 a los tratamientos con 50 ng/ml de HGF a diferentes tiempos. Los inhibidores (apocinina y queleritrina) se adicionaron 30 min previo al tratamiento con HGF a las

concentraciones que se indican en la sección de resultados (Gomez-Quiroz et al., 2008; Papeleu et al., 2006).

### 6.3. Extracción de proteínas.

Posterior al tiempo del tratamiento, las células se lavaron con PBS frío y se agregaron 200 µl de una solución de lisis M-PER (Pierce) que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche), las células se despegaron usando un gendarme de goma, la suspensión celular se centrifugó a 17000 g durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se guardó a -20 °C en alícuotas hasta ser usadas (Gomez-Quiroz et al., 2008).

### 6.4. Análisis de proteínas por Inmunoblot

70 µg de proteína se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS al 0.1%, usando un voltaje de 120 V durante 90 min. Posteriormente la proteína se transfirió a una membrana de PVDF durante 90 min a 120 V. La membrana fue boqueada con leche descremada al 5% en TBS-Tween durante 1 hora en agitación constante. Para la detección de la proteína, la membrana se incubó con anticuerpos específicos (cuadro 1) durante toda la noche en agitación constante a 4 °C. Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con TBS-Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido en una solución de albúmina en TBS-Tween por 90 min. Después se lavó 2 veces por 10 min con TBS-Tween y 1 vez por 5 min con TBS. Se reveló con 1ml de sustrato luminiscente (SuperSignal® West Pico

Substrate, Pierce), las bandas se cuantificaron por densitometría usando el fotodocumentador Gel logic 1500 (Kodak) (Gomez-Quiroz et al., 2008).

<b>Cuadro 1</b> Anticuerpos empleados en Inmunoblot e Inmunoprecipitación				
	<b>Anticuerpo</b>	<b>Masa molecular kDa</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Marca</b>
1	Gp91 phox (Nox2)	91	Cabra	Santa Cruz, sc-5827
2	NOX 4	70	Cabra	Santa Cruz, sc-21860
3	p67	67	Cabra	Santa Cruz, sc-7663
4	p22	22	Conejo	Santa Cruz, sc-20781
5	p47	47	Conejo	Santa Cruz, sc-14015
6	Met	145	Rata	Santa Cruz, sc-74225
7	Actina	43	Conejo	Santa Cruz, sc-13065
8	NQO1	31	Conejo	Santa Cruz, sc-25591
9	g-GCS	73	Conejo	Santa Cruz, sc-22755
10	Nrf2	56	Conejo	Santa Cruz, sc-13032

### 6.5. Inmunoprecipitación

Se sembraron las células en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, se pre trataron o no con 50 ng/ml HGF por 30 min. Se aisló y cuantificó la proteína total como se describe en la sección de análisis de proteína por Inmunoblot. Un contenido de 5 mg de proteína se incubaron con 20 µl de solución denominada “preclearing matrix A-rabbit” (Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora en rotación a 4 °C. Se centrifugó a 800 g durante 5 min y se tomó el sobrenadante, el cual se incubó toda la noche en rotación constante con el anticuerpo indicado (p22 o c-Met) en una dilución de 1:100; Posteriormente el tiempo se le agregó 20 µl de Protein A/G PLUS (Santa

Cruz Biotechnology) y se dejó en rotación por 1 hora a 4 °C. Luego se colectó el inmunocomplejo por centrifugación a 800 g por 5 min y se hicieron 3 lavados con buffer de lisis. Finalmente el botón se resuspendió en 20 µl de buffer de carga 2X. Las muestras se analizaron por Inmunoblot.

#### 6.6. Entrecruzamiento

Las células se trataron o no con 50 ng/ml de HGF por 30 min, posteriormente se lavaron las células con PBS para remover el medio. Se agregó el agente de entrecruzamiento homobifuncional N-hydroxysuccimide ester (NHS-ester, DSP) disuelto en dimethyl sulfoxide (DMSO) recién preparado para una concentración final de 1 mM en 1 ml de PBS. El agente de entrecruzamiento 3,3'-dithiobis [sulfosuccinimidylpropionate] (DTSSP) se utilizó en una concentración 10 mM. Las células se incubaron por 30 min en movimiento rotatorio. Después del entrecruzamiento se agregó una solución de detención de la reacción compuesta por Tris 15 mM a pH 7.5 y se incubó por 15 min. Las células se lavaron dos veces con PBS y finalmente se extrajo y cuantificó la proteína para hacer una inmunoprecipitación y un Inmunoblot, siguiendo el procedimiento antes descrito (Wang et al., 2002).

#### 6.7. Obtención de proteína nuclear

Se sembraron las células en cajas Petri de 10 cm de diámetro con medio Williams completo, se dejó estabilizar el cultivo por 24 h. Después de este tiempo se lavaron las células en PBS y se aplicaron los tratamientos después se retiró el medio, se lavaron las células con PBS y se despegaron con un gendarme de

goma. Se recuperó la suspensión celular y se centrifugó por 1 min a 3000 g, las células precipitadas se incubaron por 15 min en hielo con 800  $\mu$ l de solución A que contenía: HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 7.9. Pasado este tiempo a la suspensión se le agregaron 50  $\mu$ l de una solución de Igepal al 10% en solución A. Se agitó vigorosamente por 15 seg y se centrifugó a 13000 g por 30 seg a 4 °C. El precipitado obtenido (núcleos) se incubó por 15 min en hielo con 50  $\mu$ l de solución C que contenía: HEPES 20 mM, NaCl 0.4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7.9. Durante este tiempo se agitó vigorosamente cada 3 min. Terminado el tiempo de incubación, la suspensión se centrifugó a 13000g durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l para la determinación del contenido de proteína el resto se mantuvo a -80 °C para los ensayos de movilidad electroforética o retardo (EMSA) (Gomez-Quiroz et al., 2008).

#### 6.8. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).

Se adicionó en un microtubo 5  $\mu$ l de una solución de incubación que contenía: 50mM Tris- HCL pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 20% de glicerol, posteriormente se adicionó 1  $\mu$ g de poli (dI.dC) y de 5-30  $\mu$ g de la proteína nuclear. Se incubó hielo por 25 min. Al término de la incubación se agregaron 2  $\mu$ l de la sonda correspondiente marcada con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3000 Ci/mmol; MP Biomedical, Irvine CA, USA). Se utilizaron oligonucleótidos con secuencia consenso para Nrf2 5'-TTTTCTGCTGACTCAAGGTCCG--3'. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min, finalmente se le adicionó 2  $\mu$ l de

azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se cargaron en un gel nativo de poliacrilamida al 6%, el cual se preparó de la siguiente forma: se mezclaron 4 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1), 1 ml de una solución de TBE 5X, 5 ml de agua desionizada, 200 µl de persulfato de amonio al 10% y 10 µl de TEMED. Se corrió el gel a 150 V durante 2 h. El gel se colocó en un casete para su autorradiografía y se dejó a -80°C por 1 día (Gomez-Quiroz et al., 2008).

#### 6.9. Actividad de la NADPH oxidasa

Las células se trataron o no con HGF a diferentes tiempos, posteriormente se lavaron y se resuspendieron en 350 µl de PBS frío. La suspensión de celular se dividió en tres partes, 150 µl se incubó con 250 µM de NADPH. El consumo de NADPH se registró midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm por 5 min con lecturas cada min. La actividad específica de la oxidasa se midió por el registro del rango del consumo de la NADPH oxidasa inhibida por la adición de 10 mM de DPI por 30 min antes del análisis. Una alícuota de 50 µl se lisó para determinar la concentración de proteína total. Los resultados se expresaron como pmol de NADPH oxidada/min por miligramo de proteína (Gomez-Quiroz et al., 2008) .

#### 6.10. Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

El ARN total se extrajo de las células tratadas o no con HGF, usando el reactivo de Qiazol (Qiagen). El ARN aislado fue tratado con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase) para evitar la contaminación con ADN genómico. La amplificación de RT-

PCR de un solo paso se llevó a cabo con el PCR cycler Rotor-Gene Q system (Qiagen, Australia). El RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) en tiempo real se llevó a cabo usando Rotor-Gene SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) con 300 nM de oligonucleótidos sentido y antisentido y 250 ng/μl de ARN para un volumen final de 10 μl por reacción. Las condiciones del qRT-PCR fueron las siguientes: 10 min a 55°C y 5 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de PCR por 5 seg a 95°C para la desnaturalización, 10 segundo a 60°C para la alineación y extensión. Los resultados fueron expresados en relación con la actina usada gen de referencia. La cuantificación relativa fue realizada usando el software REST-08 (Relative Expression Software Tool 2008). Después de 40 ciclos de amplificación se hizo un análisis de la curva llevado a cabo para verificar el producto correcto por su temperatura específica (Tm). Los oligonucleótidos usados se muestran en el cuadro 2.

<b>Cuadro 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en el qRT-PCR</b>		
<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia sentido</b>	<b>Secuencia Antisentido</b>
NOX2	5 -GACCATTGCAAGTGAACACCC-3	5-AAATGAAGTGGACTCCACGCG-3
p22phox	5-ATGGAGCGATGTGGACAGAAG-3	5 -TAGATCACACTGGCAATGGCC-3
p47phox	5-TTCCATCCCCAAATGCAAAG-3	5-TCAGATGCCCTAAAACCGGAG-3
P67phox	5 -GCCTTCACCAAAAGCATCAAC-3	5 -ACCTCACAGGCAAACAGCTTG-3
NOX4	5-CCAGAATGAGGATCCCAGAA-3	5-AAAACCCTCGAGGCAAAGAT-3
Actina	5 -TGCACCACCAACTGCTTAG-3	5 -GGATGCAGGGATGATGTTC-3

### 6.11. Análisis de la viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada por la prueba de tinción con cristal violeta. Las células se sembraron en placas de 12 pozos y se pretrataron o no con 50 ng/ml de HGF por 12 h y después se trataron con 15  $\mu$ M de Antimicina A (AA). Después se lavaron las células con PBS, se fijaron con 3.7% de formaldehído y se tiñeron con 0.2% de cristal violeta. La absorbancia de los extractos en SDS al 2% fue determinada a una longitud de onda de 620 nm. La viabilidad celular fue calculada como porcentaje relativo a las células no tratadas (Gomez-Quiroz et al., 2008).

### 6.12. Determinación de peróxidos

El contenido de las especies reactivas de oxígeno, particularmente peróxidos, fue determinado usando al DCFH que es sensible al estado redox. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratados con 3  $\mu$ M de DCFH por 30 min después del tratamiento con HGF. Las células fueron lavadas con PBS y la placa fue leída con longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm usando un detector multimodal DTX 880 (Beckman Coulter).

### 6.13. Análisis de colocalización de Nrf2

Los hepatocitos se sembraron en cámaras Lab-Tek de vidrio tratadas con colágena, posterior al tratamiento con HGF las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y bloqueado con una solución que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 5% y Triton X-100 al 3% durante 30 min. Las células se lavaron con PBS. El anticuerpo

específico para Nrf2 (Cuadro 1) fue diluido 1:50 en PBS que contenía 0.1% de BSA fue agregado a las células fijadas e incubadas toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Las células fueron lavadas y se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-conejo conjugado con Alexa 488 durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron las células y se incubó con DAPI por 10 min. Finalmente las células fueron examinadas usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA).

#### 6.14. Cuantificación de proteínas

La proteína se cuantificó colorimétricamente utilizando el estuche comercial del ácido bicincónico (BCA) (Pierce, USA), se siguieron las instrucciones del fabricante.

#### 6.15. Análisis estadístico

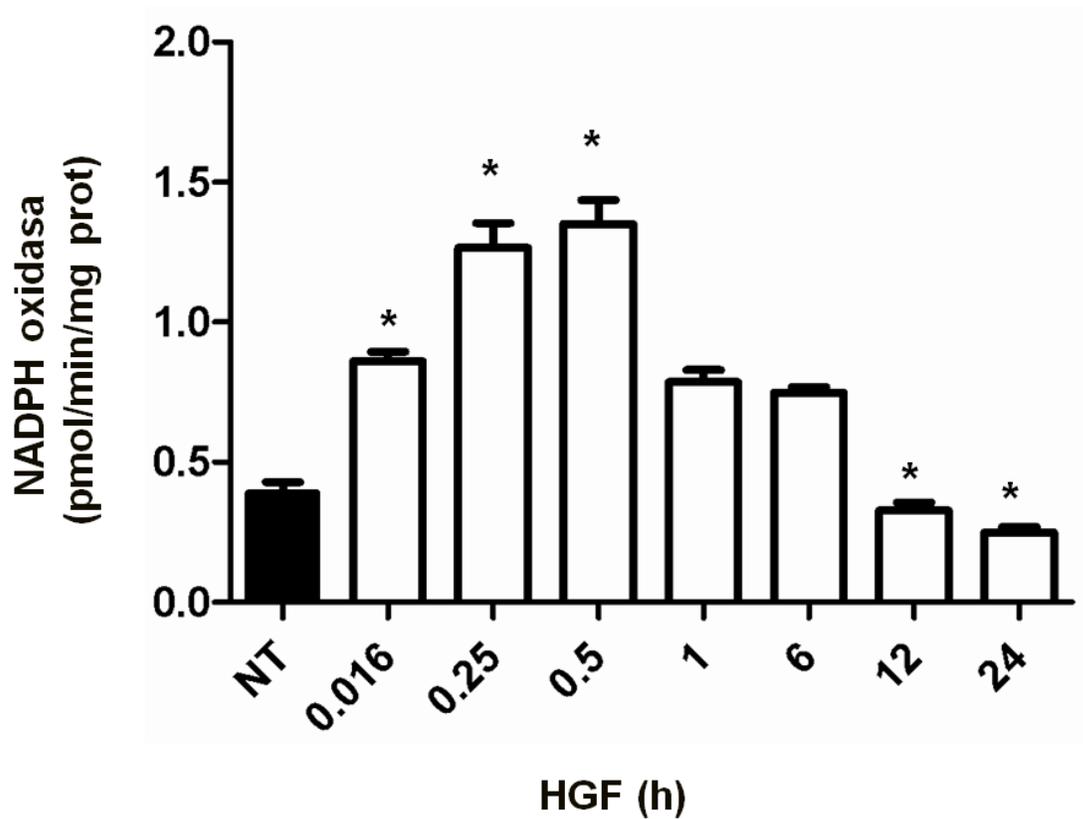
Cada experimento se realizó al menos por triplicado usando células de al menos 3 animales de experimentación. Los datos fueron reportados como el promedio  $\pm$  error estándar (EE). Para la comparación de medias de diferentes grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones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

## 7. RESULTADOS

### 7.1. HGF regula la actividad de NADPH oxidasa

Datos previos de nuestro grupo de investigación revelaron que la eliminación condicional en hepatocitos del receptor c-Met induce la sobre activación de la NADPH oxidasa, y que el tratamiento con HGF en hepatocitos silvestres (Wild type) inducía una disminución en el contenido proteico de la subunidad catalítica Nox2 (Gómez-Quiroz, 2000). Lo anterior sugirió que debía de existir algún mecanismo de regulación de c-Met sobre la oxidasa, por lo que en el presente trabajo nos enfocamos en buscar y caracterizar dicha regulación en hepatocitos de ratón.

Nuestro primer objetivo fue determinar si la actividad de la NADPH oxidasa se ve alterada bajo el estímulo del HGF. Las células se trataron con HGF por 0.016, 0.25, 0.5, 1, 6, 12 y 24 h. Posteriormente procedimos a la determinación de la actividad del complejo enzimático (Figura 1). Los datos muestran que hay un incremento en la actividad desde el minuto inmediato posterior al tratamiento la cual continúa elevándose significativamente hasta los 30 min en donde se encuentra la actividad máxima, a partir de una hora de estímulo, la actividad disminuye hasta valores normales con respecto a las células no tratadas (NT), sin embargo, a partir de las 12 h estos valores disminuyen incluso por debajo de los valores basales, lo que muestra un efecto bifásico del HGF; la actividad se incrementa a tiempos cortos, menores a 30 min, pero es reprimida en tiempos mayores.

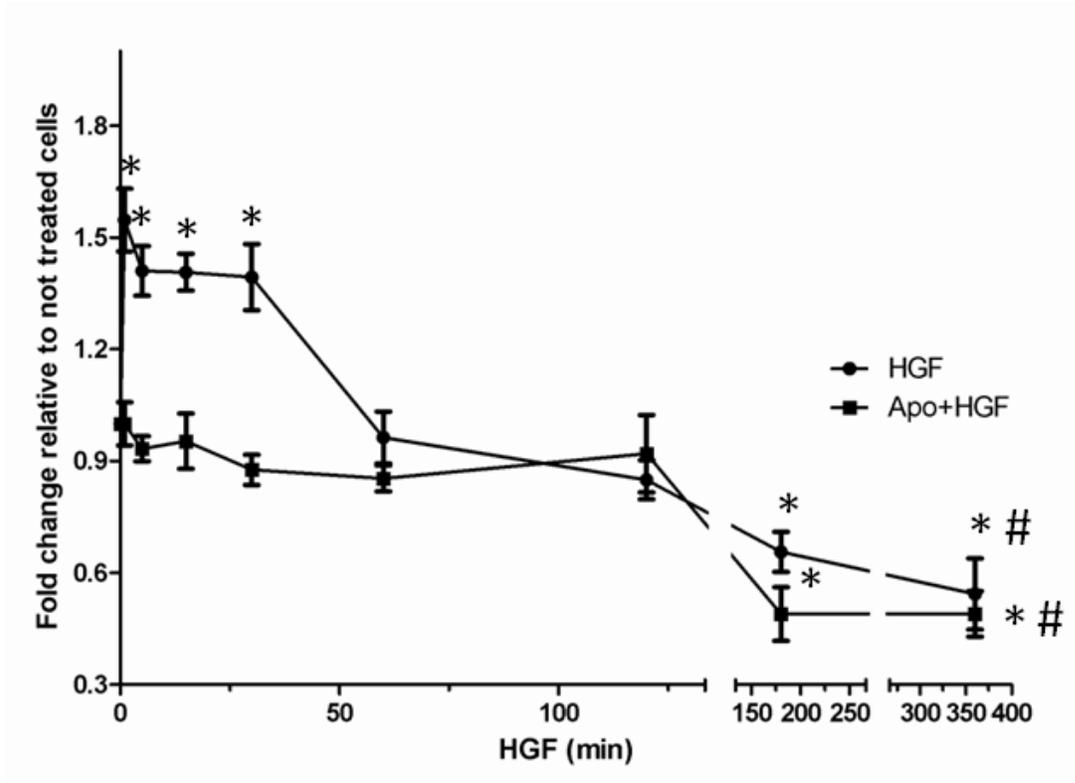


**Figura 1. Efecto del HGF sobre la actividad de la NADPH oxidasa.** Las células se trataron o no con 50 ng/ml de HGF durante los tiempos especificados después se llevó a cabo el ensayo de la actividad como se muestra en la sección de material y métodos. Se midió la oxidación de la NADPH/min/mg de proteína. Los datos muestran el promedio  $\pm$  el error estándar (EE) de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p \leq 0.05$  vs las células no tratadas (NT).

## 7.2. Efecto del HGF sobre ERO

Para confirmar que el efecto del HGF sobre la actividad de la NADPH oxidasa está relacionada con la generación de las ERO, se determinó la presencia de peróxidos usando a la DCFH-DA, la cual se emplea de manera rutinaria para la detección y cuantificación de  $H_2O_2$  y otros peróxidos intracelulares. Las células se trataron con HGF durante diferentes tiempos, que van desde 1 hasta 360 min. Los resultados obtenidos (Figura 2) muestra que el estímulo con HGF incrementa 1.55 veces la producción de ERO al minuto de iniciado el tratamiento en comparación con las células no tratadas y se mantienen elevadas significativamente hasta los 30 min, después de esto las ERO disminuyen hasta niveles basales y después de los 180 min la producción cayó a niveles por debajo de aquellos que presentan las células no tratadas. Este resultado muestra que la producción de ERO sigue el mismo comportamiento que la actividad de la NADPH oxidasa, confirmando la estimulación de la oxidasa por el HGF.

Para corroborar que las ERO generadas por el HGF son producidas de manera específica por la NADPH oxidasa se determinó la presencia de peróxidos y se uso Apocinina (Apo, 300 mM) como inhibidor del complejo enzimático por 30 min. Los resultados muestran que al usar la Apo las ERO producidas en los tiempos cortos que van desde el min hasta los 30 min se abrogan de manera significativa confirmando que la fuente de ERO estimulada por el HGF es la NADPH oxidasa.

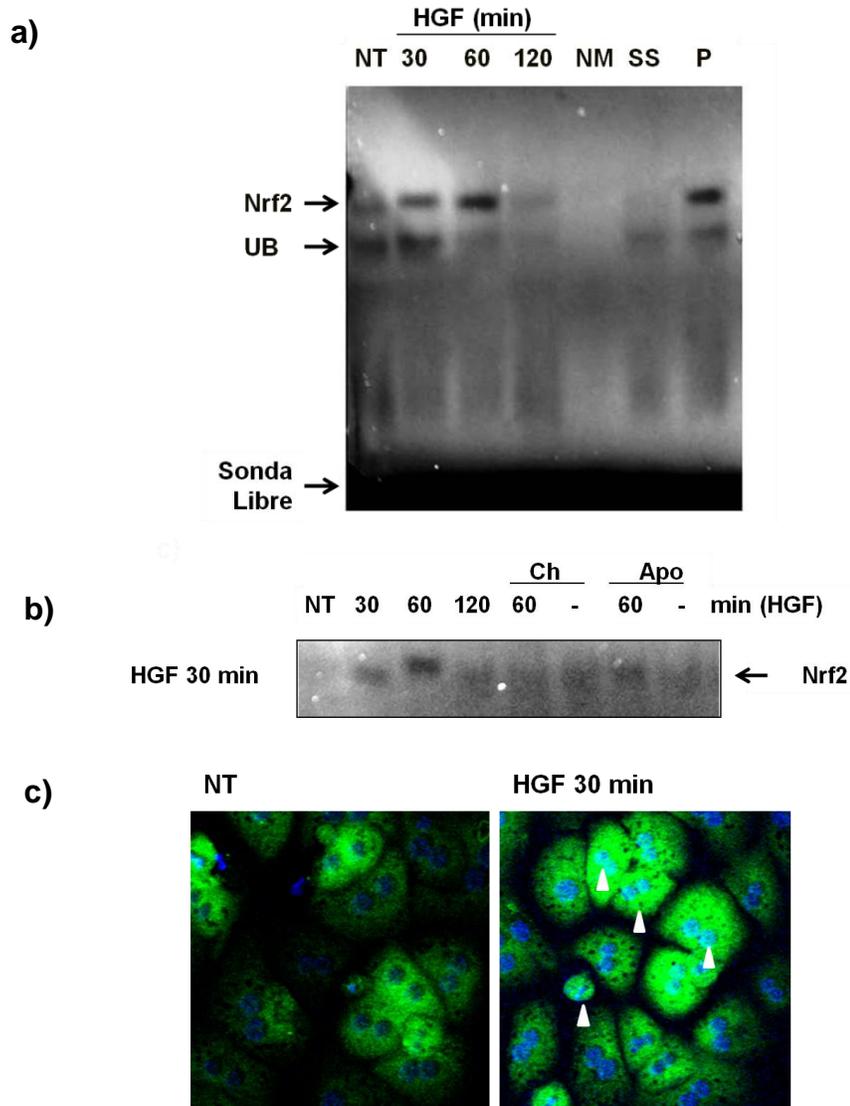


**Figura2. El HGF induce la producción de especies reactivas de oxígeno.** Las células se trataron o no con 50 ng/ml de HGF durante los tiempos especificados, cultivos paralelos se pretrataron con 300 mM de apocinina (Apo) por 30 min y posteriormente se trataron con HGF. La producción de peróxidos se determinó por medio de DCFH-DA midiendo la intensidad de la fluorescencia (IF). Los puntos graficados muestran el promedio  $\pm$  EE de al menos 5 experimentos independientes por duplicado. \*  $p \leq 0.05$  vs células no tratadas al tiempo 0.

### 7.3. Las ERO producidas participan en la activación de Nrf2

Tomando en cuenta los resultados previos, a continuación nos enfocamos en investigar la relevancia en la producción temprana de ERO inducida por el HGF. Hipotetizamos que estas especies reactivas podrían estar involucradas en la activación de vías de sobrevivencia que dependen de modificaciones por el estado redox celular, como la ruta de NF- $\kappa$ B, la cual ha sido ya estudiada por nuestro grupo (Gomez-Quiroz et al., 2008). Otro factor de transcripción que induce sobrevivencia celular es Nrf2. Para comprobar, si la actividad de la NADPH oxidasa, inducida por HGF impacta en la actividad de Nrf2 se realizó un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), las células se trataron con HGF por 30, 60 y 120 min, se extrajo proteína nuclear y se determinó la activación de Nrf2 por medio de su interacción con su secuencia consenso de ADN marcada radioactivamente con ATP isotópico (fósforo 32). Los resultados mostrados en la figura 3a muestran un incremento en la activación de este factor nuclear desde los 30 min y con un pico máximo de activación a los 60 min. Para determinar que el HGF activa a Nrf2 en un proceso que involucra a la NADPH oxidasa y a su activador canónico la proteína cinasa C (PKC). Cultivos de hepatocitos se pretrataron con 10  $\mu$ M de cloruro de queleritrina, un inhibidor de PKC, o con 300  $\mu$ M de Apo, ambos por 30 min, posteriormente se agregaron 50ng/ml de HGF durante 60 min, terminado el tiempo se extrajo proteína nuclear y se procedió a realizar un EMSA. El incremento en la activación de Nrf2 inducido por el HGF fue abrogado por la acción de los dos inhibidores, comprobando que el HGF induce la activación de Nrf2 por un mecanismo mediado por la NADPH oxidasa y PKC (Figura 3b). El efecto del HGF se corroboró por microscopia confocal haciendo

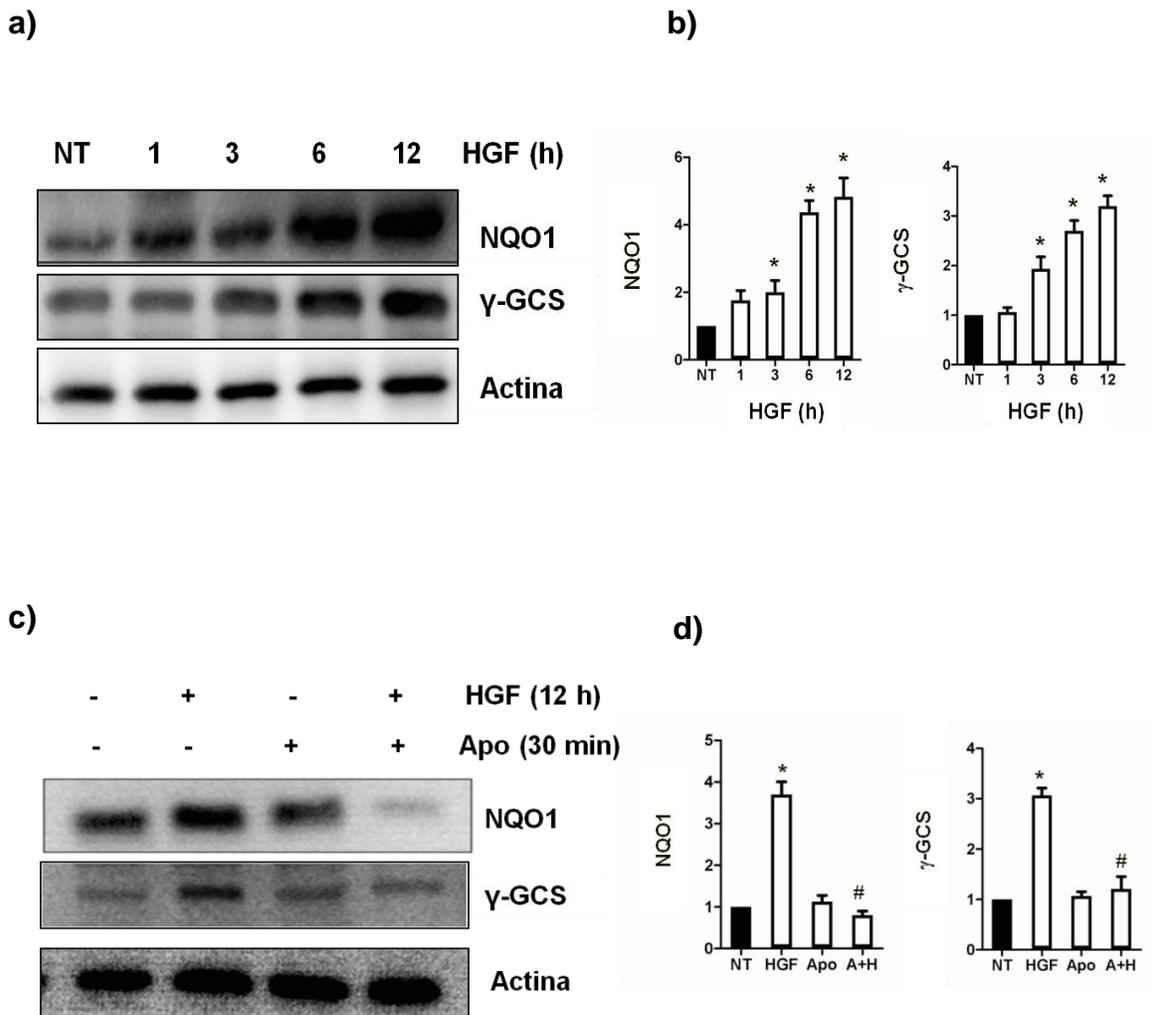
una colocalización de Nrf2 en el núcleo con un tratamiento de HGF por 30 min (Figura 3c).



**Figura 3. El HGF activa a Nrf2 por un mecanismo mediado por PKC y NADPH oxidasa.** a) Las células se trataron o no con 50ng/ml de HGF en los tiempos especificados. Se aisló la proteína nuclear y se analizó la unión de Nrf2 al ADN por medio del ensayo EMSA, con la siguiente simbología: NM- proteína no marcada, SS- “Supershift”, P- control positivo y UB-Nrf2 ubiquitinado. b) Las células se pre-trataron con cloruro de queleritrina (Ch, 10  $\mu$ M) o 300  $\mu$ M de apocinina (Apo) durante 30 min y posteriormente se trataron con HGF, se extrajo la proteína nuclear y la activación de Nrf2 se determino por EMSA. c) Microscopia confocal, las células se trataron o no con HGF, Nrf2 está representado por la tinción verde (Alexa Fluor 488 conjugada a un anticuerpo secundario) y los núcleos están teñidos de azul con DAPI, su colocalización se muestra en color azul cielo. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes.

#### 7.4. Efecto del HGF sobre los genes blanco de Nrf2

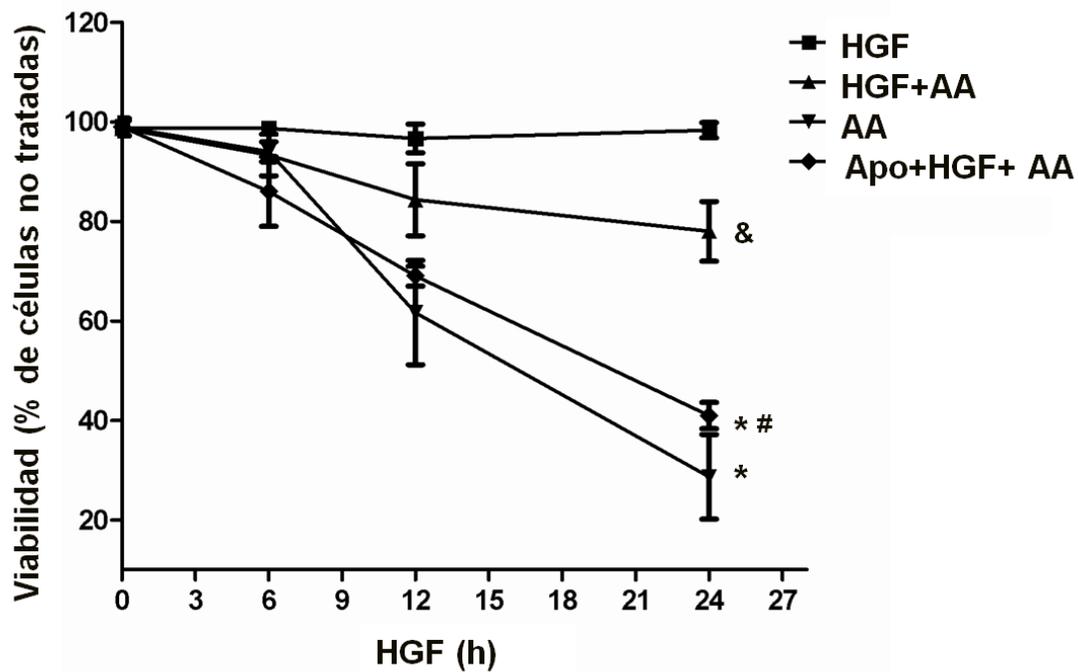
Para una mayor caracterización del efecto del HGF sobre Nrf2 mediado por la NADPH oxidasa, se determinó el contenido de algunas de las principales proteínas blanco de este factor nuclear, tales como  $\gamma$ -GCS y NQO1 por medio de inmunoblot. Los resultados muestran un incremento en el contenido de estas proteínas (Figura 4a), que es dependiente del tiempo de exposición al HGF hasta las 12 h, cuando se encuentra su actividad máxima (Gomez-Quiroz et al., 2008). Para confirmar la participación de la NADPH oxidasa en la expresión de las enzimas, se pre-trató a las células con Apo durante 30 min y después fueron tratados con HGF por 12 h, los resultados (Figura 4b) muestran que al inhibir a la NADPH oxidasa el efecto estimulador del HGF es abrogado.



**Figura 4. Efecto de HGF sobre los genes blanco de Nrf2.** a) Las células se trataron o no con 50ng/ml de HGF durante los tiempos especificados, se determinaron la presencia de las proteínas NQO1 y  $\gamma$ -GCS, como determinantes en la activación de Nrf2 mediado por el HGF. b) las barras representan el número de veces que aumentó la proteína con respecto al de las células no tratadas (NT); c) se pre-trató a las células con apocinina (Apo) 300  $\mu$ M como inhibidor de la NADPH oxidasa y posteriormente se trataron o no con 50ng/ml de HGF. c) las barras representan el número de veces que aumento la proteína con respecto al control. La determinación del contenido de cada proteína se llevo a cabo por Inmunoblot usando anticuerpos específicos (Cuadro1, métodos). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Las barras representan el promedio de las densitometrías de las imágenes  $\pm$  error estándar.  $p \leq 0.05$  vs NT.

### 7.5. Efecto protector del HGF en los hepatocitos de ratón

Finalmente, para confirmar que el HGF tiene un efecto protector en los hepatocitos, se evaluó la viabilidad celular por medio de un estudio de tinción celular con cristal violeta. Los hepatocitos se trataron con HGF por 12 h, posteriormente se trataron por 6, 12 y 24 h con 15  $\mu$ M de antimicina A (AA) que induce estrés oxidante al bloquear la cadena respiratoria mitocondrial. La figura 5 muestra que la AA induce disminución de la viabilidad celular y que el pre tratamiento con HGF mejora la viabilidad dejándola en 82% con respecto a las células tratadas con AA por 24 h, sin embargo, cuando se pre-trató con Apo el efecto protector del HGF que se había observado fue inhibido. El resultado confirma que el HGF induce una respuesta protectora por un mecanismo que es mediado por la activación de la NADPH oxidasa.

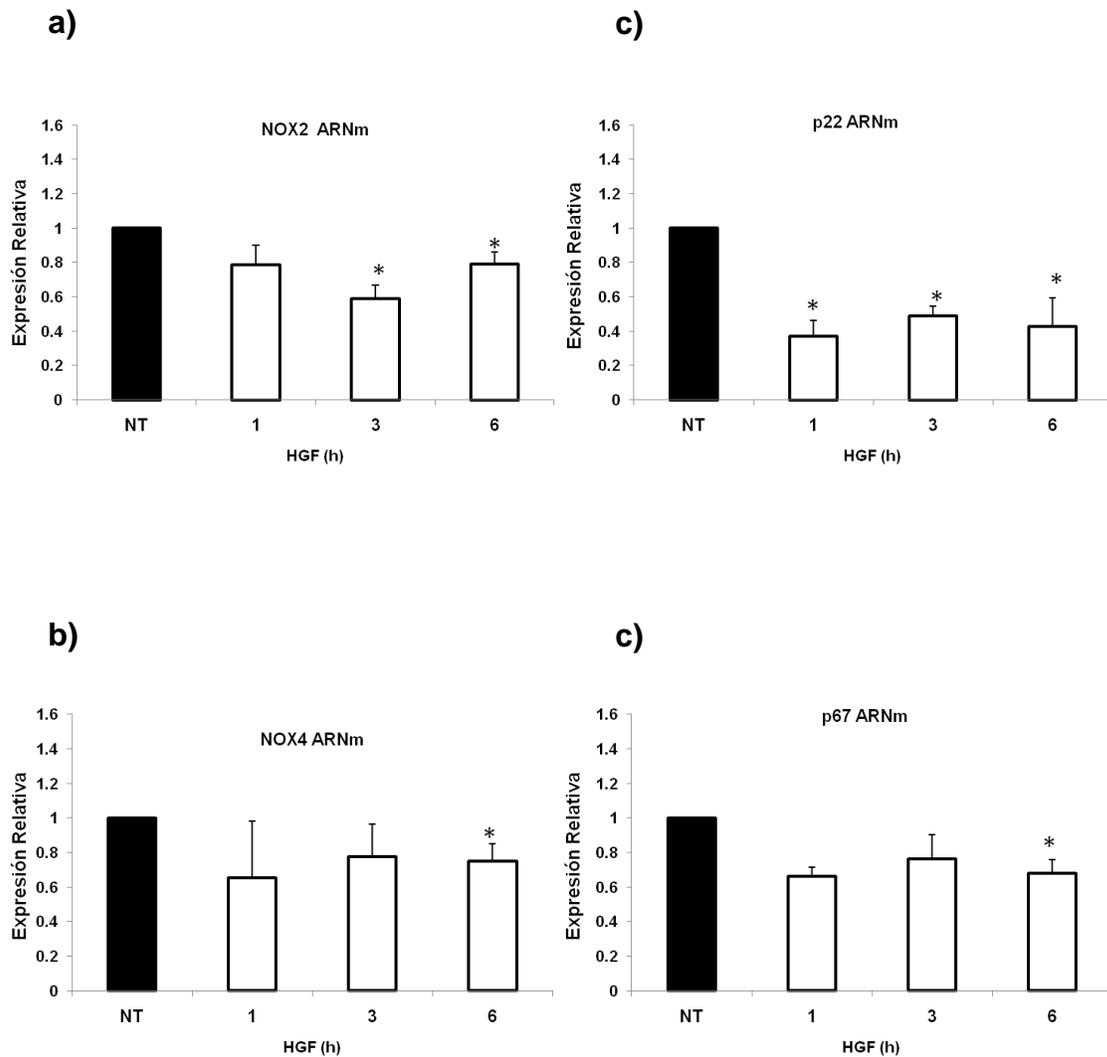


**Figura 5. Efecto protector del HGF en la citotoxicidad inducida por Antimicina A.** Los hepatocitos se pretrataron con 50 ng/ml de HGF y posteriormente se trataron con 15  $\mu$ M de Antimicina A (AA) durante los tiempos mencionados, para inhibir a la NADPH oxidasa se usó 300  $\mu$ M de apocinina (Apo) por 30 min. Los puntos graficados muestran el promedio  $\pm$  el error estándar (EE) de al menos 3 experimentos independientes y realizado por triplicado. \*  $p \leq 0.05$  vs células no tratadas al tiempo 0. &  $p \leq 0.05$  vs células tratadas con AA por 24 h. #  $p \leq 0.05$  vs células tratadas con HGF+AA a 24 h.

## 7.6. Represión transcripcional de las subunidades de la NADPH oxidasa

Retomando el efecto observado a tiempos largos de tratamiento con HGF, donde notamos que el HGF induce un efecto negativo, disminuyendo la actividad de la NADPH oxidasa (Figura 1) por debajo de los niveles basales, decidimos caracterizar la expresión a nivel transcripcional de las subunidades catalíticas (Nox2, Nox4) y reguladoras (p22, p67 y p47) de la NADPH oxidasa por medio de RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Las secuencias de los cebadores o primers se enlistan en el cuadro 2 en la sección de material y métodos.

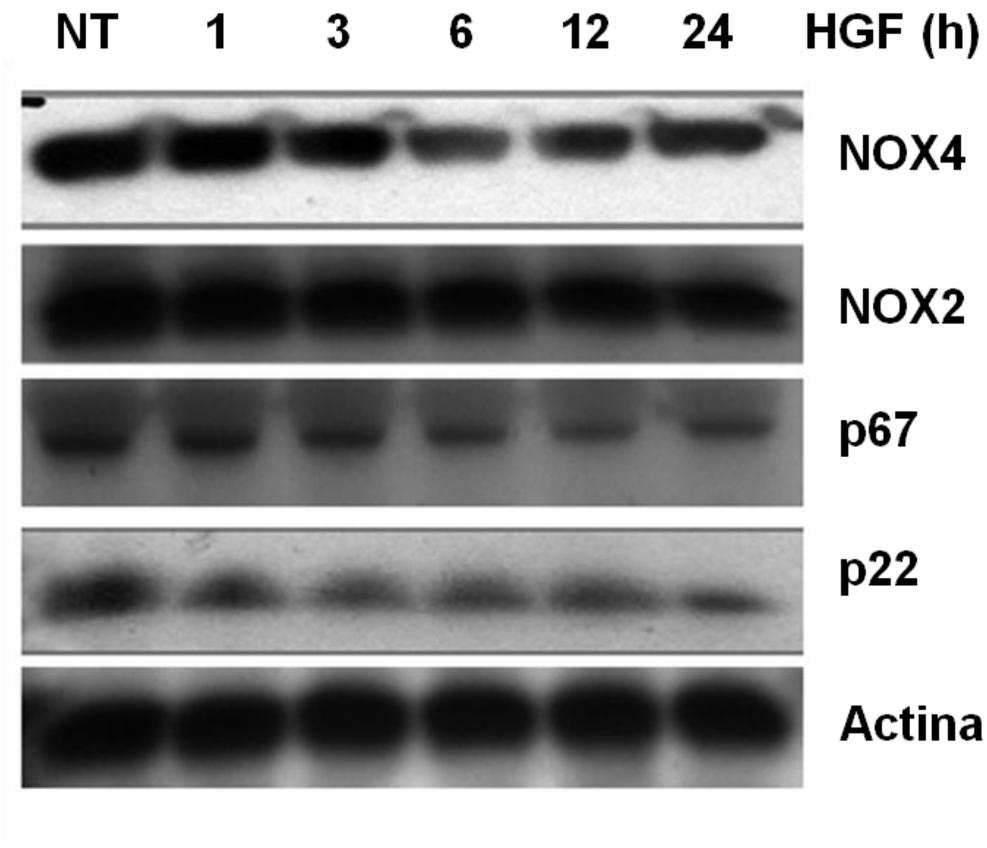
Los resultados (Figura 6) muestran que el HGF induce la disminución en la expresión del ARN mensajero (ARNm) de Nox2 (Figura 6a) desde las 3 h y continúa disminuido a las 6 h de tratamiento, mientras que NOX4 (Figura 6b) presenta disminución a partir de las 6 h; p22 disminuye desde la hora y continúa disminuido hasta las 3 y 6 h después del tratamiento con HGF con respecto a las células no tratadas (Figura 6c). En las subunidades reguladoras se observa la disminución del ARNm en p67 (Figura 6d) a partir de las 6 h, mientras que en p47 no encontramos cambios significativos.



**Figura 6. El HGF induce la represión transcripcional de las subunidades de la NADPH oxidasa.** Las células se trataron o no con 50ng/ml de HGF durante 1, 3 y 6 h. Se extrajo el ARN total y se procedió al análisis de la expresión por qRT-PCR del ARNm de a) Nox2; b) Nox4; c) p22; y d) p67. Las barras muestran el promedio  $\pm$  error estándar de al menos 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. \*  $p \leq 0.05$  vs NT.

### 7.7. HGF induce una disminución en el contenido proteico de las subunidades de la NADPH oxidasa

Para confirmar el efecto del HGF sobre la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa realizamos una serie de inmunodetecciones empleando anticuerpos específicos para cada proteína, los cuales se enlistan en el cuadro 1 en la sección de Material y Métodos. Cultivos celulares fueron tratados a diferentes tiempos con HGF y se extrajo proteína total y procedimos a realizar los Inmunoblot. Los resultados muestran que el HGF disminuye la expresión de algunos componentes de este complejo enzimático de manera dependiente del tiempo (Figura 7). La expresión de la proteína de las subunidades Nox2 (confirma lo observado anteriormente), Nox4, p22 y p67 comienza a disminuir a partir de las 3 h del tratamiento con HGF y se mantiene disminuido a 24 h de tratamiento. El resultado corrobora el efecto del HGF en la represión de las subunidades de la oxidasa incluso en términos de expresión de proteína o post-transcripcional.

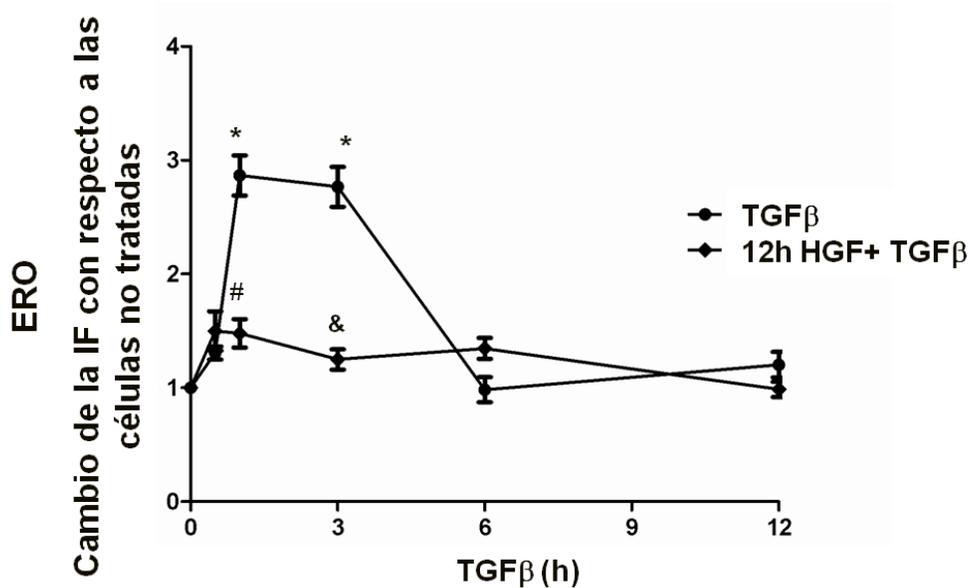


**Figura 7. Efecto del HGF sobre el contenido proteico de la NADPH oxidasa.** Las células se trataron con 50 ng/ml de HGF durante 1, 3, 6, 12 y 24 h. Se aisló la proteína total y la determinación del contenido de cada proteína se llevo a cabo por Inmunoblot usando anticuerpos específicos (Cuadro 1, en materiales y métodos). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

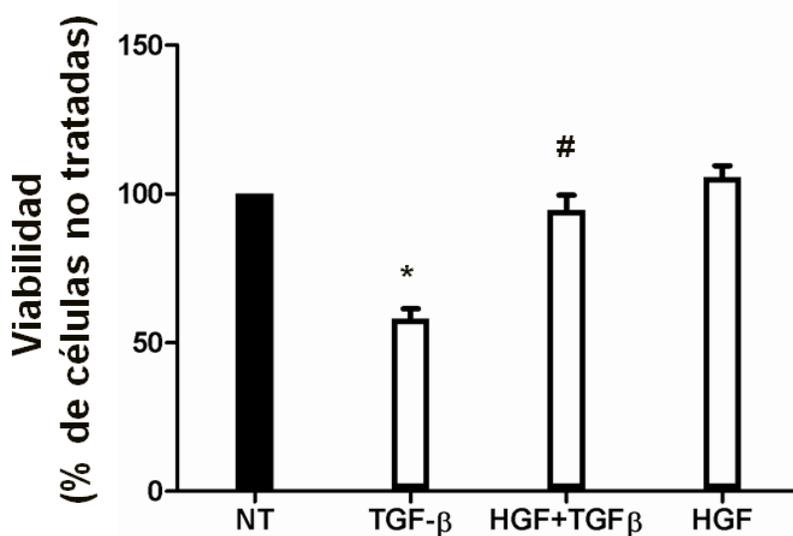
### 7.8. Efecto protector del HGF ante una agresión con TGF- $\beta$

Se realizó un experimento para conocer el efecto protector del HGF ante el TGF- $\beta$ , el cual usa a la NADPH oxidasa para inducir una respuesta citotóxica mediada por ERO. Los resultados muestran que el tratamiento por 3, 6 y 12 h de TGF- $\beta$  induce una producción de ERO teniendo un pico máximo a la hora de tratamiento (2.8 veces respecto al nivel basal), el pre tratamiento con HGF abrogó completamente el efecto inductor de ERO del TGF- $\beta$  (Figura 8a). Lo anterior correlacionó con los ensayos de viabilidad, el TGF- $\beta$  redujo en 58% la viabilidad de los hepatocitos tratados por 24 h, mientras que el HGF previno el efecto citotóxico del TGF- $\beta$ , dejando la viabilidad en 94% (Figura 8b).

a)



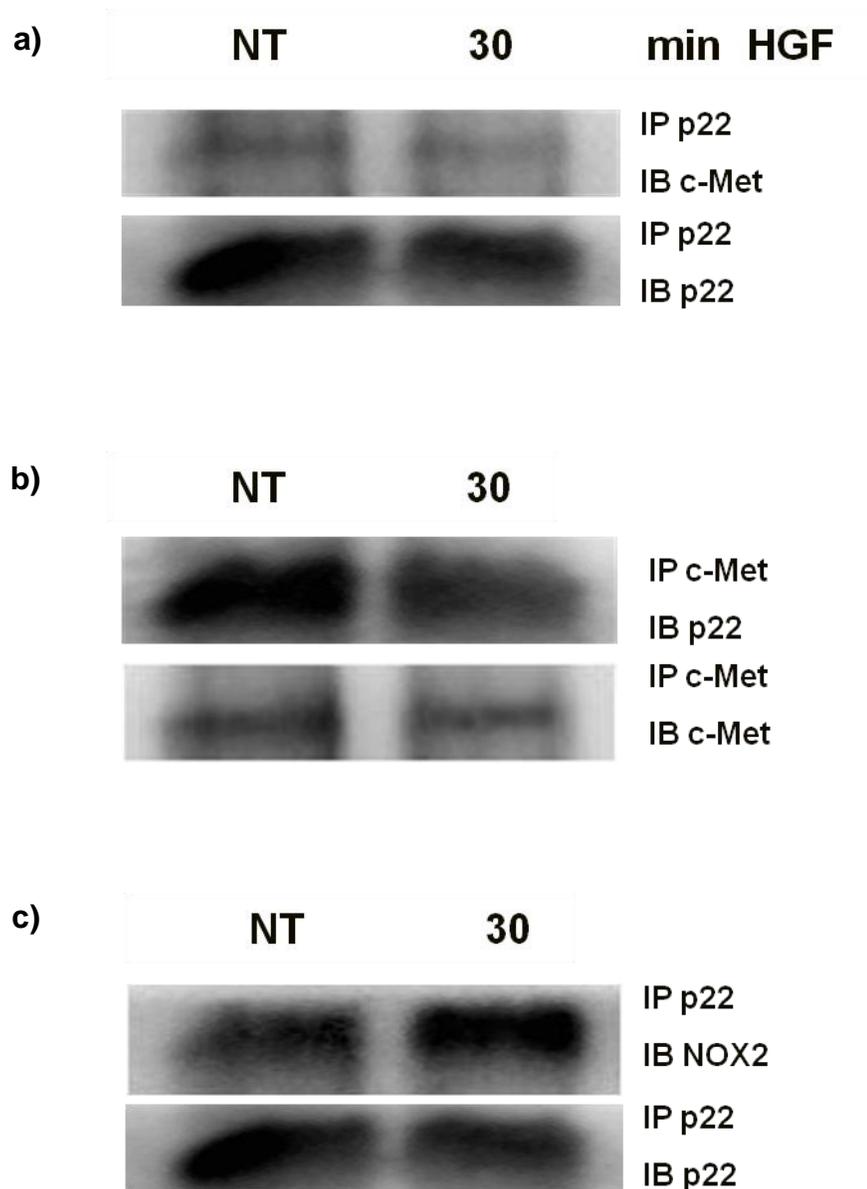
b)



**Figura 8. HGF abroga el efecto tóxico del TGF-β.** a) Las células se trataron o no con 5 ng/ml de TGF-β por diferentes tiempos; cultivos paralelos fueron pretratados con 50 ng/ml de HGF por 12 h y posteriormente se agregó el TGF-β a los tiempos indicados. La producción de peróxidos se determinó por medio de DCFH midiendo el cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a las células no tratadas (NT). b) Los hepatocitos se pretrataron con 50 ng/ml de HGF por 12 h y posteriormente se trataron con 5 ng/ml de TGF-β durante 24 h, la viabilidad se determinó por el porcentaje de células vivas con respecto a las células no tratadas (NT). Los puntos graficados muestran el promedio  $\pm$  EE de al menos 3 experimentos independientes por triplicado. \*  $p \leq 0.05$  vs células no tratadas (NT).

## 7.9. Regulación de la NADPH oxidasa por medio de la interacción de p22 con c-Met

El estudio del mecanismo de interacción de que c-Met con alguna de las subunidades de la NADPH oxidasa que se encuentran ancladas a la membrana se analizó por la técnica de inmunoprecipitación (IP). Las células fueron tratadas o no con HGF durante 30 min que es el tiempo máximo de la actividad de la NADPH oxidasa y de generación de las ERO. Primero inmunoprecipitamos a la subunidad catalítica Nox2 pero encontramos que ésta no estaba interactuando con c-Met (Dato no mostrado). Posteriormente se inmunoprecipitó a p22 y se realizó la inmunodetección de c-Met, los datos muestran que hay una interacción entre p22 y c-Met a nivel basal y que después del estímulo de 30 min con HGF esta interacción se reduce de manera importante, (Figura 9a). Para corroborar este resultado se hizo la IP inversa de p22 seguida de la inmunoblot para c-Met y encontramos que HGF presenta el mismo efecto (Figura 9b). Para determinar si la disminución entre p22 y c-Met a los 30 min de tratamiento se debía a la formación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa determinamos la interacción entre p22 y NOX2 a 30 min, la figura 9c muestra que la interacción entre p22 y Nox2 se incrementa, sugiriendo que c-Met libera a p22 para dar paso al ensamblaje de la oxidasa y a la activación de Nrf2.



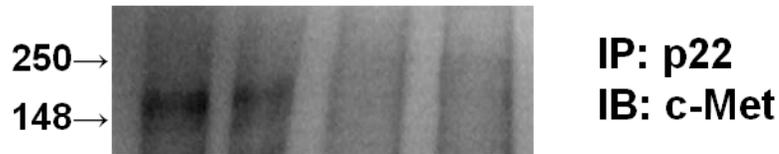
**Figura 9. Interacción entre c-Met y p22.** Las células se trataron con 50ng/ml de HGF durante 30 min. Se asiló la proteína total y se realizó la inmunoprecipitación (IP) seguido de un inmunoblot (IB) para detectar a las proteínas unidas usando anticuerpos específicos (Tabla 1, material y métodos). a) IP de p22 e IB de c-Met; b) IP de c-Met e IB de p22; c) IP de p22 e IB de Nox2. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

7.10. La interacción de entre p22 y c-Met se da de manera extracelular

Para confirmar la interacción encontrada entre p22 y c-Met se hizo un ensayo de entrecruzamiento covalente de proteínas (crosslinking) usando dos agentes de entrecruzamiento el dithiobis [succinimidylpropionate] (DSP) el cual es permeable en las células y es usado para detectar interacciones intracelulares e intermembranales y el 3,3'-dithiobis [sulfo-succinimidyl propionate (DTSSP) que es impermeable a la membrana celular usado para detectar interacciones en dominios extracelulares. Para analizar la interacción de las proteínas se hizo el entrecruzamiento seguido de una IP de p22 e inmunodetección de c-Met, bajo condiciones reductoras y no reductoras empleando el ditiotreitól (DTT) para revertir el posible entrecruzamiento. Los datos en la figura 10 muestran que la interacción entre las proteína se lleva a cabo en la superficie celular, a juzgar por el efecto encontrado solo cuando se usó el DTSSP, la presencia del DTT como agente reductor, eliminó el entrecruzamiento (Figura 10a) y presenta el mismo comportamiento después del tratamiento con HGF debido a que hay una disminución considerable de la interacción debido al tratamiento con HGF con respecto las células no tratadas. En relación con el DSP no encontramos ninguna interacción a nivel basal ni con el tratamiento de HGF (Figura 10b), lo cual sugiere que, como hemos mencionado, la interacción ocurre en dominios extracelulares.

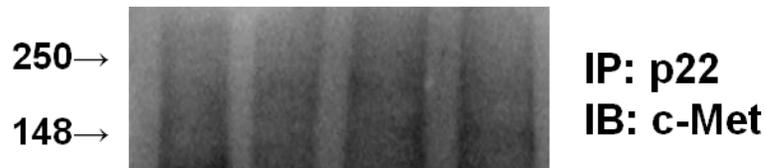
a)

DTT	-	-	+	+
DSSTP	+	+	+	+
HGF (30 min)	-	+	-	+



b)

DTT	-	-	+	+
DSP	+	+	+	+
HGF (30 min)	-	+	-	+



**Figura 10. Entrecruzamiento entre p22 y c-Met.** Las células se trataron con 50 ng/ml de HGF durante 30 min y se expusieron a los agentes de entrecruzamiento a) DTSSP a una concentración de 10 mM; b) DSP a una concentración de 1 mM. El ensayo se llevo a cabo tanto en condiciones reductoras usando ditioneitol (DTT 1 mM) así como no reductoras. Se asiló la proteína total y se inmunoprecipitó (IP) a p22, posteriormente se analizó c-Met por inmunoblot (IB) utilizando anticuerpos específicos (Cuadro 1, material y métodos). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

## 8. DISCUSIÓN

El HGF tiene una amplia gama de respuestas celulares ante estímulos de daño como son la supervivencia, la proliferación, la motogénesis, la morfogénesis entre otros (Matsumoto and Nakamura, 2001). Sin embargo, aún permanece poco estudiado el efecto del HGF en la regulación del estado redox celular y del estrés oxidante (Gomez-Quiroz et al., 2008; Kaposi-Novak et al., 2006; Takami et al., 2007; Valdes-Arzate et al., 2009). Datos previos de nuestro grupo de investigación muestran que los hepatocitos de ratones deficientes de c-Met (MetKO) incrementan la producción de ERO y los mantiene en un estado de estrés oxidante, presentando la sobre-regulación de varios genes relacionados con el estrés celular, muchos de ellos regulados por el factor Nrf2 (Kaposi-Novak et al., 2006), más tarde reportamos que este fenómeno oxidante se debía a la sobre-activación de la NADPH oxidasa y que el tratamiento con HGF en hepatocitos silvestres (WT) inducía una disminución en la expresión de NOX2, y por lo tanto, en la actividad de la este complejo enzimático (Gomez-Quiroz et al., 2008). Los resultados previamente publicados indicaban que el HGF y c-Met ejercen una regulación sobre la NADPH oxidasa, pero se desconocía hasta ahora el mecanismo de regulación, ya que el HGF se presentaba más bien como un antagonista en la activación de la NADPH oxidasa que es regulada por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Murillo et al., 2007) el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kim et al., 2011) el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Yazdanpanah et al., 2009), entre otros. Se ha reportado incluso que la insulina o la angiotensina II, inducen la activación de la oxidasa (Brown and Griendling, 2009).

Los resultados del presente trabajo muestran que la actividad de la NADPH oxidasa a tiempos cortos de tratamiento con HGF se elevan de manera significativa y conforme el tiempo avanza regresan a valores basales y continúan cayendo por debajo de los niveles de las células no tratadas (Figura 1), esto correspondió con la generación de ERO, teniendo el mismo comportamiento que a tiempos cortos aumentan y a tiempos largos caen por debajo de las células control (figura 2). Estos datos muestran que el HGF ejerce una regulación bifásica en la actividad de la NADPH oxidasa que armonizan con los efectos fisiológicos.

La NADPH oxidasa es un complejo multiproteico que se encuentra anclada a las membranas, su función es básicamente la de producir ERO con fines de señalización, o en el caso de las células fagocíticas con fines antibióticos (Brown and Griendling, 2009).

En el hepatocito varias de las citocinas o factores de crecimiento que inducen la activación de la oxidasa, tienen la finalidad de inducir un efecto citotóxico, particularmente el TGF- $\beta$  o el TNF- $\alpha$ , sin embargo, nuestros datos revelan que en el caso del HGF el objetivo fue inducir una respuesta de supervivencia y protección mediada por el factor de transcripción Nrf2.

Como se puede observar en la figura 3a, el HGF indujo la activación de Nrf2 por un mecanismo mediado por PKC y NADPH oxidasa, ya que el pretratamiento con inhibidores específicos para ésta cinasa (Chelerythrine) y para la oxidasa (Apocinina) abrogan la activación de Nrf2 inducida por el HGF (Figura 3b), es importante resaltar que la activación del factor de transcripción fue muy rápida, teniendo niveles significativos a los 30 min y un pico máximo de activación a los 60

min. El efecto del HGF se corroboró por microscopia confocal haciendo una colocalización de Nrf2 en el núcleo (Figura 3c).

Previamente nuestro grupo de investigación reportó que la eliminación condicional de c-Met en hepatocitos inducida una sobreexpresión de varios genes blanco de Nrf2 como son Aldh1a1, Gclc, Gsta1, entre otros (Kaposi-Novak et al., 2006) que marco, sin lugar a dudas, que existía una regulación de c-Met sobre Nrf2. En el presente trabajo hemos dejado claro que dicha regulación se da de manera indirecta por la actividad de la NADPH oxidasa, es decir, c-Met regula a la NADPH oxidasa y ésta a su vez genera las ERO necesarias para la activación de Nrf2. En el caso de los hepatocitos MetKO ésta regulación se pierde, incrementando la producción de ERO que conduce a la sobreactivación de Nrf2. Sin embargo, si bien el hepatocito puede lidiar con este estrés oxidante y sobrevivir, queda sensibilizado al daño, y una segunda agresión como con agonistas de Fas, induce un alto índice de muerte celular por apoptosis (Gomez-Quiroz et al., 2008).

Varios reportes ha señalado que PKC es la principal cinasa que induce la activación de Nrf2, no solo en hepatocitos (Kim et al., 2004; McNally et al., 2007; Niture et al., 2009), sino también en otros tipos celulares (Espada et al., 2009; Zhang and Forman, 2008). Niture y colaboradores (2009) comprobaron que la PKC específica que activa a Nrf2 es la isoforma delta (PKC- $\delta$ ), la cual fosforila en el residuo de la serina 40, permitiendo la estabilización, translocación nuclear de Nrf2 e inicio de la transcripción de sus genes blanco. Además de lo anterior se conoce que HGF media la formación de 1,2-diacil glicerol y liberación de calcio intracelular, ambas funciones son requeridas para la activación total de PKC. Datos del laboratorio del trabajo experimental de Cristina Enríquez muestran que el HGF activa

significativamente varias isoformas de PKC, incluyendo a la isoforma delta (Enríquez 2010, en proceso).

Hemos venido hablando de que las ERO generadas por la NADPH oxidasa permiten la activación de Nrf2. Keap1 es una proteína rica en residuos de cisteínas, los cuales se ha propuesto que pueden ser sensoras del estado redox celular, específicamente las cisteínas 273 y 288 han sido propuestas como las cisteínas claves en la activación de Nrf2 (Zhang and Hannink, 2003), sin embargo, Niture y colaboradores han propuesto que al menos en células hepáticas (HepG2) la cisteína 151 es fundamental para la activación del factor de transcripción (Niture et al., 2009). La oxidación de estas cisteínas permite el debilitamiento de la interacción de Keap1 y Nrf2 generando la estabilidad del factor, es decir, evita ser ubiquitinado por la culina 3, y posteriormente degradada por el proteosoma 26S, esto permite que Nrf2 se libere y se transloque al núcleo.

Nuestros datos muestran que la Apo abroga el efecto del HGF de inducir la activación de Nrf2 (Figura 3b). El papel esencial de la NADPH oxidasa en la activación de Nrf2 fue corroborado en células HepG2 que sobreexpresan Keap1 y que fueron tratadas con análogos del indol como inductor, los cuales estimularon la actividad de la NADPH oxidasa, la oxidación de las cisteínas de Keap1 y el incremento de  $\gamma$ -GCS, efecto que fue suprimido cuando las células fueron pretratadas con difenileneiodonium (DPI), un inhibidor de NADPH oxidasa (Sekhar et al., 2003).

Nuestros datos están proporcionando evidencia de que el HGF es capaz de inducir las dos señales requeridas para la activación de Nrf2. La activación de PKC- $\delta$ , y la generación de ERO vía la NADPH oxidasa.

La respuesta mediada por Nrf2 incrementa la expresión de enzimas involucradas en la transformación, desintoxicación y transporte de xenobióticos, así como la expresión de proteínas antioxidantes (Klaassen et al., 2010). Nuestros datos muestran que la activación de Nrf2, inducida por el HGF, se relaciona con un incremento en la expresión de dos de sus principales genes blanco, NQO1 y  $\gamma$ -GCS (Figura 4a), en una forma dependiente del tiempo, dicho incremento se abrogó cuando pretratamos el cultivo con el inhibidor de la NADPH oxidasa (Figura 4b).

NQO1 es una flavoproteína que cataliza la reducción de quininas, quinoneiminas, compuestos nitroaromáticos, entre otros, induciendo la disminución de los niveles de quinonas y por lo tanto la posibilidad de generación de ERO. Ha sido considerada como el prototipo de gen blanco de Nrf2 y es un marcador indiscutible de la activación de este factor de transcripción (Dinkova et al., 2010).

El GSH es sin lugar a dudas el agente de protección celular más importante, no solo en hepatocitos, sino también en prácticamente todos los tipos celulares, ya que es capaz de capturar por sí mismo ERO o en conjunción con enzimas como la GSH peroxidasa o la GSH transferasa, estas características lo hacen ser un regulador maestro de varias funciones fisiológicas como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, entre otras. La pérdida en la función de las enzimas involucradas en la síntesis o en la homeostasis del GSH induce una gran variedad de enfermedades (Ballatori et al., 2009) .

La síntesis de GSH se lleva a cabo por la intervención de dos enzimas, la  $\gamma$ -GCS y la GSH sintasa, siendo la enzima limitante la primera. La  $\gamma$ -GCS está compuesta a su vez por dos subunidades, la catalítica (GCLC) y la modificadora (GCLM), y los genes que codifican para estas subunidades contienen en sus promotores 5' secuencias consenso ARE de regulación por Nrf2. La GSH sintasa también contiene secuencias ARE, por lo que estímulos que inducen a Nrf2 conducen a la elevación de GSH (Bea et al., 2003).

El efecto protector inducido por el HGF y mediado por la NADPH oxidasa fue corroborado en el presente trabajo por una serie de estudios de viabilidad celular por cristal violeta. La figura 5 muestra que el tratamiento con antimicina A indujo un decremento importante en la sobrevivencia de los hepatocitos, el HGF evito significativamente este efecto tóxico, mientras que el uso de Apo elimino el efecto protector del HGF, dejando claro el papel central de la NADPH oxidasa en la protección generada por el HGF.

Un segundo punto de interés que encontramos fue el efecto mostrado por el HGF de disminuir la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de ERO a tiempos largos, por arriba de 6 h y hasta por 24 h. Estos datos sugieren que el HGF presenta un segundo punto de control del sistema, pudiendo tener repercusión en las funciones que despliegan otros factores de crecimiento que emplean a la NADPH oxidasa.

Investigamos si el HGF inducía el efecto negativo por la supresión de la expresión de algunos componentes de la NADPH oxidasa. Procedimos a aislar ARN total de células tratadas por diferentes tiempos con HGF y realizamos ensayos de RT-PCR

en tiempo real explorando la expresión de las subunidades catalíticas Nox2 y Nox4, así como las regulatorias p67, p47 y p22. Los resultados mostrados en la figura 6 indican que el HGF indujo la represión en la expresión de todas las subunidades estudiadas, con la excepción de p47, donde no vimos efecto alguno (dato no mostrado). Lo anterior fue corroborado a nivel de la expresión de proteínas por Inmunoblot, confirmando el efecto represor de HGF (Figura 7).

Algunos reportes han indicado que la expresión de los componentes de la oxidasa se da de manera coordinada, por ejemplo la angiotensina II induce la expresión de Nox1 y p22 (Bedard and Krause, 2007), mientras que en células endoteliales de pulmón humano sujetas a condiciones de hiperoxia se observa un incremento en la expresión de los ARNm de Nox1, Nox2, Nox4, p22, así como de las subunidades regulatorias, pero solo p22, Nox2 y Nox4 fueron confirmadas por Inmunoblot (Pendyala et al., 2009).

Nuestros resultados de RT-PCR en tiempo real y por Inmunoblot, confirman que también la represión se da de manera coordinada, esto está soportado con evidencia reportada en pacientes con la enfermedad crónica granulomatosa, donde se ha observado que en fagocitos de pacientes con deficiencia en Nox2 no tienen niveles detectables de p22, mientras que en pacientes deficientes de p22 no se pudo encontrar la presencia de Nox2 (Parkos et al., 1989). Se ha propuesto que Nox2 y p22 son estables solo como heterodímeros, mientras que los monómeros son degradados por el proteosoma 26S (DeLeo et al., 2000). Nuestros datos muestran que la represión de la NADPH oxidasa generada por el HGF se da a nivel transcripcional y post-traducciona l sugiriendo que rutas de señalización comunes

permiten la expresión o represión de los componentes de la NADPH oxidasa. El estudio de estas rutas está ya en conducción en nuestro laboratorio.

Con la finalidad de poder encontrar la relevancia de la represión en la expresión de los componentes de la NADPH oxidasa decidimos ensayar la generación de ERO y la viabilidad en hepatocitos tratados con TGF- $\beta$ , los datos muestran que el HGF es capaz de abrogar el efecto tóxico del TGF- $\beta$  (Figura 8).

Es bien sabido que el TGF- $\beta$ , el TNF- $\alpha$  o FasL inducen una respuesta citotóxica en hepatocitos mediante la generación de ERO derivados la NADPH oxidasa (Carmona-Cuenca et al., 2006; Wang et al., 2002; Yazdanpanah et al., 2009). Nuestro trabajo está evidenciando que, alternativamente a los mecanismos de inducción de proteínas antioxidantes y de supervivencia, el HGF puede también inducir la represión de los componentes de la NADPH oxidasa y por lo tanto impedir el efecto tóxico de factores como el TGF- $\beta$  o el TNF- $\alpha$  lo cual identifica un punto regulatorio nuevo que podría tener importancia en el diseño de nuevas medidas terapéuticas para enfermedades con condicionantes de elevación de estos factores citotóxicos para hepatocitos.

Dado que se encontró una respuesta acelerada en la regulación de la NADPH oxidasa por el HGF hipotetizamos que podría existir un mecanismo de control más específico. El receptor c-Met es una proteína transmembranal que ha mostrado interactuar físicamente (interacción proteína-proteína) con otras proteínas transmembranales o asociadas a la membrana, como son los casos de la semaforina 4D, Fas, o indirectamente con TNFR1 vía la cinasa de la riboflavina

(Conrotto et al., 2005; Giordano et al., 2002; Wang et al., 2002; Yazdanpanah et al., 2009)

La idea que planteamos fue que c-Met está formando una interacción física con algún componente membranal de la NADPH oxidasa, por lo que decidimos explorar por inmunoprecipitación si dicha unión se presentaba con Nox2, encontrando resultados negativos (datos no mostrados), por lo que decidimos buscar si c-Met inmuoprecipitaba con p22. Los resultados presentados en la (Figura 9a) muestran que p22 inmunoprecipita con c-Met, para verificar lo anterior realizamos la inmunoprecipitación inversa (Figura 9b) donde se inmunoprecipitó a c-Met y se inmunodetectó a p22 encontrando el mismo resultado. Los datos muestran que en un estado libre de estímulo c-Met y p22 están interactuando fuertemente, dicha interacción se debilita de manera importante, por el tratamiento con HGF por 30 min, sugiriendo que c-Met libera a p22 para que la NADPH oxidasa sea ensamblada, para confirmar este efecto, realizamos una inmunoprecipitación de p22 y la inmunodetección de Nox2, la figura 9c muestra que la interacción entre p22 y c-Met es débil en condiciones libre de estímulo y se incrementa por acción del HGF, reafirmando una vez más que el HGF induce el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa.

Para confirmar esta interacción realizamos un entrecruzamiento (crosslinking) de proteínas usando dos agentes de entrecruzamiento uno permeable a la membrana plasmática (DSP) y otro impermeable (DTSSP), esto con la finalidad de identificar si la interacción se da en dominios extracelulares o intracelulares. La figura 10 a muestra que el entrecruzamiento se da en dominios extracelulares, ya que el tratamiento con DSP no mostro presentar ningún complejo entrecruzado específico

para c-Met (Figura 10b). Para determinar la especificidad del entrecruzamiento se hizo la reacción de reversión del entrecruzamiento con un agente reductor (DTT) mostrando la desaparición de la banda detectada por Inmunoblot.

Si bien se ha identificado a p22 como una proteína adaptadora entre los componentes citoplasmáticos de NADPH oxidasa y las subunidades catalíticas, cada vez se tiene más información respecto a la actividad reguladora de p22. Recientemente se ha reportado que la cinasa de la riboflavina media la interacción entre TNFR1 y la NADPH oxidasa, específicamente por medio de p22 (Yazdanpanah et al., 2009). En ésta interacción es requerida para una correcta función del TNFR1 en la generación de ERO con fines citotóxicos. Por otro lado, se ha propuesto que p22 es sujeto de fosforilaciones reguladoras mediadas por la fosfolipasa D y PKC, y en neutrofilos los niveles de fosforilación en p22 correlacionan con la actividad de la NADPH oxidasa (Regier et al., 2000).

## **9. CONCLUSIÓN**

Tomando en consideración los datos que presentamos en el presenta trabajo de tesis, junto con los datos previamente publicados por nuestro grupo, nos permite proponer un mecanismo de regulación dual de la NADPH oxidasa por el HGF y su receptor c-Met.

El primer punto de regulación se da por un mecanismo que se muestra en la figura 11. En condiciones basales, c-Met se encuentra interactuando con p22, evitando la sobreactivación de la NADPH oxidasa. Tras la unión de HGF con c-Met, p22 se libera permitiendo el ensamblaje de la oxidasa, que es además, promovido por la activación de PKC por la señalización de c-Met. La NADPH oxidasa, una vez

activada, genera las ERO necesarias para la activación del factor de transcripción Nrf2, el cual promoverá la expresión de proteínas de supervivencia y desintoxicación.

Por otro lado, el segundo mecanismo, está dirigido a la represión de la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa, que ya se encuentra bajo investigación por nuestro grupo de trabajo. Ésta represión permite disminuir los niveles de NADPH oxidasa generando un bloqueo en las actividades citotóxicas de factores como el TGF- $\beta$  induciendo igualmente una respuesta de supervivencia.

En conclusión el presente trabajo reporta nuevos mecanismos de supervivencia ejercidos por el HGF, los cuales pueden ser considerados para el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas en donde la sobreactivación de la NADPH oxidasa sea la condicionante para el inicio o desarrollo de patologías, no solo hepáticas, sino de prácticamente cualquier órgano o sistema (Maher et al, 2010; Yang et al 2011).

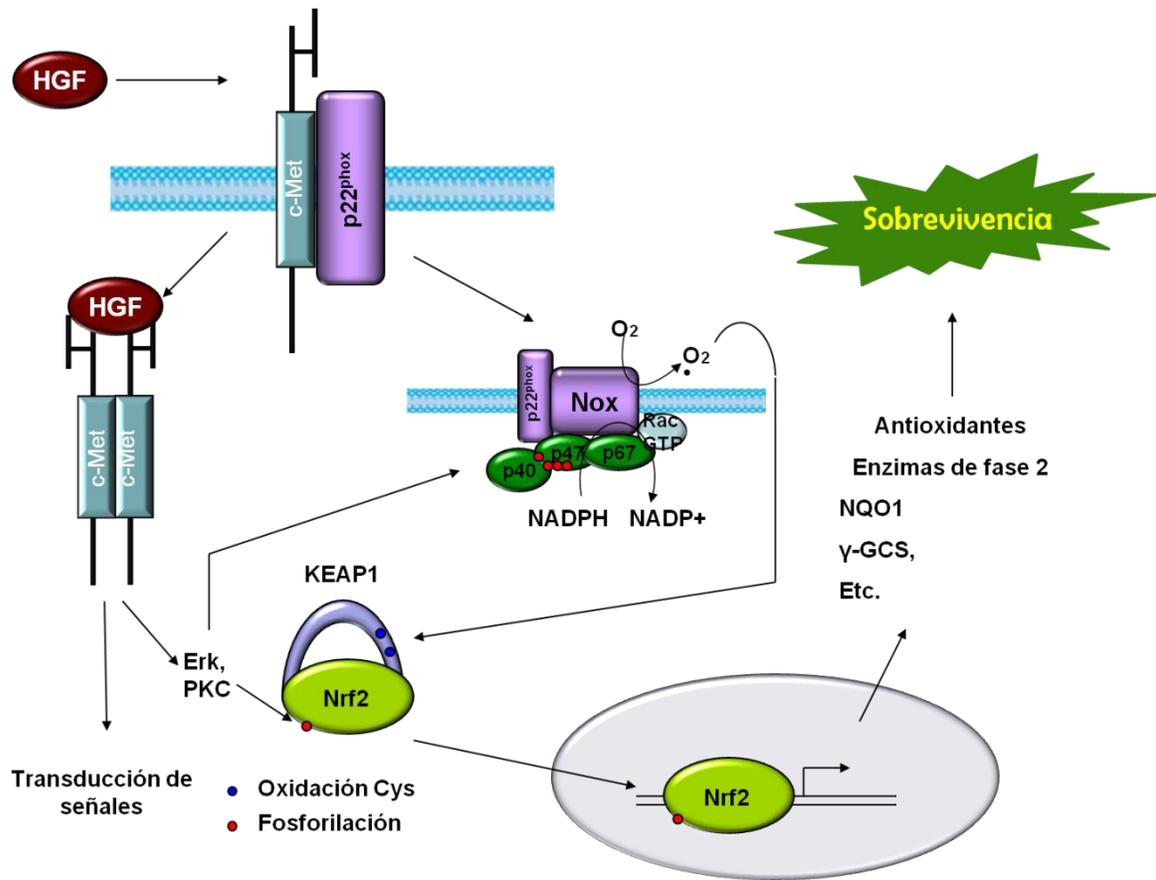


Figura 11. Regulación post-traduccional de la NADPH oxidasa y activación de Nrf2 por el HGF/c-Met.

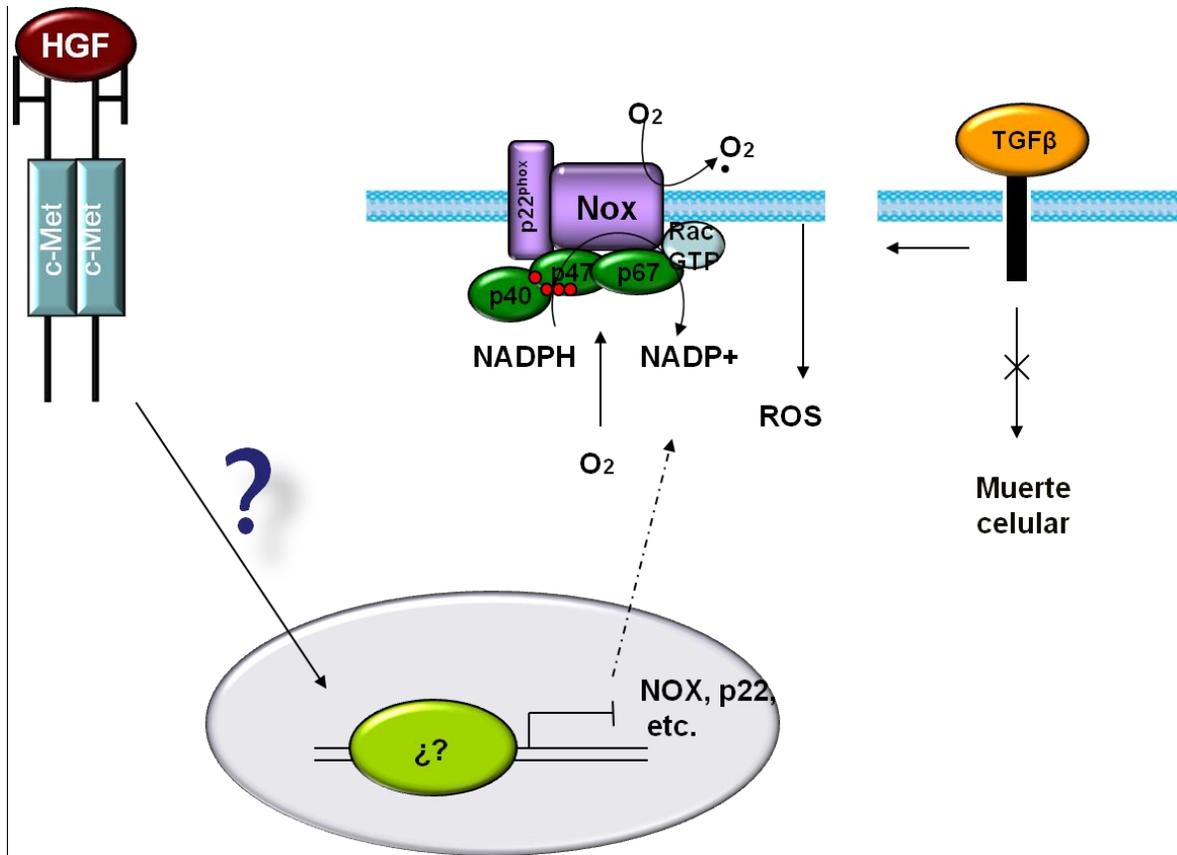


Figura 12. Regulación transcripcional de la NADPH oxidasa por el HGF/c-Met.

## 10. REFERENCIAS

- Ago, T., Kuribayashi, F., Hiroaki, H., Takeya, R., Ito, T., Kohda, D., and Sumimoto, H. (2003). Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4474-4479.
- Arends, B., Slump, E., Spee, B., Rothuizen, J., and Penning, L.C. (2008). Hepatocyte growth factor improves viability after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced toxicity in bile duct epithelial cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 147, 324-330.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., and Hammond, C.L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390, 191-214.
- Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.H. (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem* 279, 46065-46072.
- Bea, F., Hudson, F.N., Chait, A., Kavanagh, T.J., and Rosenfeld, M.E. (2003). Induction of glutathione synthesis in macrophages by oxidized low-density lipoproteins is mediated by consensus antioxidant response elements. *Circ Res* 92, 386-393.
- Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313.
- Bokoch, G.M., and Knaus, U.G. (2003). NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 28, 502-508.
- Boudreau, H.E., Emerson, S.U., Korzeniowska, A., Jendrysik, M.A., and Leto, T.L. (2009). Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J Virol* 83, 12934-12946.
- Brown, D.I., and Griending, K.K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 47, 1239-1253.
- Carmona-Cuenca, I., Herrera, B., Ventura, J.J., Roncero, C., Fernandez, M., and Fabregat, I. (2006). EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J Cell Physiol* 207, 322-330.
- Conrotto, P., Valdembri, D., Corso, S., Serini, G., Tamagnone, L., Comoglio, P.M., Bussolino, F., and Giordano, S. (2005). Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1. *Blood* 105, 4321-4329.

Crawford, A.R., Lin, X.Z., and Crawford, J.M. (1998). The normal adult human liver biopsy: a quantitative reference standard. *Hepatology* 28, 323-331.

Cheng, G., Diebold, B.A., Hughes, Y., and Lambeth, J.D. (2006). Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 281, 17718-17726.

De Minicis, S., Bataller, R., and Brenner, D.A. (2006). NADPH oxidase in the liver: defensive, offensive, or fibrogenic? *Gastroenterology* 131, 272-275.

De Minicis, S., Seki, E., Paik, Y.H., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Kluwe, J., Torozzi, L., Miyai, K., Benedetti, A., Schwabe, R.F., et al. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology* 52, 1420-1430.

de Mochel, N.S., Seronello, S., Wang, S.H., Ito, C., Zheng, J.X., Liang, T.J., Lambeth, J.D., and Choi, J. Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52, 47-59.

DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., and Nauseef, W.M. (2000). Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 275, 13986-13993.

Dinkova-Kostova, A.T., and Talalay, P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys* 501, 116-123.

Espada, S., Rojo, A.I., Salinas, M., and Cuadrado, A. (2009). The muscarinic M1 receptor activates Nrf2 through a signaling cascade that involves protein kinase C and inhibition of GSK-3 $\beta$ : connecting neurotransmission with neuroprotection. *J Neurochem* 110, 1107-1119.

Fausto, N., Campbell, J.S., and Riehle, K.J. (2006). Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-53.

Foveau, B., Ancot, F., Leroy, C., Petrelli, A., Reiss, K., Vingtdeux, V., Giordano, S., Fafeur, V., and Tulasne, D. (2009). Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* 20, 2495-2507.

Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23, 239-257.

Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., and Leto, T.L. (2000). Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8010-8014.

Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L., and Comoglio, P.M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4, 720-724.

Giordano, S., Di Renzo, M.F., Narsimhan, R.P., Cooper, C.S., Rosa, C., and Comoglio, P.M. (1989). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1383-1388.

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

Griffith, B., Pendyala, S., Hecker, L., Lee, P.J., Natarajan, V., and Thannickal, V.J. (2009). NOX enzymes and pulmonary disease. *Antioxid Redox Signal* 11, 2505-2516.

Kamata, T. (2009). Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci* 100, 1382-1388.

Kaposi-Novak, P., Lee, J.S., Gomez-Quiroz, L., Coulouarn, C., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2006). Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest* 116, 1582-1595.

Kim, H.J., Kim, C.H., Ryu, J.H., Joo, J.H., Lee, S.N., Kim, M.J., Lee, J.G., Bae, Y.S., and Yoon, J.H. Crosstalk between platelet-derived growth factor-induced Nox4 activation and MUC8 gene overexpression in human airway epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 50, 1039-1052.

Kim, S.G., and Kim, S.O. (2004). PKC downstream of PI3-kinase regulates peroxynitrite formation for Nrf2-mediated GSTA2 induction. *Arch Pharm Res* 27, 757-762.

Klaassen, C.D., and Reisman, S.A. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 57-65.

Kobayashi, A., Kang, M.I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004). Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24, 7130-7139.

Leto, T.L., Morand, S., Hurt, D., and Ueyama, T. (2009). Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 11, 2607-2619.

Longati, P., Bardelli, A., Ponzetto, C., Naldini, L., and Comoglio, P.M. (1994). Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene* 9, 49-57.

Maher, J., and Yamamoto, M. The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 4-15.

Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C., and Knaus, U.G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18, 69-82.

Mata-Greenwood, E., Jenkins, C., Farrow, K.N., Konduri, G.G., Russell, J.A., Lakshminrusimha, S., Black, S.M., and Steinhorn, R.H. (2006). eNOS function is developmentally regulated: uncoupling of eNOS occurs postnatally. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L232-241.

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

McNally, S.J., Harrison, E.M., Ross, J.A., Garden, O.J., and Wigmore, S.J. (2007). Curcumin induces heme oxygenase 1 through generation of reactive oxygen species, p38 activation and phosphatase inhibition. *Int J Mol Med* 19, 165-172.

Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., and et al. (1989). Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 967-973.

Mizuno, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2008). HGF as a renotropic and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. *Front Biosci* 13, 7072-7086.

Murillo, M.M., Carmona-Cuenca, I., Del Castillo, G., Ortiz, C., Roncero, C., Sanchez, A., Fernandez, M., and Fabregat, I. (2007). Activation of NADPH oxidase by transforming growth factor-beta in hepatocytes mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor ligands through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Biochem J* 405, 251-259.

Nakamura, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Sawa, Y., and Matsuda, H. (2000). Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 106, 1511-1519.

Nakamura, T., Nawa, K., and Ichihara, A. (1984). Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1450-1459.

Niture, S.K., Jain, A.K., and Jaiswal, A.K. (2009). Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* 122, 4452-4464.

Opitz, N., Drummond, G.R., Selemidis, S., Meurer, S., and Schmidt, H.H. (2007). The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: a commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms". *Free Radic Biol Med* 42, 175-179.

Papeleu, P., Vanhaecke, T., Henkens, T., Elaut, G., Vinken, M., Snykers, S., and Rogiers, V. (2006). Isolation of rat hepatocytes. *Methods Mol Biol* 320, 229-237.

Parkos, C.A., Dinauer, M.C., Jesaitis, A.J., Orkin, S.H., and Curnutte, J.T. (1989). Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 73, 1416-1420.

Pendyala, S., Gorshkova, I.A., Usatyuk, P.V., He, D., Pennathur, A., Lambeth, J.D., Thannickal, V.J., and Natarajan, V. (2009). Role of Nox4 and Nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 11, 747-764.

Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G., and Comoglio, P.M. (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-271.

Regier, D.S., Greene, D.G., Sergeant, S., Jesaitis, A.J., and McPhail, L.C. (2000). Phosphorylation of p22phox is mediated by phospholipase D-dependent and -independent mechanisms. Correlation of NADPH oxidase activity and p22phox phosphorylation. *J Biol Chem* 275, 28406-28412.

Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., and Haussinger, D. (2005). Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 280, 27179-27194.

San Jose, G., Moreno, M.U., Olivan, S., Beloqui, O., Fortuno, A., Diez, J., and Zalba, G. (2004). Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension* 44, 163-169.

Schwabe, R.F., and Brenner, D.A. (2006). Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G583-589.

Sekhar, K.R., Crooks, P.A., Sonar, V.N., Friedman, D.B., Chan, J.Y., Meredith, M.J., Starnes, J.H., Kelton, K.R., Summar, S.R., Sasi, S., et al. (2003). NADPH oxidase activity is essential for Keap1/Nrf2-mediated induction of GCLC in response to 2-indol-3-yl-methylenequinuclidin-3-ols. *Cancer Res* 63, 5636-5645.

Serrander, L., Cartier, L., Bedard, K., Banfi, B., Lardy, B., Plastre, O., Sienkiewicz, A., Forro, L., Schlegel, W., and Krause, K.H. (2007). NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J* 406, 105-114.

Takami, T., Kaposi-Novak, P., Uchida, K., Gomez-Quiroz, L.E., Conner, E.A., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2007). Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 67, 9844-9851.

Tripathi, P., and Hildeman, D. (2004). Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis* 9, 515-523.

Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P.M. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 834-848.

Ushio-Fukai, M. (2006). Localizing NADPH oxidase-derived ROS. *Sci STKE* 2006, re8.

Ushio-Fukai, M., Zafari, A.M., Fukui, T., Ishizaka, N., and Griendling, K.K. (1996). p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271, 23317-23321.

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

Wang, X., DeFrances, M.C., Dai, Y., Pediaditakis, P., Johnson, C., Bell, A., Michalopoulos, G.K., and Zarnegar, R. (2002). A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 9, 411-421.

Yanagita, K., Nagaike, M., Ishibashi, H., Niho, Y., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (1992). Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 802-809.

Yang, J., Tan, Y., Zhao, F., Ma, Z., Wang, Y., Zheng, S., Epstein, P.N., Yu, J., Yin, X., Zheng, Y., et al. Angiotensin II plays a critical role in diabetic pulmonary fibrosis

most likely via activation of NADPH oxidase-mediated nitrosative damage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

Yazdanpanah, B., Wiegmann, K., Tchikov, V., Krut, O., Pongratz, C., Schramm, M., Kleinridders, A., Wunderlich, T., Kashkar, H., Utermohlen, O., et al. (2009). Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. *Nature* 460, 1159-1163.

Yu, J.H., Lim, J.W., Kim, K.H., Morio, T., and Kim, H. (2005). NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med* 39, 590-602.

Zhang, D.D., and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23, 8137-8151.

Zhang, H., and Forman, H.J. (2008). Acrolein induces heme oxygenase-1 through PKC-delta and PI3K in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 483-490.

Los miembros del jurado de designado por la División de Ciencias Biológicas y de la de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo Firmantes, aprobaron la tesis titulada: "REGULACIÓN DUAL DE LA NADPH OXIDASA POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO (HGF) EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EN HEPATOCITOS DE RATON", con fecha 3 de AGOSTO del 2011.

JURADO DE EXAMEN



**PRESIDENTE**

**Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz**  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa



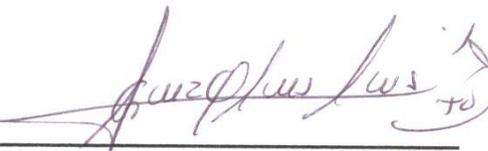
**SECRETARIO**

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**  
Departamento de Medicina Genómica y  
Toxicología Ambiental  
Universidad Nacional Autónoma de  
México



**VOCAL**

**Dr. Javier Barrios González**  
Departamento de Biotecnología  
Universidad Autónoma Metropolitana-  
Iztapalapa



**VOCAL**

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