



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EFECTO DE LA SOBRECARGA DE COLESTEROL SOBRE LA
FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES
REACTIVAS DE OXÍGENO. PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
DE HEPATOCITOS SOBRE EL CONTROL DEL ESTRÉS OXIDANTE”**

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

PRESENTA:
M. en Biol. Exp. Mayra Domínguez Pérez

Comité Tutorial

Directora: Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.
Asesores: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Dr. Salvador Uribe Carvajal

México, D.F., 25 de Mayo de 2016

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz. El trabajo de investigación fue patrocinado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, por medio de los proyectos con clave 166042 e INFR-2013-01-205941, así como PRODEP 913026-14612111).

Durante el transcurso del doctorado en Biología Experimental, en la UAM-Iztapalapa, recibí la beca otorgada por el CONACYT, con número de becario/CVU 233304/289768, en el período 2011-2015, organismo al que agradezco su apoyo.

Los miembros del jurado, designados por Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“EFECTO DE LA SOBRECARGA DE COLESTEROL SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL. LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS SOBRE EL CONTROL DEL ESTRÉS OXIDANTE”**, que presenta Mayra Domínguez Pérez con fecha de examen 25 de Mayo de 2016.

MIEMBROS DEL JURADO



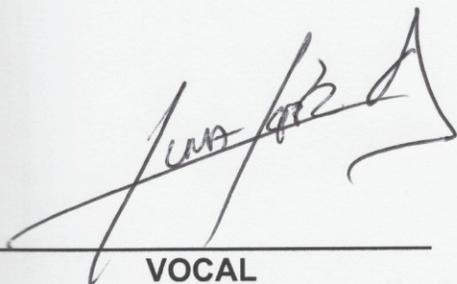
PRESIDENTE

Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



SECRETARIO

Dr. Salvador Uribe Carvajal
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México



VOCAL

Dr. Armando Luna López
Instituto de Geriátría
México, D.F



VOCAL

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruíz.
Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
México, D.F
mcgr@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz
Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
México, D.F
legq@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Salvador Uribe Carvajal
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México.
México, D.F
suribe@ifc.unam.mx

AGRADECIMIENTOS

A mi casa de estudios la **Universidad Autónoma Metropolitana** por brindarme la oportunidad de seguir creciendo y desarrollándome como profesionalista y de la cual es un orgullo pertenecer.

A la Dra. Conchita por la oportunidad que me dio al formar parte de su grupo de investigación, por su apoyo y sus sabios consejos en las decisiones difíciles, tanto en lo profesional como en lo personal.

Al Dr. Luis por darme parte de su tiempo para explicarme y guiarme. Gracias por enseñarme que la ciencia no siempre es de color de rosa.

Al Dr. Salvador por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir su conocimiento en la realización de este proyecto. Gracias por su asesoría y por su infinita paciencia ante mi inconsistencia.

Al Dr. Armando no sólo por ser parte del jurado, si no también por tus consejos, tu apoyo y el ánimo que me brindaste desde los inicios de este trabajo.

A la Dra. Mina por aceptar ser parte del jurado y por todas las correcciones, sugerencias y consejos que me dio para esta tesis.

A todas las personas que forman parte del Laboratorio de Fisiología Celular. A las Dras. Vero, Lety y Rox por su calidez y buena disposición. A Arturo y Alberto por compartir su conocimiento e ideas. Pero especialmente a Patito, Ely, Soraya y Oscar que me brindaron amistad, muchas risas y buenos momentos.

A las “Science Spice Girls”, Natalia y Cristina por su apoyo, sus consejos, y su valiosa amistad, simplemente este mundo seria más feo sin ustedes.

A mis grandes amigos ajenos al laboratorio, Jessi, Jasso, Robert, Lu, Rafles, Doñis, todo mi agradecimiento y cariño. Y que siga la fiesta!!!

A la familia que uno elige, Denise, Karina, Osa y Jorge, porque con su apoyo incondicional me ha dado la fortaleza para continuar mi trabajo y cumplir mis objetivos.....porque sé que los lazos que nos unen van mas allá de la sangre.....gracias por ser mis amigos. Los quiero!!!

A todos aquellos que por falta de memoria...y también por falta de espacio, más no de cariño no están mencionados.

A LA MEMORIA DE MI MADRE

Crísanta Pérez Blancas

1944-2014



DEDICATORIAS

A mi hija **Erika**, que me acompañó en esta loca aventura que significó el doctorado y que, de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos. A ti mi vida, quien has sido mi mayor motivación, mi fuerza y mi fuente de inspiración.

A mi **padre**, por haber fomentado en mí el deseo de superación. Porque aunque no siempre compartimos las mismas ideas, la aceptación y la tolerancia han distinguido nuestra relación. Agradezco a él y a mi madre todo su apoyo, sus consejos, gracias a su ayuda he logrado mis metas y objetivos en la vida.

A mis hermanos, **José, Karina, Miguel y Armando**, gracias por los sueños, las risas y las lágrimas compartidas; y por enseñarme a no rendirme cuando todo va mal, sin su apoyo y su cariño no habría entendido que hay que seguir adelante aún cuando nuestra gran guía de vida ya no esta presente.

A mi **familia**: ti@s, prim@s, sobrin@s y cuñad@s, por sus palabras de aliento y su apoyo incondicional.

A mi **nueva familia**, Martha, Janis, Gael y Sebas, por el cariño, los consejos y por todos los momentos felices que hemos hecho, y los que faltan por construir.

Por último, pero no por ello menos importante, a ti **Eduardo**, por tu amor incondicional y tu inagotable paciencia. Por alentarme a seguir todos mis sueños, por guiarme y mostrarme una forma diferente de vivir. Allíyo, simplemente “no puedo expresar lo mucho que te agradezco nuestro pequeño infinito”.

*“Quien no haya experimentado la irresistible
atracción de la ciencia no podrá comprender su tiranía.”
Frankenstein. Mary Shelley*

RESUMEN.

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD) es el padecimiento hepático crónico más común en todo el mundo que afecta entre el 25 y 30 % de la población general. La sobrecarga de colesterol en el hígado ha mostrado efectos tóxicos mediante la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y por tanto como consecuencia, la inducción en la progresión de la NAFLD a esteatohepatitis (NASH). Recientemente se han realizado importantes avances que han permitido una mejor comprensión sobre la patogénesis en NAFLD, en donde resalta su asociación con la sobreproducción de ERO y la disfunción mitocondrial como una de las principales causas de daño hepatocelular. Sin embargo, el mecanismo de daño es complejo y multifactorial; por ello, el primer objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la sobrecarga de colesterol sobre la función mitocondrial y la producción de ERO. En el presente trabajo hemos alimentado a ratones con una dieta hipercolesterolémica (HC, 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio). Posteriormente fueron sacrificados para estudios histológicos o fueron perfundidos para obtener hepatocitos. Los hígados de los ratones alimentados con la dieta hipercolesterolémica presentaron una acumulación de lípidos, además de daño hepático, evaluado por un incremento de los marcadores séricos (ALT, AST y ALP). La histología reveló hiperplasia e hiperpigmentación de núcleos en los hepatocitos y la pérdida de la arquitectura hepática. La dieta elevada de colesterol indujo un aumento en la generación de ERO y la oxidación de proteínas; aun cuando las proteínas de la mitocondria se observaron menos oxidadas y las enzimas antioxidantes mitocondriales se encontraron elevadas. La sobrecarga de colesterol

indujo un cambio morfológico, la disminución en la síntesis de ATP y el desacoplamiento de la mitocondria. Los hígados de los ratones alimentados con la dieta hipercolesterolémica presentaron una inhibición de la mitofagia y de la apoptosis, y un aumento de la activación de STAT3 y sus genes blanco como mecanismo de resistencia a la muerte celular. Por otro lado se ha demostrado que el control del estado redox celular y/o el estrés oxidante, previene la progresión del daño hepático. Nuestro grupo ha demostrado que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) induce una respuesta antioxidante en las células hepáticas. Por ello, el segundo objetivo fue determinar el efecto protector de este factor de crecimiento en los hepatocitos sobrecargados de colesterol. Las concentraciones de HGF en suero y la expresión de c-Met disminuyeron en los ratones alimentados con la dieta HC. La acumulación de lípidos (lípidos neutros y colesterol libre) se conservó en el cultivo primario de hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta alta en colesterol. La dieta HC indujo un incremento de las ERO y de la oxidación de proteínas comparadas con las células control. Sin embargo, este incremento de ERO y oxidación proteica es revertida por el HGF en los hepatocitos HC en función al tiempo. La expresión y actividad de catalasa se ve disminuida en un 50% en los hepatocitos HC con respecto a los hepatocitos control a las 24 h de tratamiento con HGF. Los hepatocitos del ratón HC presentaron un incremento en las enzimas antioxidantes (γ -GCS, G6PD, MGST, GPx) con respecto a los controles y al ser tratados con el HGF, se ve potenciado el efecto en todos los casos a partir de las 12 h. Por último los datos muestran que HGF induce la biosíntesis de GSH, al observar un incremento en el cociente GSH/GSSG a las 12 h de exposición con HGF.

ABSTRACT.

NAFLD is the most common chronic liver disease worldwide, affecting between 25 and 30% of people. The cholesterol overloading in the liver has a toxic effect mainly mediated by ROS generation and is involved in the induction and progression from NAFLD through NASH. Recently, major advance in understanding the NAFLD pathogenesis, have shown that ROS and mitochondrial impairment are engaged as principals causes of hepatocellular damage. Nonetheless, the mechanism by which NAFLD promote NASH is complex and multifactorial. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of cholesterol overloading in mitochondrial function and ROS production. In the present work we fed mice with a hypercholesterolemic diet (HC, 2% cholesterol and 0.5% sodium cholate). After that, we proceeded to sacrifice animals in order to obtain liver tissue, parallel animals were subjected to liver perfusion to obtain hepatocytes. Livers from HC animals exhibited an steatotic phenotype, and main liver function tester were increased such as ALT, AST and ALP. Liver histology presented lost in architecture and picnotic nuclei. HC diet present an increase in ROS, protein oxidation and in the content of main antioxidant proteins, in comparison with Chow diet fed animals. Interestingly, mitochondria proteins were not significantly oxidized. Liver tissue from HC animals presented inhibition of autophagy and apoptosis, and an increment in the activation of Stat3 suggesting a survival response. Our group has shown that HGF can display an antioxidant response in hepatic cells, for this reason we also were focused to figure out the protective role of HGF in cholesterol overloaded hepatocytes. Isolated hepatocytes showed an overload of free cholesterol and neutral

lipids that was related to oxidative stress and protein oxidation versus control hepatocytes, this effect was reverted by HGF treatment in a time dependent manner. The expression and activity of catalase was diminished 50% in comparison with Chow hepatocytes, however, γ -GCS, G6PD, MGST, and GPx were significantly increased when cells were treated with HGF for 12h. Finally, the data show that HGF induced the biosynthesis of GSH due to the ratio GSH/GSSG at 12h of treatment was significantly elevated.

ÍNDICE.

RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABLAS	XV
ABREVIATURAS	XVI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Generalidades de la NAFLD	1
I.1.a) Prevalencia.....	2
I.1.b) Diagnóstico.....	2
I.1.c) Etiología.....	3
I.1.d) Características histológicas	4
I.2 NAFLD y la homeostasis lipídica en el hígado	5
I.3 Lipotoxicidad y daño hepatocelular	6
I.3.a) Hipercolesterolemia.....	8
I.3.b) Estrés oxidante.....	10
I.3.c) Sistemas antioxidantes.....	11
I.4 Mitocondria como organelo blanco de la NAFLD	15
I.4.a) Generalidades de las mitocondrias	15
I.4.b) Dinámica mitocondrial	17
I.4.c) Biogénesis mitocondrial y mitofagia	22
I.4.d) Apoptosis.....	26
I.5 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en el control del daño por estrés oxidante	31
I.5.a) Generalidades HGF y c-Met.....	32
I.5.b) HGF/c-Met y NAFLD	35
II. JUSTIFICACIÓN.....	36
III. HIPÓTESIS	37

IV. OBJETIVOS	37
IV.1 Objetivo general	37
IV.2 Objetivos particulares	37
V. MATERIAL Y MÉTODOS	38
V.1 Diseño Experimental	38
V.2 Cociente peso hígado/ peso ratón	40
V.3 Análisis macroscópico e histológico	40
V.4 Pruebas de daño y función hepática	41
V.5 Cultivo primario de hepatocitos y viabilidad celular.....	42
V.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	43
V.6.a) In situ	43
V.6.b) En cultivo primario	43
V.7 Determinación de lípidos en tejido hepático y hepatocitos	44
V.7.a) Determinación de triglicéridos en tejido hepático	44
V.7.b) Determinación de colesterol total en tejido hepático	45
V.7.c) Detección de lípidos neutros en cultivo primario.....	45
V.7.d) Detección de colesterol libre en cultivo primario.....	46
V.8 Obtención de homogenado de tejido hepático, cultivo primario de hepatocitos o fracciones ricas en mitocondrias	46
V.8.a) Homogenado celular de tejido hepático o cultivo primario	46
V.8.b) Obtención de fracciones ricas en mitocondrias	47
V.9 Extracción y cuantificación de proteína total y mitocondrial.....	47
V.10 Electroforesis de proteínas y Western Blot	48
V.11 Determinación de proteínas oxidadas	49
V.12 Determinación de colesterol total en mitocondrias.....	51
V.13 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	51
V.14 Potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	52
V.14.a) En cultivo primario	52
V.14.b) En fracciones ricas en mitocondrias	52
V.15 Determinación de ATP	53

V.16 Actividad de caspasa 3	53
V.17 Determinación de HGF en suero.....	54
V.18 Inmunodetección de c-Met	54
V.19 Determinación de las actividades enzimáticas.....	55
V.19.a) Actividad de la Catalasa	56
V.19.b) Actividad de la Superóxido Dismutasa total.....	56
V.20 Determinación de GSH/GSSG por HPLC	57
V.21 Análisis estadístico	58
VI. RESULTADOS.....	58
VI.1 La ingesta elevada de colesterol induce la acumulación de lípidos y daño hepático	58
VI.2 La sobrecarga de colesterol induce estrés oxidante	63
VI.3 El incremento en el colesterol produce pérdida del balance energético, cambios morfológicos y biogénesis mitocondrial	66
VI.4 La sobrecarga de lípidos inhibe la apoptosis vía la activación del factor transductor de señal y activador de transcripción (STAT3).....	72
VI.5 La acumulación de lípidos en el hígado disminuye el contenido de c-Met en membrana plasmática y la concentración de HGF en el suero	74
VI.6 HGF disminuye el contenido de las ERO en los hepatocitos de HC mediante el aumento de sistema antioxidante de GSH	77
VII. DISCUSIÓN.....	81
VIII. CONCLUSIONES.....	95
IX. REFERENCIAS.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Mecanismo de acumulación de lípidos en el hígado	7
Figura 2.	Regulación del GSH intrahepático.	14
Figura 3.	Dinámica mitocondrial.	21
Figura 4.	Biogénesis mitocondrial dependiente de PGC-1 α	24
Figura 5.	Eventos moleculares que conducen a mitofagia de las mitocondrias disfuncionales.	27
Figura 6.	Apoptosis vía mitocondria.	31
Figura 7.	Principales rutas de señalización inducidas por HGF/c-Met.	34
Figura 8.	Diseño experimental ratones alimentados con la dieta HC y dieta control por 30 días.	39
Figura 9.	Diseño experimental ratones alimentados con la dieta HC y dieta control por 2 días.	40
Figura 10	La dieta HC genera cambios morfológicos y un incremento en el peso del hígado.	59
Figura 11	La sobrecarga de colesterol induce daño tisular en el hígado.	60
Figura 12.	La dieta aterogénica induce la acumulación de lípidos.	61
Figura 13.	La acumulación de lípidos induce disminución en la viabilidad de los hepatocitos.	62
Figura 14.	La acumulación de lípidos inducidos por la dieta HC produce daño hepático.	63
Figura 15.	La sobrecarga de colesterol induce un incremento de las ERO.	64
Figura 16.	Expresión de proteínas antioxidantes y citoprotectoras.	65
Figura 17.	La dieta HC tiene un efecto dual sobre la oxidación proteica.	66
Figura 18.	La dieta HC incrementa el colesterol en las mitocondrias.	67

Figura 19. La acumulación de colesterol mitocondrial compromete energéticamente a las mitocondrias.	68
Figura 20. Determinación del contenido de proteínas relacionadas con la mitofagia.	70
Figura 21. La sobrecarga de colesterol induce cambios morfológicos en las mitocondrias.	71
Figura 22. La dieta HC induce fisión y biogénesis mitocondrial.	72
Figura 23. La sobrecarga de colesterol inhibe la apoptosis en el hígado.	73
Figura 24. La acumulación de colesterol induce la activación de Stat 3 en serina 727 y aumenta la expresión de sus genes blanco.	74
Figura 25. La sobrecarga de colesterol afecta los niveles de HGF y la expresión de c-Met.	76
Figura 26. La ingesta de dos días de la dieta HC incrementa el contenido lipídico y el estrés oxidante en los hepatocitos.	76
Figura 27. HGF disminuye el estrés oxidante inducido por la sobrecarga de colesterol.	77
Figura 28. Efecto del HGF sobre la expresión y la actividad de SOD1 y catalasa.	79
Figura 29. Efecto del HGF sobre el cociente de GSH/GSSG y las enzimas involucradas en el sistema de GSH.	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos empleados en Western blot.	50
--	----

ABREVIATURAS.

ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

Bcl-2: por sus siglas en inglés b-cell leukemia/lymphoma 2 protein, proteína 2 de la leucemia/linfoma de células β .

Bcl-X_L: por sus siglas en inglés BCL2- extra large, proteína relacionada con Bcl-2 de cadena larga.

Bax: por sus siglas en inglés BCL2-Associated X Protein, proteína X asociada a BCL2.

c-Met: por sus siglas en inglés cellular mesenchymal transition, transición mesenquimal celular.

Drp1: por sus siglas en inglés Dinamin 1-like, Proteína relacionada con la dinamina-1.

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno.

FA: por sus siglas en inglés Fatty Acid, ácido graso.

FFA: por sus siglas en inglés Free Fatty Acid, ácido graso libre.

G6PD: glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

Gpx: glutatión peroxidasa.

Gpx1: glutatión peroxidasa 1.

Gpx4: glutatión peroxidasa 4.

GST: glutatión transferasa.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HGF: por sus siglas en inglés Hepatocyte Growth Factor, factor de crecimiento de hepatocitos.

LC3: microtúbulo asociado a la proteína ligera 3.

Mfn1: mitofusina 1.

Mfn2: mitofusina 2.

mGSH: glutatión mitocondrial.

MOM: por sus siglas en inglés Mitochondrial Outer Membrane, membrana mitocondrial externa.

MIM: por sus siglas en inglés Mitochondrial Inner Membrane, membrana mitocondrial interna.

NAFLD: por sus siglas en inglés Non-Alcoholic Liver Disease, Enfermedad del hígado graso no alcohólico.

NASH: por sus siglas en inglés Non-Alcoholic Steatohepatitis, Esteatohepatitis no alcohólica.

NEFA: por sus siglas en inglés Non Esterified Fatty Acids ácido graso no esterificado.

O₂•: radical anión superóxido.

•OH: radical hidroxilo.

Opa 1: por sus siglas en inglés optic atrophy 1, atrofia óptica 1.

p62/SQSTM1: secuestrosoma 1.

PGC-1 α : por sus siglas en inglés Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha, coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas.

PINK-1: por sus siglas en inglés PTEN-inducible putative kinase 1, Cinasa putativa inducida por PTEN.

SOD1: superóxido dismutasa 1.

SOD2: superóxido dismutasa 2.

STAT3: por sus siglas en inglés signal transducer and activator of transcription 3, factor transductor de señal y activador de transcripción.

TG: Triglicéridos.

I. INTRODUCCIÓN.

En México, las enfermedades hepáticas, tanto agudas como crónicas, representan actualmente una de las principales causas de mortalidad, habiéndose reportado como la quinta causa de defunción con base en datos de la Secretaría de Salud y del INEGI en 2010. Hoy en día, el estilo de vida del mexicano está caracterizado por un alto consumo de grasas y una actividad física reducida, lo cual ha disparado la incidencia de un conjunto de patologías metabólicas entre las que se incluyen la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), la aterosclerosis y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Perichart-Perera *et. al.*, 2010).

1.1 Generalidades de la NAFLD.

La esteatosis no alcohólica o hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés, *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) fue descrita por Ludwig *et. al.*, en 1980 como un patrón morfológico de lesión hepática en pacientes principalmente con obesidad, diabetes mellitus, y en los cuales no existe antecedente de consumo y/o abuso de alcohol, pero que histológicamente muestra cambios similares a los que se observan en la esteatosis alcohólica (Ludwig *et. al.*, 1980).

En la actualidad, la NAFLD se define como la infiltración de grasa en más del 5% de los hepatocitos en ausencia de una ingesta crónica de alcohol y se caracteriza por un amplio espectro de lesiones histopatológicas en el hígado, que van desde la esteatosis simple, en su forma más benigna, hasta la esteatohepatitis (NASH) con estadios variables de fibrosis que puede progresar hasta cirrosis e incluso hepatocarcinoma (Abd El-Kader *et. al.*, 2015).

La NAFLD ha incrementado su prevalencia en los últimos tiempos debido al cambio en el estilo de vida, en el que ha disminuido la actividad física aunado a un aumento en el aporte calórico de la dieta, principalmente alto en lípidos, en todo el mundo, por lo que actualmente se considera a esta enfermedad metabólica del hígado, la epidemia del siglo XXI.

1.1.a) Prevalencia.

La NAFLD es la forma más común de las enfermedades hepáticas en el mundo occidental tanto en adultos, como en niños. Constituye probablemente la tercera causa de enfermedad hepática, en conjunto con la hepatopatía alcohólica y el virus de la hepatitis C. La prevalencia en la población occidental general se estima entre un 20 a un 30%. Entre las personas obesas la prevalencia supera el 75% (Musso *et. al.*, 2010). La NAFLD solía ser una enfermedad exclusiva de adultos, sin embargo actualmente la prevalencia en niños es del 3% en general y del 23-53% en los niños obesos (Angulo *et. al.*, 2002, Nanda, 2004). Por otro lado, se considera que la etnicidad y los factores genéticos contribuyen a su desarrollo, encontrando un valor del 45% entre la población hispánica (Browning *et. al.*, 2004).

1.1.b) Diagnóstico.

Los pacientes con NAFLD permanecen asintomáticos la mayor parte del tiempo, sin embargo la hipertransaminasemia, es decir la elevación crónica leve-moderada de las transaminasas, suele ser indicio para el diagnóstico de la enfermedad debido a que la mayoría (50-90%) de los pacientes con NAFLD presenta una elevación en la

actividad sérica de las transaminasas como la alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y otras enzimas como la fosfatasa alcalina (ALP) y γ -glutamil transpeptidasa (GGT), entre otras (Chen et al., 2008). Aunque la hipertransaminasemia no es un parámetro bioquímico específico de la NAFLD, la presencia de hepatomegalia y aumento de éstas pueden ser un signo de presencia de la enfermedad.

Aunque el diagnóstico de la NAFLD se puede hacer mediante ecografía, tomografía computarizada o resonancia magnética, la prueba ideal de diagnóstico es la biopsia hepática ya que este método puede determinar el grado de inflamación y fibrosis, incluso puede discernir entre NAFLD y NASH. Sin embargo estudios recientes confirman que la ecografía sería la mejor técnica de imagen en la práctica clínica para la evaluación del estado hepático, por ser segura, no invasiva y de bajo costo (Hamaguchi *et. al.*, 2012, Shannon *et. al.*, 2011).

1.1.c) Etiología.

A la fecha, en la mayoría de los casos, el origen primario de esta patología no está totalmente comprendido, sin embargo, la NAFLD se ha asociado a múltiples factores etiológicos, como la obesidad, la resistencia a la insulina, desórdenes metabólicos de los lípidos, incluyendo hipertrigliceridemia y/o hipercolesterolemia. Algunas de las causas secundarias pueden ser por tratamientos antirretrovirales, procedimientos quirúrgicos (ej. derivación biliopancreática), nutricionales, embarazo, metabólicas (ej. lipodistrofias) y las inducidas por la ingesta de ciertos fármacos (ej.

glucocorticoides) y otros tóxicos. Pero es la obesidad el factor que se asocia con mayor frecuencia y su prevalencia parece asociarse con el grado de obesidad.

Un modelo interesante que explicaría la progresión del daño una vez que se tiene esteatosis o hígado graso es el que se conoce como el de “las dos agresiones”. La primera agresión consiste en la acumulación de exceso de grasa y es requisito para que se desarrolle daño en el hígado. La grasa en el hígado favorece o vuelve al hígado vulnerable para segundas agresiones que llevan al daño de los hepatocitos, la inflamación y la fibrosis (Machado *et. al.*, 2016).

1.1.d) Características histológicas.

La principal característica histológica de la NAFLD es la acumulación de grasa, fundamentalmente triglicéridos (TG), en forma de gotas grandes (macrovesículas) que se encuentran en el citoplasma dentro de los hepatocitos causando desplazamiento del núcleo a la periferia. La esteatosis macrovesicular en la NAFLD es fácilmente reconocida con técnicas de tinción, como con hematoxilina-eosina y no suele requerir una tinción especial para la detección de los lípidos. En algunos casos se puede presentar una mezcla de esteatosis macro y microvesicular. En la esteatosis simple, se puede observar que los hepatocitos afectados son usualmente más grandes que los otros. Asimismo, se observa un leve infiltrado inflamatorio lobulillar y/o portal, sin que existan signos de daño hepatocelular, ni fibrosis (Brunt *et. al.*, 2010). Cuando la NAFLD progresa a NASH histológicamente se puede apreciar además de la presencia de esteatosis, el daño hepatocelular (degeneración

balonizante, apoptosis o necrosis), la infiltración inflamatoria lobulillar (Brunt *et. al.*, 2010, Schwimmer *et. al.*, 2005).

1.2 NAFLD y la homeostasis lipídica en el hígado.

En la primera etapa de la esteatosis, la combinación de factores genéticos y adquiridos contribuye a la acumulación en exceso de triglicéridos (TG) y ácidos grasos (FA) en el hígado. Los mecanismos que potencialmente contribuyen a la acumulación de grasa en el parénquima hepático es por un elevado flujo de los ácidos grasos no esterificados (NEFAs) hacia el hígado, un aumento en la lipogénesis hepática de novo (DNL), una disminución de la beta-oxidación de los FFA y la alteración en la incorporación de los TG en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) o en la secreción de dichas lipoproteínas (Machado *et. al.*, 2016).

La homeostasis lipídica requiere de interacciones metabólicas coordinadas entre el hígado, el músculo y el tejido adiposo, controladas en gran medida, por la acción reguladora de la insulina. Los pacientes con NAFLD exhiben una disminución en la sensibilidad a la insulina y reportan evidencia de resistencia a la insulina (IR) en músculo, tejido adiposo blanco e hígado (Utzschneider *et. al.*, 2006), considerando el mal funcionamiento de la insulina periférica como un factor clave para la acumulación de TG en el hepatocito y que la acción alterada de esta hormona conduce a la liberación de NEFAs del tejido adiposo resultando en un aumento del flujo de FA hacia el hígado (Svegliati-Baroni *et. al.*, 2006).

La hiperinsulinemia asociada a la IR provoca un descenso en la síntesis de Apolipoproteína B-100 (ApoB), un componente crítico de las VLDLs, lo cual

disminuye la salida de TG de la célula y favorece su acumulación en el hígado (Meshkani *et. al.*, 2009). En ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, se observó que la homeostasis de lípidos hepáticos se encuentra alterada debido al aumento de la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis de FA (Xu *et. al.*, 2004). Por otro lado, la hiperinsulinemia y el aumento de la producción de glucosa, que se producen como consecuencia de la IR, inducen la expresión de la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) y de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP), respectivamente, que a su vez activan la transcripción de la mayoría de los genes que participan en la síntesis de novo de FA en el hígado (Fig.1) (Farrell *et. al.*, 2012, Machado *et. al.*, 2016).

En condiciones normales, el hígado es el órgano encargado del mantener el balance entre la lipogénesis y la degradación de FA, pero en la NAFLD, esta homeostasis lipídica se ve alterada. Fisiológicamente los FFA intrahepáticos son oxidados para producir ATP o esterificados a TG e incorporados a las VLDLs para exportar el colesterol fuera del hígado, pero en la NAFLD hay un exceso de FA, y los TG formados se almacenan en el interior del hepatocito en forma de vesículas lipídicas, dando lugar a la esteatosis (Machado *et. al.*, 2016).

1.3 Lipotoxicidad y daño hepatocelular.

Los hepatocitos no son células diseñadas para almacenamiento de lípidos, por lo que el desarrollo de la NAFLD está asociado con la disfunción celular y la apoptosis. Este fenómeno se conoce como lipotoxicidad, un término utilizado para definir el daño y muerte celular causado por el incremento de lípidos como el colesterol, los

TG y los FFA y sus metabolitos; y se considera que juega un papel relevante en la patogénesis del daño hepático (Neuschwander-Tetri, 2010).

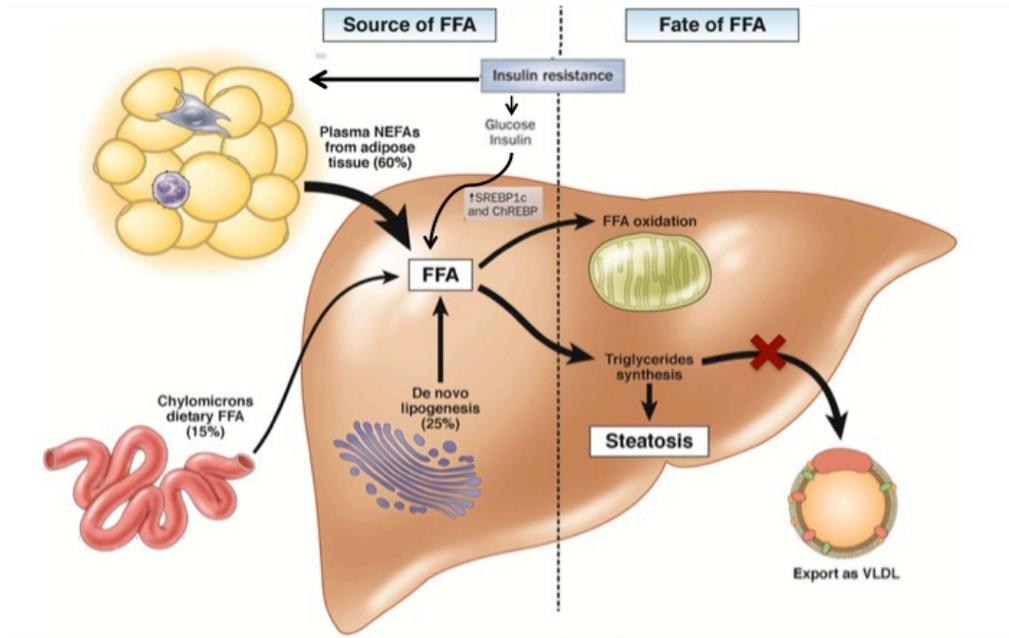


Figura 1. Mecanismo de acumulación de lípidos en el hígado. NEFAs: ácidos grasos no esterificados; FFA: ácidos grasos libres; SREBP1c: proteína de unión al elemento regulador de esteroides; ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad. Figura adaptada de Machado M. V. y Diehl A. M. Gastroenterology, 2016.

Como anteriormente se mencionó, en la NAFLD hay un incremento de la toma y síntesis de FFA derivados del tejido adiposo por contribución de la IR y una exportación inadecuada de los TG por una disminución en la tasa de secreción de VLDL, estos procesos son los responsables de una acumulación de FFA en la esteatosis (Fabbrini *et. al.*, 2008). El daño hepatocelular se da a través de un incremento en el estrés oxidante, por la acumulación de FFA (Trauner *et. al.*, 2010b). De los FFA existentes, se ha encontrado que los saturados son más hepatotóxicos que los insaturados. Esta diferencia de toxicidad se considera que está relacionada

con la capacidad que tienen los FFA insaturados a ser más fácilmente esterificados en TG (Guturu *et. al.*, 2012). Los FFA más abundantes en pacientes con NASH incluyen al ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1), mientras que este último promueve la esteatosis, el primero, de forma similar a otros ácidos grasos saturados, favorece la lipoapoptosis y la inflamación mediada por cinasa N-terminal c-Jun (JNK) (Farrell *et. al.*, 2012).

Aunque se consideró por mucho tiempo a la acumulación de TG en los hepatocitos como causa de la lesión hepática, Yamaguchi *et. al.* (2007) postularon que el incremento de TG puede ser un mecanismo de adaptación y protección para evitar la progresión del daño hepático en la NAFLD, al menos en ratones con esteatohepatitis inducidos con una dieta deficiente en metionina y colina (MCD). En este estudio se reportó que la inhibición de la acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), enzima limitante de la síntesis de TG, reduce la acumulación de TG e incrementa el estrés oxidante, la inflamación y la muerte celular. Por otro lado Marí *et al* 2006, reporta que ratas alimentadas con la dieta MCD son menos susceptibles al daño hepático inducido por TNF- α en comparación con una dieta alta en colesterol. Mientras que en la literatura se asume que la NAFLD es el resultado de la acumulación de FFA, es importante reconocer el potencial de otros lípidos, como el colesterol.

1.3.a) Hipercolesterolemia.

La hipercolesterolemia es el factor que mayor riesgo representa para las enfermedades cardiovasculares, y se ha correlacionado positivamente con la

incidencia y mortalidad de la enfermedad coronaria, sin embargo hasta hace algunos años, su contribución específica en la progresión del daño hepático había sido poco estudiada. De hecho, había pocos estudios que demostraban una asociación entre una ingesta alta de colesterol y grasas con la NAFLD y la inflamación (Farrell *et. al.*, 2012, Simonen *et. al.*, 2011, Wang *et. al.*, 2008). Hay reportes en la literatura que muestran que ratas sometidas a una dieta enriquecida con colesterol (4%) incrementan a nivel hepático 20 veces el contenido de este lípido y 3 veces el contenido de TG (Wang *et. al.*, 2008). Sumiyoshi *et. al.* (2010) reportaron que una exposición a lipoproteínas de baja densidad (LDL), induce daño celular y tisular y que la ingesta de una dieta rica en colesterol (1.5%) de forma crónica produce hipercolesterolemia, hiperplasia nodular focal y una fibrosis severa (Sumiyoshi *et. al.*, 2010).

El grupo del Dr. Fernández-Checa ha realizado varias aportaciones para el esclarecimiento del efecto del colesterol libre en el hígado. En 2006 demostraron que el tipo de lípido, más que la cantidad del mismo, es el que determina la susceptibilidad del hígado graso a progresar a NASH. Los resultados muestran que el colesterol libre, pero no los ácidos grasos libres FFA o los TG, es clave en la sensibilización del hígado, su acumulación afecta principalmente a la mitocondria sensibilizando a los hepatocitos a una segunda agresión mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando de muerte Fas, así como el papel fundamental que juega el glutatión mitocondrial (mGSH) (Marí *et. al.*, 2006). Dos años más tarde, el mismo grupo reportó que el colesterol mitocondrial le confiere a células de

hepatocarcinoma resistencia a la quimioterapia por un mecanismo dependiente de la dinámica mitocondrial (Montero *et. al.*, 2008). Y en el año pasado Baulies *et. al.*, reporta que la acumulación de colesterol en lisosomas sensibiliza al hígado al daño hepatotóxico por acetaminofén por una desregulación de la dinámica mitocondrial (Baulies *et. al.*, 2015).

1.3.b) Estrés oxidante.

Se ha demostrado que en muchas enfermedades hepáticas las especies reactivas de oxígeno (ERO) están involucradas tanto en los mecanismos de inicio, como de progresión del daño. Estas juegan un papel fundamental en el mantenimiento fisiológico de la célula y por ende de toda la economía de los seres vivos. Las ERO pueden ser generadas en el hígado a través de mecanismos que involucran la mitocondria, los peroxisomas, los citocromos, las NADPH oxidasas, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa o un exceso de Fe (Mari *et. al.*, 2010). Las ERO son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada, entre las ERO se encuentran los iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos. Cuando el equilibrio entre la formación ERO y el sistema antioxidante se pierde, se produce lo que se llama estrés oxidante.

El estrés oxidante ha sido reconocido como el mecanismo clave responsable de la progresión del daño en la NAFLD. La lipoperoxidación es una de las consecuencias del daño oxidante, y se ha demostrado que la presentan tanto pacientes como modelos animales de NAFLD. El grupo de Ojetti ha demostrado que la esteatosis hepática, independientemente de su causa, se asocia con peroxidación

lipídica, y sugieren que la lipoperoxidación constituye el mecanismo por el que se desarrolla esteatohepatitis (Ponziani *et. al.*, 2015).

Como ya se ha mencionado, mientras que la IR, DNL, y la acumulación de lípidos son decisivos en el desarrollo de la NAFLD, el hígado es el órgano encargado de la detoxificación de FFA, sin embargo en un hígado con esteatosis hay un exceso de FFA, y el aumento de β -oxidación que conduce al incremento en la entrega de electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC) causando alteraciones mitocondriales y la formación de ERO. Desafortunadamente, este incremento de la β -oxidación mitocondrial es insuficiente para la eliminación del exceso de FFA y se acompaña de una disfunción en la ETC que da lugar a un aumento de la generación de ERO.

En un hígado con esteatosis y mitocondrias disfuncionales una proporción considerable de los FFA es procesada por los sistemas peroxisomales y microsomales (Perez-Carreras *et. al.*, 2003). Los peroxisomas llevan a cabo varios ciclos de β oxidación para acortar cadenas largas de los ácidos grasos, los ácidos dicarboxílicos, los eicosanoides, etc. La oxidación microsomal está bajo el control del sistema enzimático citocromo P450, este reduce al oxígeno molecular para producir especies pro-oxidantes, las cuales, si no hay un sistema antioxidante eficiente, provocan estrés oxidante (Mari *et. al.*, 2010, Robertson *et. al.*, 2001).

1.3.c) Sistemas antioxidantes.

Para compensar los niveles de ERO, existen varios mecanismos para neutralizarlos ya que se producen en pequeñas cantidades continuamente en el

metabolismo de lípidos. Las células disponen de sistemas enzimáticos y los no enzimáticos.

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

Posteriormente el H_2O_2 es convertido en agua por dos enzimas con la capacidad de degradar al peróxido como la catalasa y las glutatión peroxidasas (Gpx's). Estas enzimas con actividad de peroxidasas actúan dependiendo los niveles H_2O_2 presentes (Inoue, 2009). Las Gpx's se encargan de eliminar el H_2O_2 formado por la SOD, existen ocho isoformas en mamíferos y todas ellas contienen selenio en su centro activo. Para la eliminación del H_2O_2 , las Gpx's emplean dos moléculas de glutatión (GSH), lo que a su vez genera al GSSG (Arthur, 2000, Brigelius-Flohe *et. al.*, 2013). Entre las Gpx's se destaca la Gpx-4 la cual repara la oxidación de lípidos mediante la conversión de lipoperóxidos en lípidos menos tóxicos (Cole-Ezea *et. al.*, 2012, Mari *et. al.*, 2010).

Además de las enzimas antioxidantes existe una segunda línea de defensa compuesta por secuestradores no enzimáticos, que actúan sobre los radicales libres

residuales que escapan a las enzimas antioxidantes como el GSH. El GSH es sintetizado en el citosol a partir de glutamato, cisteína y glicina en dos pasos enzimáticos y dependientes de ATP catalizados por la γ -glutamilcisteinsintetasa (γ -GCS) y glutatión sintetasa (GS). El GSH es un tripéptido que existe en altas concentraciones (del rango de nanomoles) en todas las células. Si bien es muy abundante en la célula, no está bien distribuido en sus organelos, ya que del 80-85% se encuentra en citosol, el 10% en mitocondria y el resto posiblemente en el retículo endoplasmático y en núcleo, siendo considerado el mGSH más importante para la supervivencia celular debido a que este organelo es blanco de ataque en el daño y al no sintetizarlo de novo, requiere de su transportación hacia el interior de la mitocondria (Fernandez-Checa *et. al.*, 2005, Mari *et. al.*, 2010).

Entre las funciones que se le han asignado al GSH en el interior de la célula se pueden destacar: 1) De cofactor de varias enzimas de destoxificación contra estrés oxidante, como por ejemplo la glutatión transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico por la reducción del GSH en los compuestos polares que contienen un carbono electrofílico, nitrógeno, o azufre, entre otras (Hayes *et al.*, 2005). Una vez realizada la catálisis, la GST se conjuga con fármacos o xenobióticos, esta acción facilita la exportación de medicamentos y xenobióticos a través de la familia de proteínas de resistencia a múltiples drogas (MRP). 2) Como atrapador de radicales como el $\cdot\text{OH}$, y de destoxificador del H_2O_2 y los peróxidos lipídicos por la acción catalítica de Gpx4. 3) La participación en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática. 4) De regenerador de otros antioxidantes como la vitamina C

y la vitamina E (Masella et al., 2005). Finalmente el hepatocito exporta al GSH al sinusoide a través del transporte en el plasma o en la bilis a través del transporte del canalículo biliar (Fig. 2).

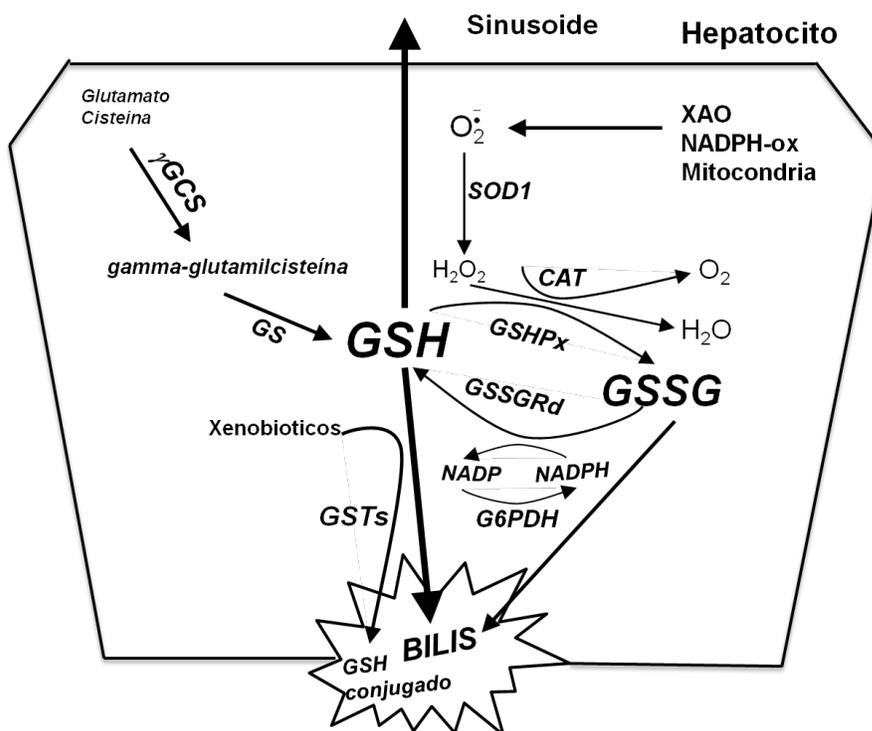


Figura 2. Regulación del GSH intrahepático. GSH: glutatión; γ -GCS: γ -glutamilcisteinsintetasa; GS: glutatión sintetasa; GSTs: glutatión transferasas; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa, GSHPx: glutatión peroxidasa; GSSGRd: glutatión reductasa; NADP: nicotinamida adeninucleótido; NADPH: nicotinamida adeninucleótido reducido; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Figura adaptada de Fernández-Checa J. C. y Kaplowitz N. Toxicol Appl Pharmacol, 2005.

Para definir el estado redox celular se pueden medir los cocientes de importantes moléculas redox tales como $NAD^+/NADH$, $NADP^+/NADPH$ y $GSH/GSSG$, sin embargo lo más común es medir al $GSH/GSSG$. Esta proporción es la más representativa para obtener una estimación del estado redox celular porque la concentración molecular en la célula es mucho más alta que los otros compuestos. Además proporciona una estimación confiable del estado redox celular en las células

y por lo tanto se mide con frecuencia como un indicador de estrés oxidante (Han et al., 2006).

1.4 Mitochondria como organelo blanco de la NAFLD.

La alteración en la función mitocondrial ha sido documentada en variedad de enfermedades crónicas hepáticas, como las hepatitis virales, el daño hepático alcohólico, la colestasis, la hemocromatosis, la enfermedad de Wilson incluyendo la NAFLD (Auger *et. al.*, 2015).

1.4.a) Generalidades de las mitocondrias.

Las mitocondrias juegan el papel principal en el metabolismo oxidativo de biomoléculas y en el mantenimiento de las funciones hepáticas. Éstas ocupan cerca del 18% del volumen total del hepatocito (Kmiec, 2001) ya que este tipo celular requiere de mucha energía para la realización de sus funciones.

La mitocondria posee un sistema de doble membrana: una externa (MOM); que constituye una barrera física que impide la liberación de proteínas apoptóticas y la entrada de solutos relativamente grandes; y una interna (MIM); que es más compleja que la MOM ya que consta de invaginaciones llamadas crestas que no están distribuidas al azar como anteriormente se describía. Las crestas son microcompartimentos con una gran número de enzimas y sistemas de transporte. De las aproximadamente 700 proteínas mitocondriales, 200 están exclusivamente presentes en las mitocondrias hepáticas (Kmiec, 2001, Mannella, 2008).

Las membranas mitocondriales se caracterizan por bajos niveles de ciertos lípidos como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas, los glicolípidos y el colesterol característicos de las membranas de las células eucariotas. Las mitocondrias son organelos pobres en colesterol estimado en 0.5% a 3% del contenido total que se encuentra en las células y representa entre el 7%-11% en comparación con la membrana plasmática (25%-34%) (Horvath *et. al.*, 2013).

En condiciones fisiológicas normales, la β -oxidación mitocondrial es la principal vía de oxidación de los FA para la obtención de energía, por lo que un incremento en el suministro de éstos podría no ser el problema si la vía de eliminación es la apropiada. La β -oxidación previene el daño en el hígado por lipotoxicidad, sin embargo en la NAFLD se asocia con una disfunción mitocondrial y un incremento en la generación de ERO, asociado con la depleción del mGSH que juega un papel en el control del estrés en la mitocondria (Marí *et al.*, 2006).

Está bien documentado en pacientes y modelos de animales con NAFLD, que existen varias rutas alteradas relacionadas al metabolismo de lípidos (Abd El-Kader *et. al.*, 2015, Ibrahim *et. al.*, 2015). El incremento del estrés oxidante y la lipoperoxidación induce un mal funcionamiento de la mitocondria, pues se sabe que el malondialdehído y el trans-4-hidroxi-2-nonenal, dos productos resultantes de la peroxidación lipídica, son capaces de inhibir la actividad de la citocromo c oxidasa de la ETC (Chen *et. al.*, 2000). Por otro lado, los radicales libres pueden lesionar el ADN mitocondrial (ADNmt) y tales lesiones de difícil reparación en las mitocondrias, repercuten sobre la expresión de los complejos de la ETC y esto conllevaría a la

disfunción mitocondrial, que además potencia la formación de ERO (Brand, 2010, Murphy, 2009). Un estudio muestra que la actividad de la ETC está marcadamente disminuida en pacientes con NASH comparados con grupo control (Pessayre *et. al.*, 2005). La disminución de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales, incrementa la expresión de TNF- α , el cual causa una lipoperoxidación adicional en las membranas mitocondriales, empeorando la función mitocondrial, lo cual provoca un incremento de la hepatotoxicidad del TNF- α y la muerte celular (Mari *et. al.*, 2006).

Un rasgo característico de los pacientes con NAFLD es la presencia de alteraciones mitocondriales ultraestructurales, que se traducen en la interrupción del flujo de electrones de la cadena respiratoria y contribuyen a incrementar la producción ERO en los hepatocitos (Byrne *et. al.*, 2009, Ibrahim *et. al.*, 2015). El aumento del tamaño de la mitocondria, conocido como megamitocondria, puede aparecer en la NAFLD (Caldwell *et. al.*, 2009, Farrell *et. al.*, 2012). Caldwell *et. al.* (2004), realizaron un estudio ultraestructural de las megamitocondrias en pacientes con NAFLD, y demostraron inclusiones paracristalinas en 8 de 10 biopsias de NAFLD, comparada con 1 de cada 7 biopsias procedentes de enfermedad hepática alcohólica, en el análisis del estudio ellos especulan que las inclusiones en la mitocondria podrían representar una forma de lesión hepática o un cambio adaptativo (Caldwell *et. al.*, 2004).

1.4.b) Dinámica mitocondrial.

La dinámica mitocondrial ha emergido como la principal vía regulatoria esencial para el buen funcionamiento mitocondrial, tanto en procesos fisiológicos (Chan,

2006) como en condiciones patológicas. El término de dinámica mitocondrial se utiliza para referirse a la regulación, distribución y morfología mitocondrial. La dinámica mitocondrial incluye procesos particulares como la fusión, fisión, biogénesis mitocondrial, mitofagia, y la motilidad de las mitocondrias a lo largo de la célula (Liesa *et. al.*, 2009).

Los principales reguladores de la fusión mitocondrial en el humano son las proteínas GTPasas mitofusinas (Mfn) y la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1). La fusión de las MIM y MOM parece funcionar como dos eventos independientes y separados, debido a que OPA1 y Mfn se encuentran en localizaciones distintas en las mitocondrias y al hecho de que la fusión de la MOM requiere baja concentración de GTP, mientras que la fusión de la MIM requiere de la hidrólisis de GTP, y depende de un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) intacto y, por lo tanto, de una alta síntesis de ATP (Liesa *et. al.*, 2013).

La OPA1 es una proteína residente de la membrana interna de las mitocondrias y es allí donde desempeña sus funciones. Esta proteína es procesada en 8 diferentes isoformas (largas “L” y cortas “S”) y un desbalance entre ellas afectan a la fusión de las mitocondrias (Liesa *et. al.*, 2009), durante la apoptosis, el complejo formado por las isoformas de OPA1 se desasocia promoviendo la apertura de las crestas y la liberación del citocromo c hacia el espacio intermembranal. La OPA1 además de estar asociada con la fusión MIM también está relacionada con el control de la morfología de las crestas, la formación de las “*cristae junctions*”, y el mantenimiento y estabilidad del ADNmt (Chan, 2006, Liesa *et. al.*, 2013).

Las Mfn's se localizan en la MOM atravesándola dos veces y exponiendo sus dominios N-terminal (dominio GTPasa) y C-terminal orientados hacia el citoplasma, dejando un pequeño loop en el espacio intermembranal. Tiene dos isoformas (Mfn1 y Mfn2) que interactúan entre sí para coordinar la fusión de la MOM de mitocondrias opuestas. Durante el proceso de fusión únicamente Mfn1 interacciona con OPA1 para mediar la fusión de la membrana interna (Liesa *et. al.*, 2009), mientras que la Mfn2 participa en la interacción entre RE y mitocondria (Grimm, 2012). A pesar de sus similitudes en las Mfn, la isoforma Mfn2 presenta una actividad GTPasa inferior a Mfn1 pero tiene mayor afinidad de unión con el GTP (Ishihara *et. al.*, 2004).

La GTPasa Drp1 (por sus siglas en ingles *Dynamin-Related Protein 1*) es una proteína clave de la fisión mitocondrial. Se compone de varios dominios similares a la familia de las dinaminas GTPasas, incluyendo un dominio GTPasa y un dominio efector de GTPasa (GED) (Bossy-Wetzel *et. al.*, 2003). Drp1 mayoritariamente se distribuye principalmente en el citoplasma y carece de una secuencia señal de destino hacia la mitocondria por lo que es reclutada hacia la MOM por medio de Fis1, una pequeña proteína que actúa como un adaptador en el ensamblaje, sin embargo se ha demostrado que aún con el silenciamiento de Fis1 esto no interfiere con la localización de Drp1 hacia la mitocondria (Lee *et. al.*, 2004) esto puede ser porque una fracción de Drp1 se localiza en puntos específicos de la membrana mitocondrial externa que representan futuros sitios de fisión.

El proceso de fusión empieza con el acercamiento entre dos mitocondrias mediado por las Mfn, formando un complejo dimérico antiparalelo mediante

interacciones hidrofóbicas de sus N y C terminales (Koshiba *et. al.*, 2004). En un segundo paso se debe producir una “torcedura”, para a continuación fusionarse las membranas externas de las mitocondrias. Finalmente, con la presencia de GTP, las isoformas de OPA1 se oligomerizan dando lugar a la fusión de la membrana interna (Osellame *et. al.*, 2012). El mecanismo molecular preciso de la división de la mitocondria aún no está esclarecido. Sin embargo, uno de los modelos postula que Drp1 actúa como una mecanoenzima que participa activamente en el corte de membranas por constricción. Drp1 forma oligómeros de alto peso molecular en la superficie mitocondrial en los sitios de fisión mitocondrial formando anillos concéntricos alrededor del sitio de escisión y la hidrólisis de GTP facilita la escisión de la mitocondria (Liesa *et. al.*, 2009). Una vez que se libera Drp1 fisión es completa (Fig. 3).

La pérdida del balance entre los procesos de fisión y fusión se asocia a alteraciones en la función mitocondrial han sido implicados en una variedad de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, (Han *et. al.*, 2011), metabólicas (Galloway *et. al.*, 2013), y cáncer (Zhao *et. al.*, 2009). Sin embargo, se ha dejado un lado la importancia en enfermedades hepáticas como la NAFLD.

En las enfermedades metabólicas se ha asociado a la alteración de la estructura y deficiencias bioenergéticas mitocondriales, con el aumento del daño en el ADNmt y la modificación de proteínas por ERO. El aumento de ERO usualmente produce mutaciones puntuales en el ADNmt, lo cual llevaría a la inactividad si las

mitocondrias se encontrasen aisladas unas de otras (Galloway *et. al.*, 2013, Liesa *et. al.*, 2013).

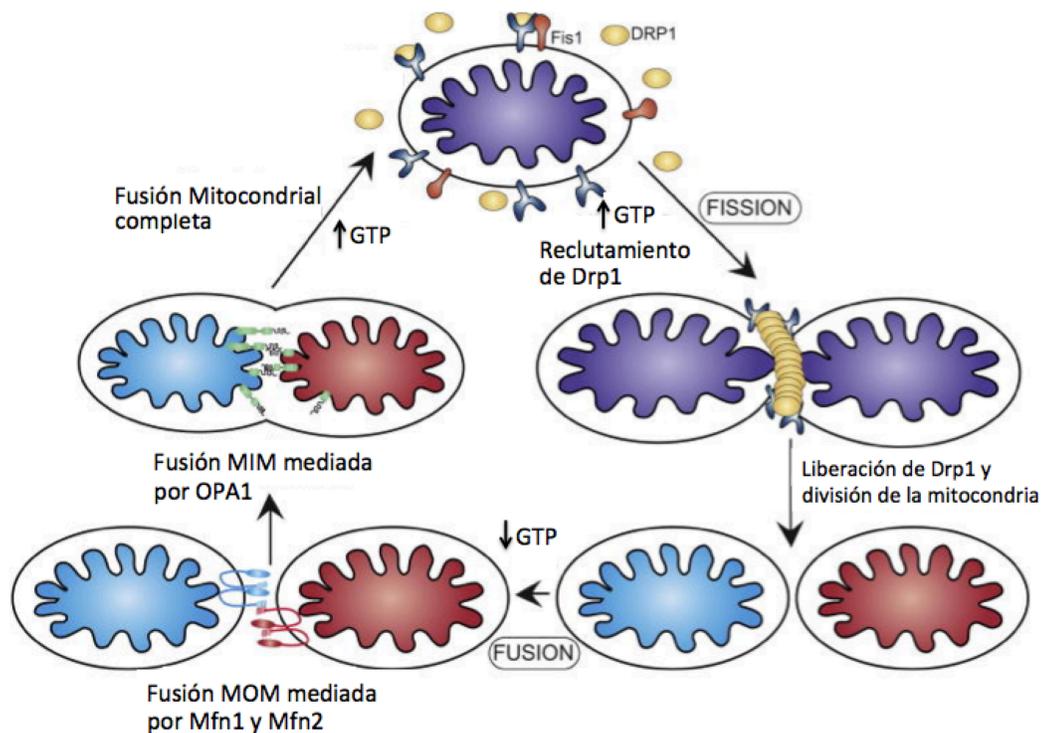


Figura 3. Dinámica Mitocondrial. OPA1: proteína de la atrofia óptica 1; Mfn1: mitofusina 1; Mfn2: mitofusina 2; Fis1: proteína de fisión 1; Drp1: proteína relacionada con dinamina 1; GTP: trifosfato de guanosina. Figura adaptada de Osellame L. *et. al.* Clin Endocrinol Metabol, 2012.

En general, la fusión mitocondrial es un proceso que mantiene la morfología e integridad del retículo mitocondrial, protegiendo el material genético de este organelo, sin embargo la fusión se ha visto abatida en un modelo murino de NAFLD (Galloway *et. al.*, 2014).

Interesantemente en los últimos años se ha identificado un vínculo entre el exceso y la restricción de nutrientes con la arquitectura mitocondrial. Se ha visto que las células expuestas a un ambiente rico en nutrientes tienden a mantener sus

mitocondrias en un estado fragmentado, a diferencia de las mitocondrias que se encuentran en restricción calórica tienen a permanecer más en un estado de fusión (Galloway *et. al.*, 2013, Liesa *et. al.*, 2013). Sin embargo, hay muy pocos reportes de sobre el estado que guardan las mitocondrias en enfermedades hepáticas como la NAFLD.

1.4.c) Biogénesis mitocondrial y mitofagia.

La regulación de la biogénesis y la mitofagia juegan un papel importante en el equilibrio de la supervivencia celular y la muerte celular. Estas dos vías opuestas están asociadas con el contenido mitocondrial, la homeostasis del metabolismo energético, en particular, con la síntesis de ATP. La regulación estricta entre estos procesos opuestos es esencial para la adaptación celular como respuesta al estado metabólico, al estrés celular y otros estímulos intracelulares o ambientales. Interesantemente, el desequilibrio entre la proliferación o degradación mitocondrial resulta en el desarrollo progresivo de numerosas patologías crónicas del hígado, tales como NAFLD y NASH (Degli Esposti *et. al.*, 2012).

La biogénesis mitocondrial se caracteriza por una serie de procesos celulares altamente coordinados entre núcleo, citoplasma y mitocondria involucrados para la formación de nuevas mitocondrias. Entre los procesos que se llevan a cabo en la biogénesis mitocondrial, incluye la transcripción y traducción del ADNmt, la transcripción y traducción de transcritos proveniente del núcleo y el reclutamiento de nuevas proteínas y lípidos importados hacia la mitocondria, entre otras. Las mitocondrias nunca se sintetizan “de novo” si no que surgen por el crecimiento y

división de mitocondrias preexistentes por lo tanto, la biogénesis mitocondrial esta fuertemente asociada con la fisión mitocondrial (Zolezzi *et. al.*, 2013).

La regulación de la biogénesis de las mitocondrias, está dada por la activación de múltiples factores de transcripción, sin embargo el factor de transcripción PGC-1 α , (por sus siglas en inglés peroxisome proliferator activated receptors coactivador-1 alpha) es considerado el regulador maestro en la biogénesis mitocondrial. PGC-1 α , es el miembro más estudiado de la familia de los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR's) y además de ejercer un efecto sobre la biogénesis mitocondrial, también participa en muchos procesos del metabolismo energético, como la gluconeogénesis, la lipogénesis, entre otros. El PGC-1 α se expresan con alta actividad mitocondrial, en el tejido adiposo, páncreas, músculo esquelético, corazón y cerebro (Handschin *et. al.*, 2006), y en hígado los niveles de PGC-1 α son bajos (Finck *et. al.*, 2006). Su expresión se induce bajo condiciones de estrés, tales como baja temperatura, el ayuno o la privación de energía. PGC-1 α se activa transcripcionalmente por la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y post-traduccionalmente por la fosforilación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) o la desacetilación mediada por la sirtuína 1 (SIRT1). Después de la activación de PGC-1 α , diferentes factores de nucleares se activan, en particular los factores de respiración nucleares 1 y 2 (NRF-1 y NRF-2) y Tfam para la biogénesis mitocondrial, receptor X retinoide (RXR), PPAR's y receptor relacionado con estrógeno α (ERR α), entre otras. La expresión de estos factores aumentan la replicación del ADNmt, la expresión de múltiples genes involucrados en la expresión

y ensamblaje de proteínas de la ETC, así como la transcripción de genes implicados en el transporte y la β -oxidación de FA (Fig. 4) (Huss *et. al.*, 2004, Ventura-Clapier *et. al.*, 2008).

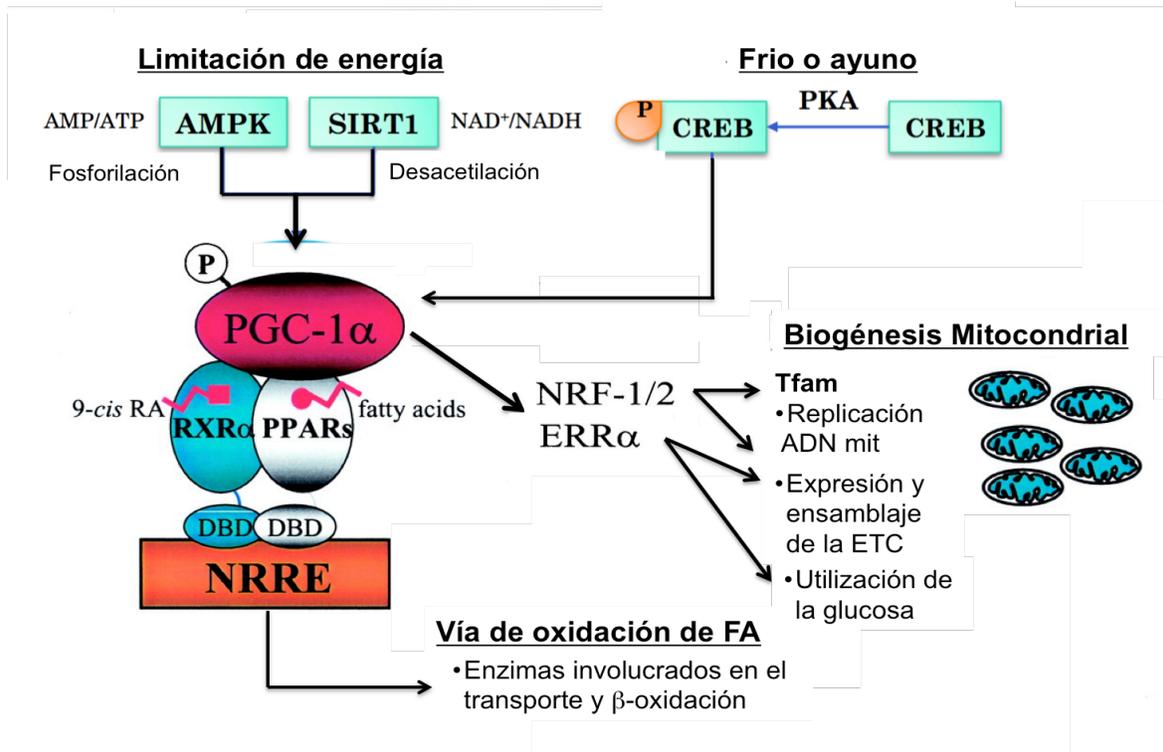


Figura 4. Biogénesis mitocondrial dependiente de PGC-1 α : PGC-1 α : AMPK: proteína cinasa activada por AMP; SIRT1: sirtuína 1; CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc; PKA: proteína cinasa A; RXR α : receptor X retinoide α ; PPARs: receptores activados por los proliferadores de peroxisomas; DBD: dominio de unión al ADN; NRRE: elemento de respuesta del complejo; NRF-1/2: factores de respiración nucleares 1 y 2; ERR α : receptor relacionado con estrógeno α . Figura adaptada de Huss J. *et. al.* Circulation Research, 2004.

Como ya hemos mencionado la proliferación y degradación de las mitocondrias depende de su estado funcional o del estado energético celular (Twig *et. al.*, 2008). El aumento del número de mitocondrias tiene como resultado un incremento de la capacidad de la fosforilación oxidativa en la célula, en un intento de compensación

de los niveles de ATP deficientes (Kubli *et. al.*, 2012). Sin embargo, una desorganización en estos procesos está a menudo relacionada con un acúmulo de mitocondrias que puede ser perjudiciales para la célula (Palikaras *et. al.*, 2014).

La mitofagia se ha descrito como uno de los mecanismos de “control de calidad” celular para eliminación de las mitocondrias disfuncionales, dañadas o excedentes de la célula. Este proceso, consiste en la encapsulación de las mitocondrias en una estructura de doble membrana conocida como autofagosoma para su posterior degradación. La mitofagia está asociado con la fisión de las mitocondrias, ya que es vital para poder crear orgánulos más pequeñas y ser eliminados por autofagia de forma más sencilla (Twig *et. al.*, 2008).

La mitofagia es una forma especializada de la autofagia y está altamente regulada por las proteínas Parkin y la cinasa putativa inducida por PTEN (PINK-1, por sus siglas en inglés PTEN-inducible putative kinase 1). Se ha observado que mutaciones en los genes que codifican a PINK1 y Parkin causan la acumulación de mitocondrias dañadas en el citoplasma haciendo imposible su eliminación, y provocando que la célula sea muy susceptible a la apoptosis (Saito *et. al.*, 2015).

Parkin es una E3 ubiquitina ligasa citosólica que se trasloca hacia la mitocondria después de una inducción de estrés, por ejemplo un descenso del $\Delta\Psi_m$, cabe mencionar que Parkin se acumula exclusivamente en las mitocondrias dañadas sin hacerlo en las mitocondrias sanas de la misma célula (Narendra *et. al.*, 2008), lo que refuerza la idea que la mitofagia un mecanismo “control de calidad”.

Pink1 es una proteína que contiene un dominio serina/treonina cinasa y un

dominio de localización mitocondrial. La función de PINK1 va muy ligada al $\Delta\Psi_m$, Valente et. al. en el 2004 demostraron que Pink1 estabiliza el $\Delta\Psi_m$ para prevenir la apoptosis de las células y que las mutaciones de esta proteína acentuaba las condiciones de la enfermedad, induciendo trastornos mitocondriales (Valente *et. al.*, 2004).

La mitofagia se inicia cuando la función de la mitocondria está comprometida y caen los niveles del $\Delta\Psi_m$, esto permite la activación de PINK1. Una vez activada Pink1 recluta a Parkin a la MOM para ubiquitinar a distintas proteínas entre ellas a Mfn2. En células despolarizadas, se ha sugerido que Mfn2 actúa como un receptor de Parkin, de hecho, la ausencia de Mfn2 interrumpe la vía de PINK1-Parkin y promueve una morfología mitocondria anómala (Narendra *et. al.*, 2010). La ubiquitinización de proteínas de la MOM sirve como señal para que sean reconocidas por el receptor p62. Este receptor tiene la habilidad de oligomerizar para poder formar *cluster* o racimo de varias cosas para ser eliminadas. p62 se une a LC3, una molécula que se encuentra en las membranas especializadas que formarán el fagosoma y entonces se promoverá la mitofagia (Shirihai *et. al.*, 2015). Después de la creación del autofagosoma, éste debe ser fusionado con un lisosoma generando el autolisosoma (Fig. 5).

1.4.d) Apoptosis.

Además de la regulación de la morfología mitocondrial, está claro que la dinámica mitocondrial desempeña funciones adicionales en la mitocondria como la regulación

del metabolismo, la producción energética, la producción de ERO y la apoptosis, entre otros procesos celulares (Saito *et. al.*, 2015).

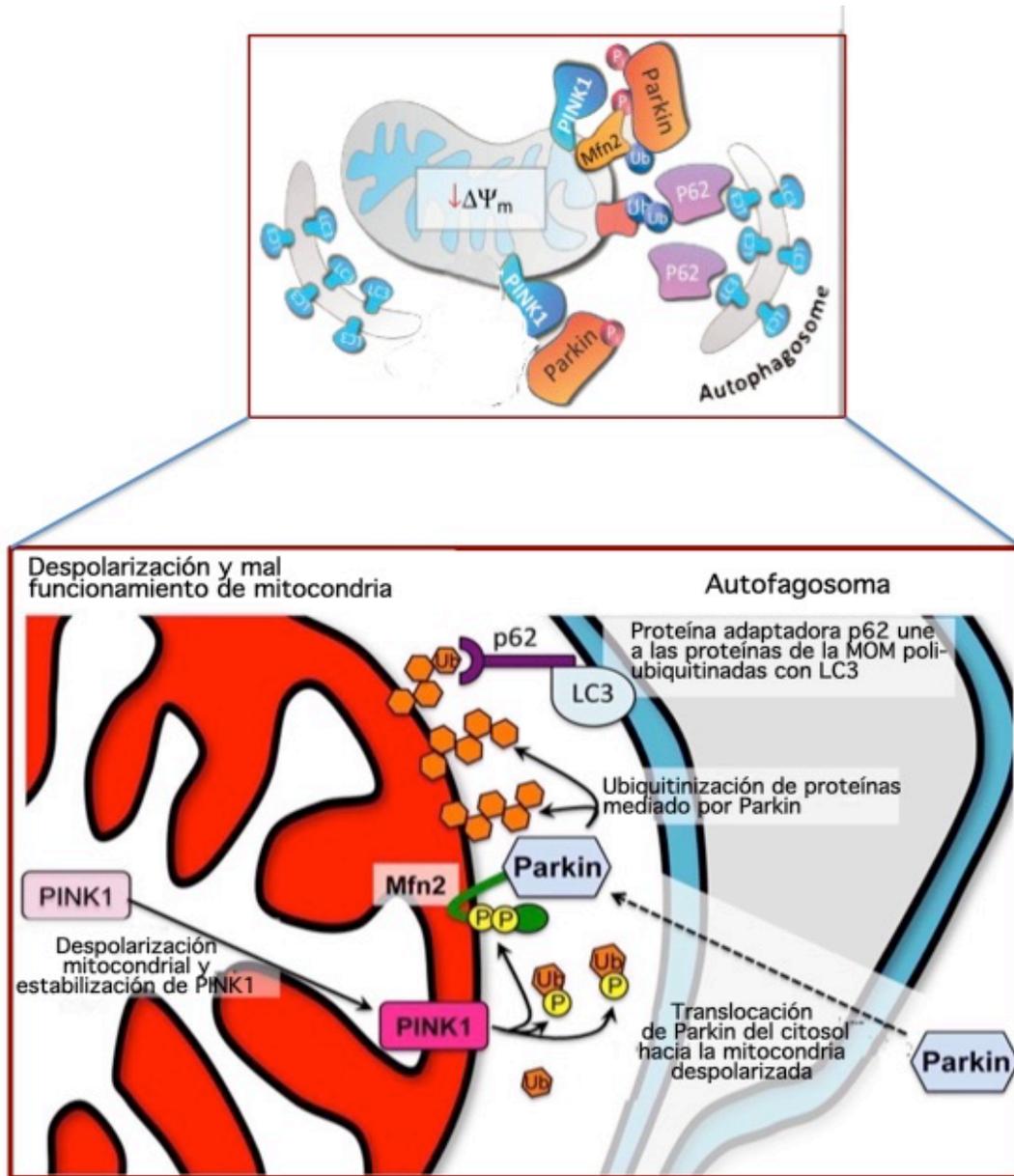


Figura 5. Eventos moleculares que conducen a mitofagia de las mitocondrias disfuncionales. Pink1: cinasa putativa inducida por PTEN; Parkin; p62: secuestrosoma; Mfn2: mitofusina 2; Ub: ubiquitina; LC3: proteina asociada al microtúbulo. $\Delta\Psi_m$ = potencial transmembranal mitocondrial Figura adaptada de Shirihai O. *et. al.* Circulation Research 2015.

La apoptosis y su asociación con la fisión mitocondrial se describió en mamíferos por primera vez en 2001. El estudio muestra que durante la apoptosis, la morfología de la mitocondrial cambia, hay un aumento el número de mitocondrias de menor tamaño y de forma esférica, esto es mediado por un evento de semi-fisión previo a la apoptosis que involucra la proteína Drp1, la principal proteína encargada de la fisión mitocondrial (Frank *et. al.*, 2001).

Como anteriormente se mencionó cuando la célula sufre un daño grave, se activan una serie de señales que despliegan la mitofagia, pero si el número de mitocondrias dañadas supera la capacidad de mitofagia, o si la mitofagia se inactiva, entonces la apoptosis se convertirá en la vía dominante para minimizar el daño celular. La pérdida del $\Delta\Psi_m$ que conlleva a la disfunción mitocondrial se considera un punto importante en el proceso apoptótico (Osellame *et. al.*, 2012). En la apoptosis, las señales celulares inducen a las proteínas pro-apoptóticas que tienen como objetivo a la mitocondria, causando la apertura irreversible del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). Esto produce cambios en la morfología mitocondrial y la liberación del citocromo *c*, que causa la activación de las caspasas efectoras de la muerte celular (Nunnari *et. al.*, 2012). La regulación de la apoptosis está mediada por las proteínas de la familia de las Bcl-2. Esta familia está compuesta por unas 20 proteínas parcialmente homólogas que se caracteriza por tener los dominios BH. Dentro de esa familia hay proteínas anti o proapoptóticas y su función se define por su estructura.

Las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 están formadas por varios dominios homólogos (de BH1 a BH4), especialmente el dominio BH3 les permite unirse a otras proteínas de la misma familia. Entre las proteínas más importantes de esta familia son Bcl-2, Bcl-XL, y Mcl-1, su localización es generalmente mitocondrial pero también se han encontrado en el retículo endoplásmico y la membrana nuclear (Guicciardi *et. al.*, 2005). Las proteínas apoptóticas también contienen los dominios BH1, 2 y 3, pero no el BH4. Entre las proteínas más importantes se encuentran Bax, Bak y Bok (Strasser, 2005). Bax y Bak son dos proteínas fundamentales para la señalización de la apoptosis mientras que Bok parece estar restringido a tejidos reproductores (Llambi *et. al.*, 2016).

En células sanas, en general, los ambientes con escasez de nutrientes, conducen a la inducción de proteínas BH3 y a la disminución de los niveles de proteínas antiapoptóticas que desencadenan apoptosis por la vía mitocondrial. Un aumento en los niveles de la proteína pro-apoptótica Bax no indica necesariamente presencia de muerte celular, ya que Bax se expresa en situaciones basales en una variedad de líneas celulares. Bax localizada en el citoplasma se encuentra en estado inactivo, pero su activación permite la retracción de su extremo carboxilo terminal, que da lugar a que Bax se una a la membrana mitocondrial. Aquí se une formando grupos en sitios específicos donde, posteriormente, ocurrirán eventos de fisión mitocondrial. Bax, sin embargo, no es la única proteína que muestra este fenómeno: su estrecha homóloga es la proteína Bak, que en las células sanas se distribuye de

forma homogénea a lo largo de la membrana mitocondrial externa, también forma agrupaciones que localizan con Bax (Montessuit *et. al.*, 2010, Strasser, 2005).

Estudios recientes han relacionado la maquinaria de fusión/fisión en la regulación de la apoptosis. La proteína de fisión mitocondrial Drp1 y la de fusión Mfn2 colocalizan con la proteína pro-apoptótica Bax en determinados puntos de la mitocondria, pero no lo hacen otras proteínas implicadas en la morfología mitocondrial (Montessuit *et. al.*, 2010). La sobreexpresión de Drp1 o Mfn2 *per se* no provocan apoptosis, a pesar de modificar la estructura mitocondrial, pero sensibilizan a las células a estímulos apoptóticos. El mecanismo preciso con el que Mfn2 interfiere con la activación de Bax no se conoce. Una posibilidad es que la pérdida de Mfn2 facilite la remodelación de la membrana externa de las mitocondrias por Drp1 estimulando la oligomerización de Bax (Montessuit *et. al.*, 2010).

La activación de Bax/Bak, permite su oligomerización y formando un canal por donde podrán salir proteínas mitocondriales del espacio intermembranal, tales como el citocromo c y smac/diablo. Una vez liberado el citocromo c se une a Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica) lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de caspasa 9 y con ello la cascada de las caspasas, mientras que smac/diablo se une y antagoniza al inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP). La liberación regulada de factores pro-apoptóticos de la mitocondria causa la inducción de las caspasas iniciadoras y efectoras o ejecutoras. Las caspasas efectoras no son capaces de auto-activarse y necesitan ser cortadas y activadas. Entre las caspasas ejecutoras se

encuentra la caspasa 3, la cual se encuentra en forma de dímero inactiva. Pero una vez cortado la subunidad de unión las activa, y este es un proceso imprescindible e irreversible (Fig. 6).

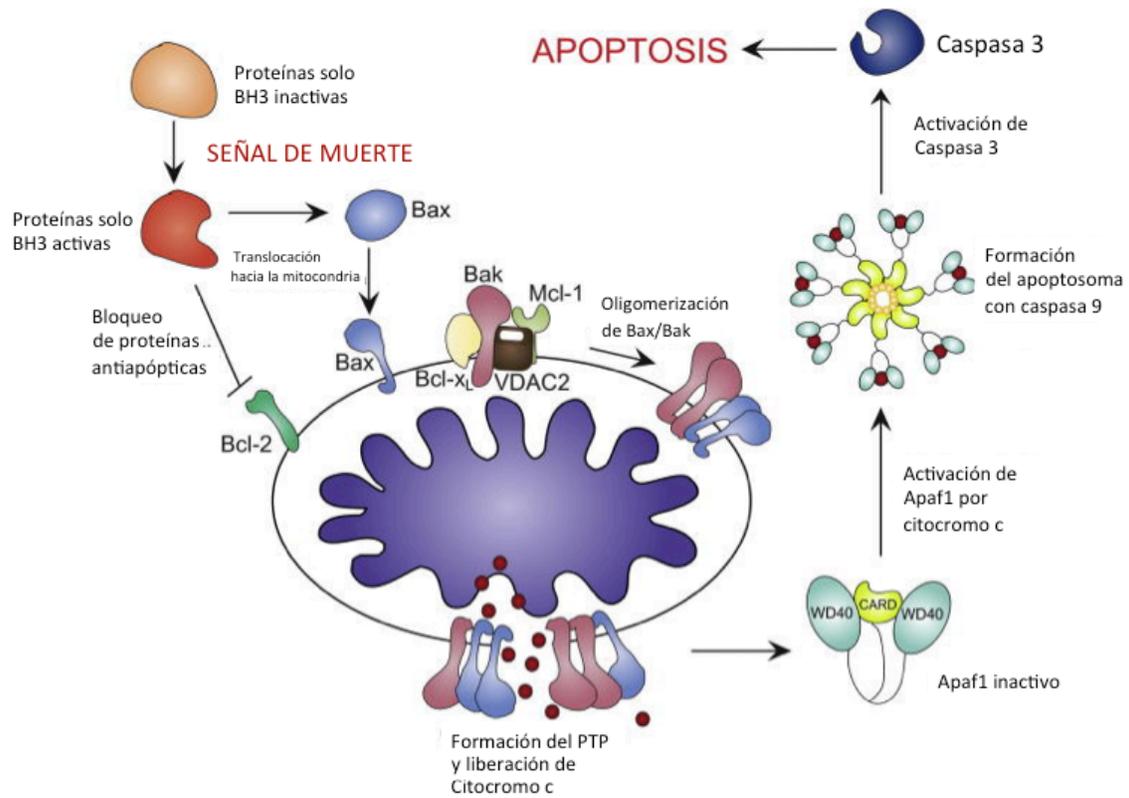


Figura 6. Apoptosis vía mitocondria. Figura adaptada de Osellame L. et. al. Clinical Endocrinology & Metabolism, 2012.

1.5 Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en el control del daño por estrés oxidante.

La respuesta celular contra el estrés oxidante es sumamente compleja y puede activarse por un desbalance en el estado redox celular, por interacciones ambientales o como parte de procesos fisiológicos naturales. El control del estrés oxidante está dada en gran medida por la activación de algunos factores de

crecimiento que inician una respuesta de reparación, sobrevivencia y proliferación en tejidos, tanto en estados fisiológicos como patológicos.

En nuestro grupo de investigación hemos venido caracterizando ampliamente, el control del estado redox celular y el estrés oxidante mediado por la activación del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas inglés Hepatocyte Growth Factor) y su receptor protooncogen celular de transición epitelial mesenquimal (c-Met, por sus siglas en inglés cellular mesenchymal transition) (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2013, Enriquez-Cortina *et. al.*, 2013, Gomez-Quiroz *et. al.*, 2008, Lopez-Reyes *et. al.*, 2015).

1.5.a) Generalidades HGF y c-Met.

El HGF fue originalmente descubierto como un potente mitógeno de hepatocitos de rata adulta en 1984 (Nakamura *et. al.*, 2011), su gen está codificado en el cromosoma 7 banda 7q21.1 y su producto es una glicoproteína compuesta por 692 a 697 aminoácidos (aa). Éste es sintetizado y secretado como un precursor inactivo de 728 aa (pro-HGF) de una sola cadena, pudiéndose sintetizar en el pulmón (Okada *et al.*, 2004), o bien en el hígado. *In vivo* el HGF actúa de forma paracrina en el hígado, siendo producido por células hepáticas mesenquimales, como las células estelares, endoteliales, o del ducto biliar (Sakai *et. al.*, 2015). El pro-HGF se localiza en la superficie celular o anclado en la matriz extracelular, posteriormente es procesado por la serina proteasa activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) mediante un corte proteolítico en sus residuos arginina-valina (494-495 aa) que da origen a la forma activa de dos cadenas unidas entre sí por puentes disulfuro. La cadena α (463

aa, 30 kDa) contiene un cuatro dominios Kringle y dominio N-terminal “hairpin loop”) que es el sitio de unión al receptor. La cadena β (234 aa, 60 kDa) es un homólogo de proteasas de serina, pero carece de esta actividad enzimática (Funakoshi *et. al.*, 2003, Nakamura *et. al.*, 2011)

En 1991, el receptor del HGF, c-Met fue identificado como un protooncogén transmembranal con actividad de tirosin cinasa, su gen está localizado en el cromosoma 7 banda 7q21-q31; el producto es un polipéptido de 150 kDa, que es glicosilado post-traduccionalmente seguido por una proteólisis, generando al receptor heterodimérico maduro α - β compuesto de una cadena α extracelular unida por puente disulfuro a una cadena transmembranal β de 140 kDa, la cual contiene múltiples sitios de regulación por fosforilación (Foveau *et. al.*, 2009).

Al unirse el HGF al receptor c-Met, se promueve su dimerización y la autofosforilación en residuos de tirosina ubicados en la región intracelular de la subunidad β . Se reconocen dos sitios de autofosforilación llamados sitios de anclaje, en la región carboxilo-terminal que son responsables del reclutamiento de varias proteínas involucradas en la iniciación de la señalización intracelular (Stuart *et al.*, 2000). Además c-Met contiene un dominio conocido como yuxtamembranal que al ser fosforilado inicia la endocitosis y el reclutamiento de ubiquitinas ligasas, iniciando el proceso de degradación del receptor tras su activación y función, por lo que este dominio representa un punto de regulación negativa de la ruta iniciada por el HGF (Sakai *et. al.*, 2015).

Las rutas de protección inducidas por el HGF/c-Met, está dada principalmente por la expresión de proteínas de supervivencia, la regulación y activación de factores de transcripción que actúan en la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación, la morfogénesis, la migración, entre otras (Fig. 7).

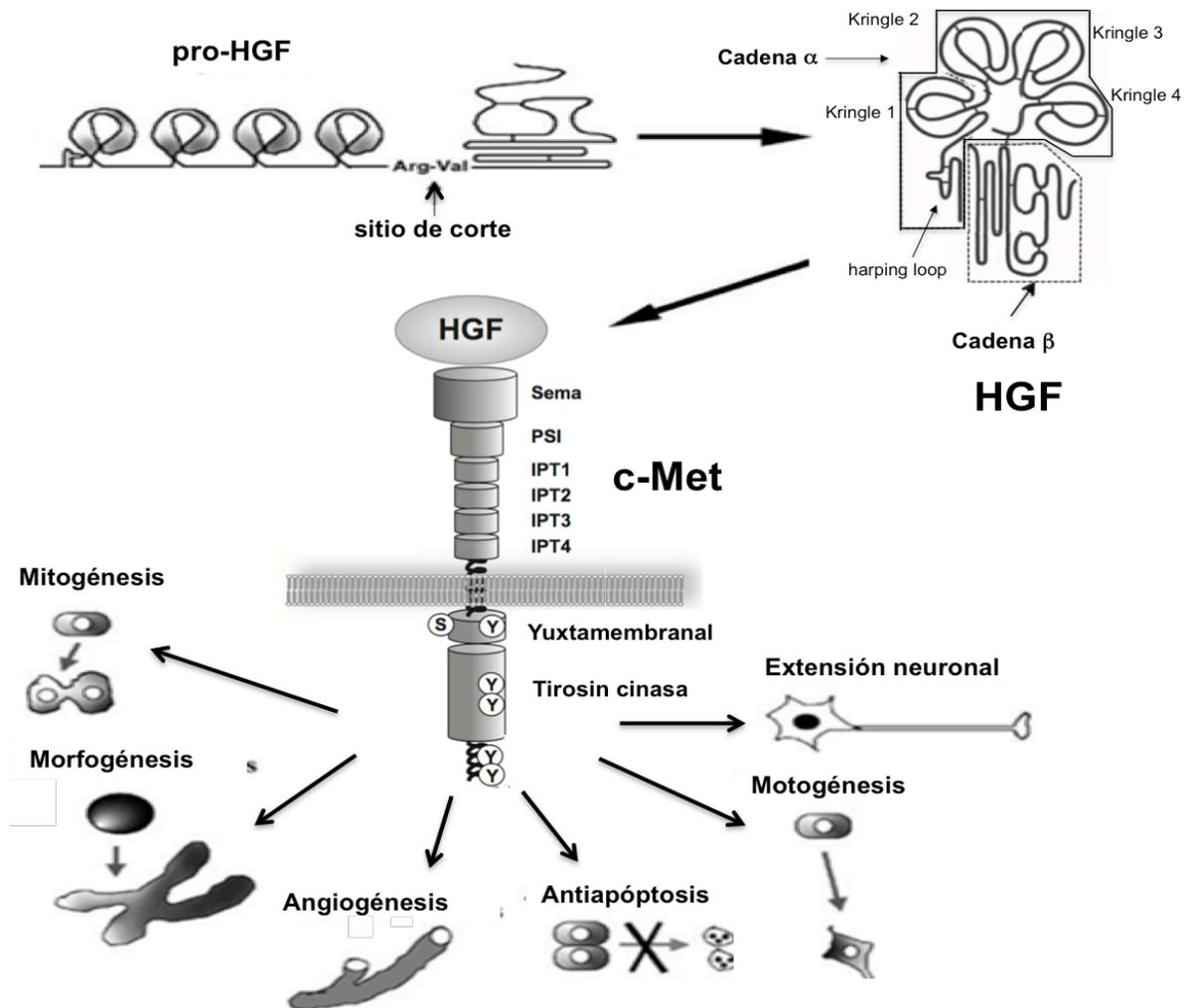


Figura 7. Principales rutas de señalización inducidas por HGF/c-Met. Tras la proteólisis de HGF y su unión el receptor c-Met se reclutan proteínas adaptadoras y efectoras, las cuales activan factores de transcripción importantes para las diferentes rutas de protección. Figura adaptada de Sakai K. et. al. Journal of Biochemistry, 2015.

Recientemente Clavijo et. al. (2013) han reportado que la señalización mediada por HGF/c-Met posee una doble función en el control del estrés oxidante, debido a la capacidad de reprimir o inducir la generación de ERO por medio de la inducción del sistema antioxidante o la inhibición de sistemas pro-oxidantes (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2013). Finalmente, es importante resaltar que el HGF es uno de los principales reguladores la síntesis del GHS y de la Gpx (Arends et al., 2008), ya que como anteriormente se mencionó esta enzima juega un papel importante en el mantenimiento de los niveles apropiados de GSH y la protección de las células contra el estrés oxidante.

1.5.b) HGF/c-Met y NAFLD.

Existe una relación importante entre la homeostasis de lípidos y la señalización de HGF/c-Met. Se ha reportado que HGF/c-Met induce la síntesis y exportación de lípidos (Kaibori *et. al.*, 1998) además de su participación en la regulación del metabolismo de los lípidos en un modelo murino de NAFLD (Kosone *et. al.*, 2007). También se ha relacionado una elevación en los niveles séricos de HGF en pacientes con síndrome metabólico (Hiratsuka *et. al.*, 2005) y con enfermedades hepáticas (Tomiya *et. al.*, 1998), incluyendo la NAFLD (Agrawal *et. al.*, 2013).

En los últimos años se ha reconocido al HGF como protector celular contra los efectos adversos del colesterol (Yu *et. al.*, 2010) y ácidos grasos (Santangelo *et. al.*, 2007), sin embargo a la fecha, no se ha estudiado el efecto de HGF/c-Met en la reversión del daño y el estrés oxidante debido a la acumulación de colesterol en los hepatocitos.

II. JUSTIFICACION.

Varios estudios han demostrado que el mexicano tiene una predisposición genética al síndrome metabólico (Bellentani *et. al.*, 2009, Perichart-Perera *et. al.*, 2010), esto asociado a que en su dieta el consumo de grasas es superior al valor recomendado, lo que nos lleva a concluir que una proporción muy alta de la población mexicana presenta hígado graso, considerando esta condición como un factor para el desarrollo de enfermedades hepáticas más severas, las cuales son una de las principales causas de mortalidad en nuestro país (Tellez-Avila *et. al.*, 2008).

En la última década se han realizado importantes avances que han permitido una mejor comprensión de la patogénesis en algunas enfermedades hepáticas y se ha demostrado que el estrés oxidante participa en gran medida en el inicio y la progresión de los distintos estadios patológicos en el hígado. Además, se ha reportado que más que la cantidad de lípidos, es el tipo de ellos lo que favorece la progresión del daño y por ello el estudio de la esteatosis no alcohólica con hipercolesterolemia ha recibido gran atención.

Aún cuando se ha considerado que la mitocondria juega un papel esencial en los patrones de señalización que median el daño del hepatocito, ya que el desacoplamiento en la función mitocondrial afecta la sobrevivencia celular, a la fecha no se conoce su participación en la aparición y perpetuación de las enfermedades hepáticas. Finalmente, es bien conocida la participación del HGF en los procesos de reparación en el daño hepático, sin embargo no se conoce la participación de HGF/c-Met en el control del estado redox en la esteatosis, resultado de una dieta

hipercolesterolémica.

Es por ello, que en la presente tesis se estudió la participación de la mitocondria en la generación de ERO en presencia de esteatosis inducida por una dieta alta en colesterol y como el HGF permite restablecer la homeostasis celular mediante el control del estrés oxidante.

III. HIPÓTESIS.

Si la acumulación de lípidos en el hígado induce disfunción mitocondrial y estrés oxidante entonces la alteración en la homeostasis mitocondrial determinará la progresión del daño hepático.

El HGF inducirá una activación del sistema antioxidante que permitirá la reversión del daño hepático en hepatocitos HC, lo que restablecerá el estado redox celular.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de la sobrecarga de colesterol sobre la función mitocondrial y la producción de ERO.

IV.2 Objetivos particulares.

IV.2.a) Caracterizar el daño hepático inducido por la ingesta de la dieta HC por 30 días en los hígados de ratones C57BL/6J .

IV.2.b) Identificar las moléculas prooxidantes que participan en la generación del estrés oxidante, así como la respuesta antioxidante en hígados de ratones alimentados con la dieta HC.

IV.2.c) Determinar las proteínas mitocondriales que participan en el control del estrés oxidante, en ratones sometidos a la dieta HC.

IV.2.d) Evaluar el efecto de la dieta HC sobre la morfología y función de la mitocondria.

IV.2.e) Determinar si la respuesta antioxidante promovida por el HGF contrarresta el daño oxidante debida a la dieta HC.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (San Louis MO, USA) excepto cuando se indique lo contrario.

V.1 Diseño experimental.

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J de 8 a 12 semanas de vida, los cuales se separaron en 3 grupos: el grupo control; ratones alimentados con una dieta balanceada estándar (Chow) para roedores (Purina Inc) y dos grupos experimentales, los cuales se alimentaron por 2 ó 30 días con la dieta hipercolesterolémica (HC) compuesta por una dieta balanceada estándar adicionada con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio dependiendo el caso (Mari *et. al.*, 2006). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos y bajo cuidados acordes con el manual de procedimientos del Instituto Nacional de

Rehabilitación y la guía para cuidados y uso de animales de laboratorio establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y la norma para la eliminación de residuos biológicos NOM-087-ECOL-1995. Al finalizar el tiempo de tratamiento, parte de los ratones fueron sacrificados para obtener el tejido hepático o bien para la obtención de cultivo primario de hepatocitos y en algunos de los experimentos las mitocondrias aisladas del mismo (Fig. 8).

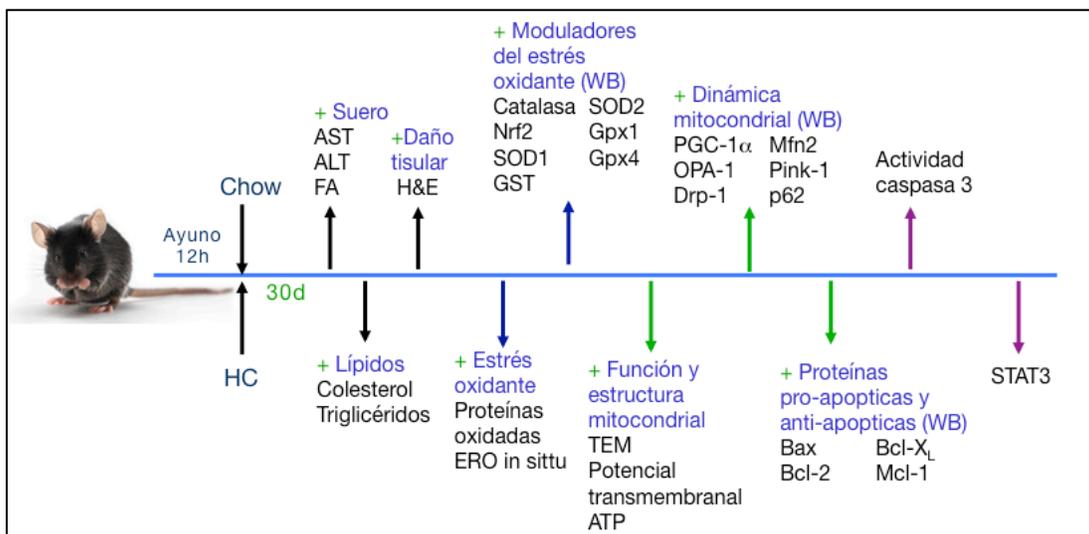


Figura 8. Diseño experimental ratones alimentados con la dieta HC y dieta control por 30 días.

En el caso del grupo alimentado por 2 días con la dieta HC y su grupo control, solo se obtuvo el cultivo primario de hepatocitos y las células se sembraron en una densidad de 3.5×10^4 células/cm², que corresponde aproximadamente el 90% de confluencia en la superficie de sembrado. Los hepatocitos se trataron o no con el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a una concentración final de 50ng/ml (PeproTech, Rocky Hill NJ, EUA) durante 3, 6, 12 ó 24 h. Terminado el tiempo del

tratamiento los medios fueron retirados, y las células se emplearon en las diferentes pruebas como se especifica más adelante (Fig. 9).

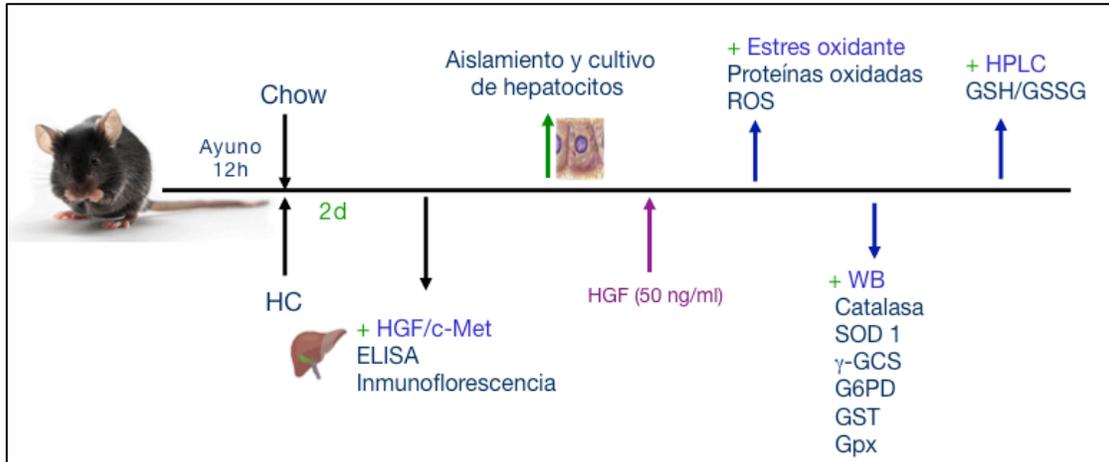


Figura 9. Diseño experimental ratones alimentados con la dieta HC y dieta control por 2 días.

V.2 Cociente peso hígado/ peso ratón.

Después del tratamiento, los animales fueron pesados y sacrificados; los hígados se extirparon, se pesaron y se determinó el cociente del peso hígado sobre el peso del ratón.

V.3 Análisis macroscópico e histológico.

Después del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se recuperó el tejido hepático, se realizó un registro fotográfico de los órganos para el análisis macroscópico del órgano (Lopez-Reyes *et. al.*, 2015).

Posteriormente parte del tejido se fijó en paraformaldehído al 4%, se realizó la inclusión en parafina y se hicieron cortes de 5 μm para su análisis por tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Los tejidos se sometieron a la tinción con H&E

siguiendo el procedimiento descrito a continuación. Los cortes de las muestras de hígado fueron tratados dos veces por 5 min con Neoclear, luego fueron re-hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100 a 60%) y se lavaron con agua destilada. Se tiñeron con hematoxilina por 4 min, posteriormente se lavó una vez con agua, etanol al 70% y ácido clorhídrico; se lavó nuevamente con agua destilada y se mantuvo por 8 min en una solución Scott, posteriormente se lavó con agua destilada y se tiñó con eosina durante 3 min. Finalmente se lavó con agua destilada, etanol al 96%, etanol al 100%, etanol-xileno 1:1, y dos veces con xileno. y enseguida se montaron con entellan, cubriendo la muestra tratada con un portaobjetos (Presnell *et. al.*, 1997). Una vez que se montaron todas las laminillas, se realizó el análisis morfométrico de las muestras en el microscopio Axioskope II (Carl Zeiss) y el analizador de imágenes de campo claro (Axiovision 4.5, Carl Zeiss). La digitalización de las fotomicrografías se tomó con una cámara AxioCamMRc5 (Carl Zeiss).

V.4 Pruebas de daño y función hepática.

Los ratones alimentados con las diferentes dietas fueron anestesiados intraperitonealmente utilizando 0.7 mL de Avertina (2,2,2-tribromoetanol). Una vez anestesiados, la sangre fue colectada por punción cardiaca. Se emplearon tiras reactivas comerciales para determinar la actividad sérica de las enzimas marcadoras de daño hepático alanino amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), y marcadores de funcionalidad hepática como fosfatasa alcalina (ALF) por el método automatizado usando Reflovet Plus (Roche, Mannheim, Alemania).

V.5 Cultivo primario de hepatocitos y viabilidad celular.

Previamente anestesiado el animal con Avertina se perfundi3 con 30 mL de medio soluci3n salina balanceada de Hanks (HBSS) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , con HEPES 10 mM, pH 7.4, etilglicol (b-aminoetil1-eter)-N,N,N,N 3cido tetra-ac3tico (EGTA) 75 mM, a 37 3C. La velocidad de perfusi3n se control3 con una bomba perist3ltica a 3.8 mL/min. En el segundo paso de la perfusi3n se utilizaron 50 mL de colagenasa tipo I al 0.1% en medio Williams con NaHCO_3 25mM y amortiguado con HEPES 10 mM, pH 7.4 a una temperatura de 37 3C, al t3rmino de esta segunda perfusi3n se recuper3 el h3gado. El h3gado recuperado se homogeniz3 en un medio de cultivo de Williams suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), antibi3tico y antimic3tico (medio de adhesi3n). La suspensi3n celular se centrifug3 en un gradiente de densidad con Percoll. Se retir3 el sobrenadante y el bot3n que conten3a a los hepatocitos se resuspendi3 en medio de adhesi3n. Las c3lulas viables se sembraron a una densidad de 254,000 c3lulas/cm² y se mantuvieron en incubaci3n a 37 3C en una atm3sfera de CO₂ al 5%.

La viabilidad celular se determin3 con un ensayo comercial CCK-8 (Cell Counting Kit 8, Dojindo Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los hepatocitos se sembraron en placas de 96 pozos y se dej3 estabilizar el cultivo por 24 h. Despu3s de este tiempo, se cambi3 el medio por un medio de cultivo sin SFB adicionando en cada pozo 100 μL y 10 μL del reactivo CCK-8 y se incub3 por 30 min en condiciones est3ndar de cultivo celular. El ensayo consiste en la reducci3n de una sal soluble de tetrazolio WST-8 mediante deshidrogenasas en la c3lula, lo cual es proporcional al

número de células viables, que da como producto un color naranja el cual se lee a 480 nm en un detector multimodal de placas DTX 880 (Beckman Coulter, Inc).

V.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

V.6.a) in situ.

Tejido fresco fue rápidamente seccionado, congelado en nitrógeno líquido, y se embebió en el compuesto de temperatura de corte óptima (OCT, Sakura Finetec, Torrance, CA). Posteriormente, se obtuvieron secciones de 10 micras y se incubaron en obscuridad durante 30 min, a 37°C, con diclorofluoresceína diacetato (DCFH, 5 mM), para la detección de peróxidos (H₂O₂), o con dihidroetidio (DHE, 3 μM) para la determinación de radical anión superóxido (O₂⁻). Las muestras se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, LSM 780 multifotónica, Jena, Alemania) a longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 530 nm, respectivamente, para DCFH y longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 630 nm, respectivamente, para DHE (Enriquez-Cortina *et. al.*, 2013).

V.6.b) En cultivo primario.

Los hepatocitos se sembraron en cubreobjetos de vidrio tratados con colágena, una vez estabilizados se incubaron durante 30 min, a 37°C, ya sea con 5 μM DCFH, para la detección H₂O₂, o con 3 μM DHE para la determinación del O₂. Los hepatocitos se observaron utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss, LSM 780 a longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 530 nm, respectivamente, para

DCFH y longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 630 nm, respectivamente, para DHE.

V.7 Determinación de lípidos en tejido hepático y hepatocitos.

V.7.a) Determinación de triglicéridos en tejido hepático.

El contenido de TG se realizó utilizando el ensayo comercial Serum Triglyceride Determination de Sigma-Aldrich (San Louis MO, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en la hidrólisis de los TG en glicerol y ácidos grasos libres por la lipasa. Posteriormente el glicerol producido sufre una serie de reacciones enzimáticas acopladas y genera un producto colorante (quinoneimina) que tiene una máximo de absorbancia de 540nm. El aumento en la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra.

Transcurrido el tratamiento de los ratones alimentados con la dieta Chow y la HC, se realizó un homogenado del hígado total el cual se lavó con PBS, y se sonicó con un pulsor (Sonicator Ultrasonic Processor XL2020, Misonix, CAN) dando 10 pulsos con una intensidad de 20% a 4°C. Del lisado celular se tomaron 50 µL en un tubo Eppendorf de 2 mL y se agregaron 800 µL de reactivo para glicerol libre y 10 µL de agua desionizada. Se mezcló suavemente por inmersión y se incubó 5 min a 37 °C. Se utilizó una curva patrón de glicerol (0-10 mg/mL). Las muestras se leyeron a una absorbancia inicial de 540 nm. Posterior a esto se le agregó 200 µL de reactivo de TG a la curva patrón y cada una de las muestras, nuevamente se mezcló suavemente por inversión y se incubaron a 37 °C por 5 min. Transcurrido el tiempo

se realizó una segunda lectura a una absorbancia de 540 nm contra la curva patrón (Hernandez *et. al.*, 2015).

V.7.b) Determinación de colesterol total en tejido hepático.

Se tomó una sección del hígado de los ratones alimentados con la dieta Chow y HC, inmediatamente se homogenizó en PBS. Se utilizó una curva patrón de colesterol (0-100 $\mu\text{g/mL}$). 100 μL de homogenado de hígado y la curva patrón se saponificaron con 200 μL EtOH-KOH 33% a 60 °C por 30 min. Después se agregaron 600 μL de agua destilada y 2 mL de hexano. Se colectaron 2 alícuotas de un 1mL de la capa superior que contiene el hexano y se puso a secar en Speed Vac (Savant, Cranbury, NJ USA). Enseguida se añadieron 800 μL de una solución de O-ftaldehído/acido acético (0.5mg/mL) y se dejó reposar por 1 min. Pasado el tiempo de reposo se añadió 1mL de ácido sulfúrico y la muestra se leyó a una absorbancia de 550 nm. Finalmente, los datos se normalizaron por cantidad de proteína (Rudel *et. al.*, 1973).

V.7.c) Detección de lípidos neutros en cultivo primario.

Para este experimento las células fueron sembradas en placas de 12 pozos (Corning) con medio de cultivo de Williams suplementado con 10 % de SFB. Las células se cultivaron en este medio toda la noche para permitir que se adhirieran completamente. Al día siguiente se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS. Para fijar las células se agregaron 0.4 mL por pozo de para-formaldehído (PFA) al 2.5% y se mantuvo durante 1 h. Pasado el tiempo, se retiró el PFA y las células se

lavaron con PBS. Las células se tiñeron con 0.4 mL de aceite rojo O al 0.2% por pozo durante 4 h. Finalmente cada pozo se lavó cuatro veces con H₂O desionizada y se realizó el registro fotográfico de ellos utilizando un microscopio de campo claro (Carl Zeiss, Jena, Alemania) (Hernandez *et. al.*, 2015).

V.7.d) Detección de colesterol libre en cultivo primario.

Para este experimento los hepatocitos se sembraron en cubreobjetos de vidrio tratados con colágena y dejándolos por 4h. Posteriormente a la estabilización del cultivo se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS. Las células se fijaron con PFA al 4% por 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el PFA y se lavó nuevamente con PBS. Para la detección de colesterol libre, los hepatocitos fijados se incubaron con una solución de albúmina sérica de bovino (BSA) al 1% diluida en PBS mas saponina al 0.2% por 15 min. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS y se colocó filipina a una dilución 1:100 en BSA al 0.1% en PBS por 60 min a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se hicieron tres lavados con PBS y el cubreobjetos se montó en un medio de montaje acuoso (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca). Finalmente, las células fueron examinadas en el microscopio confocal (Carl Zeiss, LSM 780 NLO, Jena, Alemania) (Mari *et. al.*, 2006).

V.8 Obtención de homogenado de tejido hepático, cultivo primario de hepatocitos o fracciones ricas en mitocondrias.

V.8.a) Homogenado celular de tejido hepático o cultivo primario.

Para la obtención del homogenado celular de tejido hepático se tomaron 100 mg

de hígado y se homogenizó en 500 μ L de PBS en frío. Se centrifugó a 1,017 xg por 30 seg. El sobrenadante fue desechado para eliminar restos del tejido conectivo y se recuperó el botón. Para el caso de los hepatocitos aislados estos fueron lavados dos veces con PBS para retirar los tratamientos con HGF, se levantaron las células con un gendarme de goma en 1.0 mL y se centrifugó. El sobrenadante fue desechado y se recuperó el botón que es donde se encontraban los hepatocitos.

V.8.b) Obtención de fracciones ricas en mitocondrias.

Aproximadamente 100 mg de tejido hepático se homogenizaron en un medio de aislamiento (220 mM de manitol, 70 mM de sacarosa, 2 mM de HEPES, 0.1% de BSA, EDTA 1 mM a pH 7.4) en frío. Las mitocondrias se obtuvieron mediante centrifugación diferencial según el siguiente procedimiento. El homogenizado se centrifugó a 1,017 xg durante 5 min. A continuación, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 10,700 xg durante 10 min. El botón se suspendió en el medio de aislamiento y se centrifugó a 3,600 xg durante 5 min. Posteriormente el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 17,000 xg durante 10 min. Finalmente el botón resultante se suspendió en un volumen pequeño de medio de aislamiento sin BSA (Rosas-Lemus *et. al.*, 2014).

V.9 Extracción y cuantificación de proteína total y mitocondrial.

Las fracciones ricas en proteínas, el homogenado de tejido y el botón de hepatocitos se trataron con 200 μ L del buffer de lisis M-PER (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas. El lisado se

centrifugó a 17,000 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se determinó la concentración de proteína total y mitocondrial mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Biotechnology, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomó una alícuota del 5 µL de las muestras y se le agregó 200 µL de reactivo BCA diluido 1:50 y se incubó por 30 min a 25 °C. Se realizó una curva patrón con BSA (0.1-0.5 mg/mL). Posteriormente, se leyó la absorbancia en el detector multimodal (DTX880) y se determinó la concentración de la proteína utilizando la curva estándar de BSA (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2014, Hernandez *et. al.*, 2015).

V.10 Electroforesis de proteínas y Western Blot.

Se tomó 100 µg de proteína y se le agregó un amortiguador de muestra 2X (Laemmli sample buffer, Bio Rad). Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS 0.1 %, en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, BioRad) a un voltaje de 120 V durante 90 min (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2014, Hernandez *et. al.*, 2015). La proteína fue transferida a una membrana de difloururo de polivinilideno (PVDF), (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 120 V por 2 h. Pasado este tiempo la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween por 1 h en agitación, después se realizaron dos lavados con TBS-Tween por 10 min en agitación constante y se incubó durante toda la noche en agitación constante a 4 °C con los anticuerpos primarios específicos que se enlistan en la tabla 1 durante toda la noche, en agitación constante y a 4 °C.

Transcurrido el tiempo se lavó 2 veces con TBS-Tween por 15 min y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) por 1 h. Después se lavó 2 veces por 10 min con TBS-Tween y 1 vez por 5 min con TBS. Se reveló utilizando el sustrato de alta sensibilidad immobilon (Millipore). Se detectó la luminiscencia y se cuantificaron las bandas usando el equipo Gel Logic 1500 imaging system, de Kodak (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2014, Enriquez-Cortina *et. al.*, 2013, Hernandez *et. al.*, 2015).

V.11 Determinación de proteínas oxidadas.

Para determinar el estrés oxidante, se utilizó el kit de detección de proteínas oxidadas Oxyblot de Millipore y se siguió el protocolo del fabricante. Se aisló y se cuantificó la proteína como se describe en el punto V.8.

Se utilizaron 20 μ g de proteína por cada muestra. Las muestras fueron derivatizadas a 2,4- dinitrofenilhidrazona por reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10 % por 1 h con el anticuerpo primario (1:150) que reconoce grupos carboxilos oxidados, terminado el tiempo de incubación se hizo un lavado con TBS-T por 10 min. Posteriormente se incubó por 1 h con el anticuerpo secundario (1:300). La membrana PVDF fue lavada 2 veces con TBS-T por 10 min. La membrana fue revelada usando un quimioluminiscente comercial (Roche). Posteriormente se hizo un análisis densitométrico de las bandas observadas utilizando el fotodocumentador 28 Gel Logi 1500 (Kodak, USA) (Gutierrez Ruiz *et. al.*, 2012, Hernandez *et. al.*, 2015).

Tabla 1. Anticuerpos empleados en Western blot				
	Primario	Peso kDa	Secundario	Marca
1	Actina	43	Ratón	Sigma, A3854
2	Bax	23	Conejo	Santa Cruz, sc-6236
3	Bcl-2	26	Conejo	Santa Cruz, sc-492
4	Bcl _{X_L}	30	Ratón	Santa Cruz, sc-8392
5	Catalasa	60	Ratón	Sigma Aldrich, c0979
6	Drp1	80	Ratón	Santa Cruz, sc-271583
7	G6PD	58	Conejo	Santa Cruz, sc-67165
8	γ-GCS	70	Conejo	Santa Cruz, sc-22755
9	GAPDH	37	Ratón	Millipore, mab374
10	GPx-1	22	Conejo	Abcam, ab22604
11	GPx 3/4/5	23	Cabra	Santa Cruz, sc-55102
12	GPx-4	22	Conejo	LSBio, LS-C56834
13	GSTM	26	Conejo	Santa Cruz, sc-292368
14	LC3B (I y II)	14,16	Conejo	Cell Signaling, 2775S
15	Mcl-1	32-40	Conejo	Santa Cruz, sc-819
16	Mnf1	84	Conejo	Abcam, ab104585
17	Mnf2	86	Ratón	Abcam ab56889
18	Nrf2	57-100	Conejo	Santa Cruz, sc-13032
19	OPA1	86-92	Conejo	Abcam, ab42364
20	p62/SQSTM1	60	Conejo	Cell Signaling, 5114
21	PGC-1 α	91-96	Conejo	Cayman, 101701
22	Pink-1	66	Conejo	Santa Cruz, sc-33796
23	SOD1	22	Conejo	Santa Cruz, sc-11407
24	SOD2	22	Conejo	GeneTex, GTX116093
25	STAT3 (Y705)	88	Conejo	Abcam, ab76315
26	STAT3 (S727)	88	Ratón	Abcam, ab30647
27	STAT3	88	Conejo	Abcam, ab32500

V.12 Determinación de colesterol total en mitocondrias.

Posteriormente a la obtención de las fracciones mitocondriales de los ratones alimentados con las dietas HC y Chow como se indica en el punto V. 8.a, la pastilla obtenida se homogenizó en 100 μ L de PBS y se determinó el colesterol total indicado en el apartado V.7b. Del mismo modo, los datos se normalizaron por cantidad de proteína (Rudel *et. al.*, 1973).

V.13 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Para identificar los cambios morfológicos de las mitocondrias por efecto del tratamiento, se realizó un análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Una fracción del hígado se fijó en glutaraldehído al 3% en PBS a pH 7.4 y se mantuvo a 4 °C por 6 h. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un lavado con PBS. Los cortes de hígados fijados y lavados fueron sometidos a un proceso de post-fijación con tetróxido de osmio al 1% durante 1 h. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30-100%). Las muestras se mantuvieron por 15 min en cada concentración de alcohol. Se dejó toda la noche en una inclusión de resinas epóxicas. Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de grosor, los cuales fueron tratados con acetato de uranilo al 2% durante 40 min y citrato de plomo al 0.5% por 10 min. Las muestras fueron finalmente estudiadas y microfotografiadas en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1200EXII (Das *et. al.*, 2012).

V.14 Potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

El $\Delta\Psi_m$ se midió mediante dos diferentes métodos, por los cambios en la fluorescencia de la safranina en mitocondrias aisladas y por microscopía confocal utilizando MitoRed (Invitrogen, CA) en hepatocitos.

V.14.a) En cultivo primario.

Para evaluar el $\Delta\Psi_m$ en los hepatocitos aislados, las células viables se sembraron en cámaras Lab-Tek de vidrio tratadas con colágena, a una densidad de 254,000 células/cm² y se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ por 4 h, posteriormente se cambió el medio de adhesión por medio fresco. Las células se cultivaron en este medio toda la noche para permitir la estabilización del cultivo. Al día siguiente se retiró el medio y se lavó dos veces con PBS (Gomez-Quiroz *et. al.*, 2008). Los hepatocitos se incubaron durante 30 min, a 37°C, con MitoRed (100 mM), posteriormente las células se lavaron con PBS y finalmente fueron estudiadas y microfotografiadas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 710 NLO a longitudes de onda de excitación y emisión de 559 y 588 nm, respectivamente.

V.14.b) En fracciones ricas en mitocondrias.

El medio de reacción para evaluar el $\Delta\Psi_m$ en mitocondrias aisladas contenía 220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2mM HEPES, 10 mM Succ, 10 mM Pi, 10 mM KCl, 10 mM safranina-O. Cada trazo se inició con 100 μ g de mitocondrias y los cambios de absorbancia de la safranina-O se registraron en un espectrofotómetro

OMEGA a 511-533 nm. 5 μ M del desacolplante cianocarbonil-m-cloro-fenilhidrazona (CCCP) fue añadido al final de cada trazo (Cano-Ramirez *et. al.*, 2012).

V.15 Determinación de ATP.

Las concentraciones de ATP hepáticas se determinaron colorimétricamente en homogenados de hígado de ratones Chow y HC utilizando el ensayo comercial ATP Assay Kit (Colorimetric/Fluorometric) (Abcam, MA, USA) según las instrucciones del fabricante. Se lisaron 30 mg de hígado en el amortiguador que viene en el ensayo y se centrifugó a 13,000 xg durante 2 min para sedimentar los materiales insolubles. Las muestras se desproteinizaron con PCA-KOH para evitar la interferencia de proteínas. El sobrenadante se colocó en una placa de 96 pozos y se le adicionó 50 μ L de la mezcla de reacción por cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. La absorbancia se leyó a 570 nm usando un detector multimodal DTX 880 (Beckman Coulter). El contenido de ATP se determinó contra la curva patrón generada al mismo tiempo.

V.16 Actividad de caspasa 3.

Para determinar la actividad de la caspasa 3, se utilizó el ensayo comercial Ac-DEVD-AMC Caspase-3 Fluorogenic Substrate BD de Pharmagen y se siguió el protocolo del fabricante. El ensayo está diseñado para medir, un marcador temprano de las células que experimentan apoptosis. Contiene un sustrato de caspasa 3 fluorogénico (Ac-DEVD-AMC), que es un sustrato tetrapéptido fluorogénico sintético (PM = 675 Daltones; pureza \geq 98%) que se utiliza para identificar y cuantificar la

actividad de la caspasa 3 en lisados de células apoptóticas. La caspasa 3 corta el tetrapéptido entre D y AMC, liberando el AMC fluorescente que se puede cuantificar en los lisados celulares por espectrofluorometría ultravioleta (UV) usando una longitud de onda de excitación de 380nm y un rango de longitud de onda de emisión de 420-460nm.

Para este ensayo se homogenizó una sección de hígado en amortiguador de lisis cuya composición es Tris-HCl 10 mM; NaH₂PO₄ / NaHPO₄ 10mM (pH 7.5); NaCl 130mM; 1% Triton®-X-100; NaPPi 10mM (pirofosfato de sodio) y se dejó en hielo por 30 min.

Se utilizó una placa de 96 pozos, se depositó 20 µL del lisado, posteriormente se añadió 5 µL de Ac-DEVD-AMC a cada pozo y se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente se midió la cantidad de AMC liberado de Ac-DEVD-AMC usando un detector multimodal DTX 880 (Beckman Coulter) a una longitud de onda de excitación de 380nm y una de emisión con un rango de 420-460nm.

V.17 Determinación de HGF en suero.

El contenido de HGF en suero fue realizado mediante ELISA utilizando el ensayo comercial ratón/rata o humano, HGF Quantikine Immunoassays (R&D systems, Minneapolis, MN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

V.18 Inmunodetección de c-Met.

Los hepatocitos se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio tratados con colágena, una vez estabilizadas las células se fijaron con formalina neutra al 10% en

PBS durante 10 min, se bloqueó con una solución que contenía BSA al 5% y Triton X-100 al 3% durante 30 min. Posteriormente las células se lavaron con PBS-tween durante 5 min y se colocó el anticuerpo específico para c-Met (R&D, 74225) diluido 1:50 en PBS que contenía 0.1% de BSA y se incubó toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Las células fueron lavadas con PBS-Tween por 5 min posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa durante 1 h a temperatura ambiente en obscuridad. Las células se lavaron nuevamente con PBS-Tween y se incubó con DAPI por 5 min. Finalmente, las células fueron examinadas usando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., USA).

V.19 Determinación de las actividades enzimáticas.

Los hepatocitos se sembraron a una densidad de 400,000 cel/cm² en cajas Petri con medio Williams suplementado con antibiótico y antimicótico (W+AB/AM), se trataron o no con HGF 50 ng/mL durante 24 h. Las células fueron lavadas dos veces con PBS para retirar los tratamientos, se levantaron con un gendarme de goma en 1.0 mL de la solución de PBS y fueron transferidas a un tubo cónico, el cual fue colocado en una cama de hielo. Las células se fragmentaron mediante sonicación con dos pulsos de 30 seg utilizando un sonicador Ultrasonic Processor XL2020 (Misonix, CAN). Del lisado celular se tomó 20 µL para la determinación de proteína por el método de BCA antes descrito y el resto se centrifugó a 100,000 xg por 90 min a 4°C en una ultracentrifuga Beckman (TLX). Las actividades de las enzimas fueron determinadas en el sobrenadante obtenido.

V.19.a) Actividad de la Catalasa.

La actividad enzimática de catalasa se determinó por el método de Beers y Sizer (1952) basado en la utilización del peróxido de hidrógeno como sustrato. Se tomaron 10 μ L de muestra y se agregaron 1.990 mL de agua, se dejó incubar por 2 min a 25 °C, posteriormente se adicionó 1 mL de una solución compuesta de H₂O₂ 59 mM y PBS 0.05 M a pH 7.0. La absorbancia de la muestra se leyó inmediatamente a una longitud de onda de 240 nm en el espectrofotómetro, se repitió la lectura pasado un minuto. Los resultados se expresan como U/mg de proteína.

V.19.b) Actividad de la Superóxido Dismutasa total.

La actividad de SOD se determinó por el método de Winterbourn (1975) el cual se basa en la habilidad de la enzima para inhibir la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el radical superóxido el cual es generado por la reacción de foto-reducción de la riboflavina y el oxígeno. En una serie de tubos de ensayo se preparó la mezcla de reacción formada por la muestra en diferentes volúmenes que fueron desde 5 hasta 300 μ L, 0.2 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 M, 0.1 mL de NBT 1.5 mM y PBS 0.067 M a pH 7.8, teniendo un volumen final de 3.0 mL. Los tubos se colocaron en una cámara iluminada con lámparas fluorescentes de 15 W por un periodo de 10 min. Pasado este tiempo se agregó 0.05 mL de riboflavina 0.12 mM a los tubos de ensayo y se incubaron en la misma cámara por 20 min más. Al final de este período las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 560 nm de longitud de onda (Winterbourn *et. al.*, 1975).

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

$$\text{Unidades/mg} = \frac{1000}{\text{Vol. que resulta de la } \frac{1}{2} \text{ de max. inhibición}}$$

Los resultados fueron reportados como mU/mg de proteína.

V.20 Determinación de GSH/GSSG por HPLC.

El contenido de GSH y GSSG de la muestra se determinó por HPLC como se describe por Gómez Quiroz et al 2008 . Brevemente, se sembraron 4×10^5 células en cajas de Petri con medio con medio W+AB/AM y se trataron o no con HGF 50 ng/mL (0-24 h). Las células fueron lavadas dos veces con PBS para retirar los tratamientos, se levantaron las células con un gendarme de goma en 1.0 mL de ácido perclórico al 10%, se sonicaron y se centrifugaron a 5000 xg por 5 min a 4 °C. Después al sobrenadante de cada muestra y los estándares se le añadió 1mL de una solución que contenía 100 mM de ácido iodoacético y 0.2 mM de m-cresol y se ajustó el pH a 9.0. Las muestras y los patrones se incubaron en la oscuridad durante 1 h seguido por la adición de 1 mL de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno al 1% en etanol grado HPLC. Del sobrenadante se tomaron 100 µL y se procedió al análisis por un sistema de HPLC (Waters, EUA), utilizando una columna 3-amino propilo (5 µm; 4,6 mm 20 cm; Custom LC , Houston , TX). La fase móvil utilizada fue una solución amortiguadora de acetato ajustada a pH=3 (Gomez-Quiroz *et. al.*, 2008).

V.21 Análisis estadístico.

Cada experimento se realizó al menos por triplicado usando al menos 3 animales de experimentación. Los datos son expresados como la media \pm EE y fueron procesados con el programa estadístico Graph Prism versión 6. Las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante una *t* de student, seguido por la prueba post hoc no paramétrica de U Mann-Whitney, la diferencia entre medias se consideró significativa con $p \leq 0.05$.

VI. RESULTADOS.

VI.1 La ingesta elevada de colesterol induce acumulación de lípidos y daño hepático.

Con la finalidad de determinar los efectos de la ingesta por 30 días de la dieta hipercolesterolémica (HC) (2% colesterol 0.5% colato de sodio) en los hígados de ratones de la cepa C57BL/6, se extirpó el órgano y se pesó. Los hígados de los ratones alimentados con la dieta HC mostraron un incremento en el tamaño, además de presentar una atrofia de la vesícula biliar, litiasis, y un cambio en la coloración, adquiriendo un tono más pálido (Fig. 10B) en comparación con el hígado sano, que mostró una coloración característica rojiza (Fig. 10A). Sin embargo, el aumento del tamaño del hígado no modificó el peso del ratón. (Fig. 10C).

La observación microscópica de los cortes del tejido hepático teñidos con hematoxilina y eosina muestra un desarreglo en la arquitectura hepática, el tejido muestra un aumento en las células binucleadas, característica indicativa de los

hepatocitos en regeneración, asimismo éstos presentan hipertrofia celular, además se observan numerosos hepatocitos hiper Cromáticos y condensados (Fig. 11D) comparado con histología normal del hígado de animales alimentados con la dieta Chow (Fig. 11C).

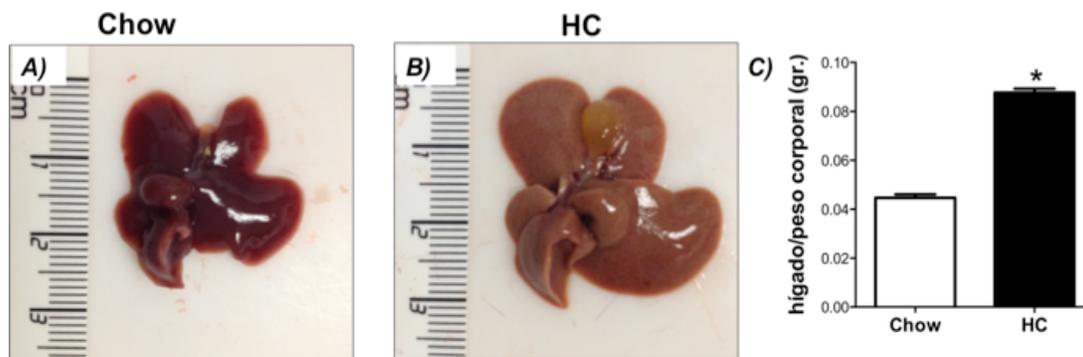


Figura 10. La dieta HC genera cambios morfológicos y un incremento en el peso del hígado. Morfología macroscópica de los hígados de ratones alimentados durante 30 días con una A) dieta balanceada (Chow) y una B) dieta alta en colesterol (HC). Determinación del D) cociente del peso del hígado/ peso corporal. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Las columnas muestran el promedio \pm EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratones alimentados con la dieta Chow.

Posteriormente al realizar un análisis morfométrico en las histologías de los hígados, se observó que la dieta HC induce un incremento de hasta 4 veces la cantidad de células muertas (Fig. 11E), en comparación con los ratones Chow sugiriendo un aumento de la muerte celular. Sin embargo, las muestras de los animales con dieta HC presentan un 25% de células en regeneración, a diferencia del 1% en los hígados Chow, lo cual sugiere que existe un mecanismo de compensación al aumentar la regeneración del tejido en donde hay una mayor cantidad de células muertas.

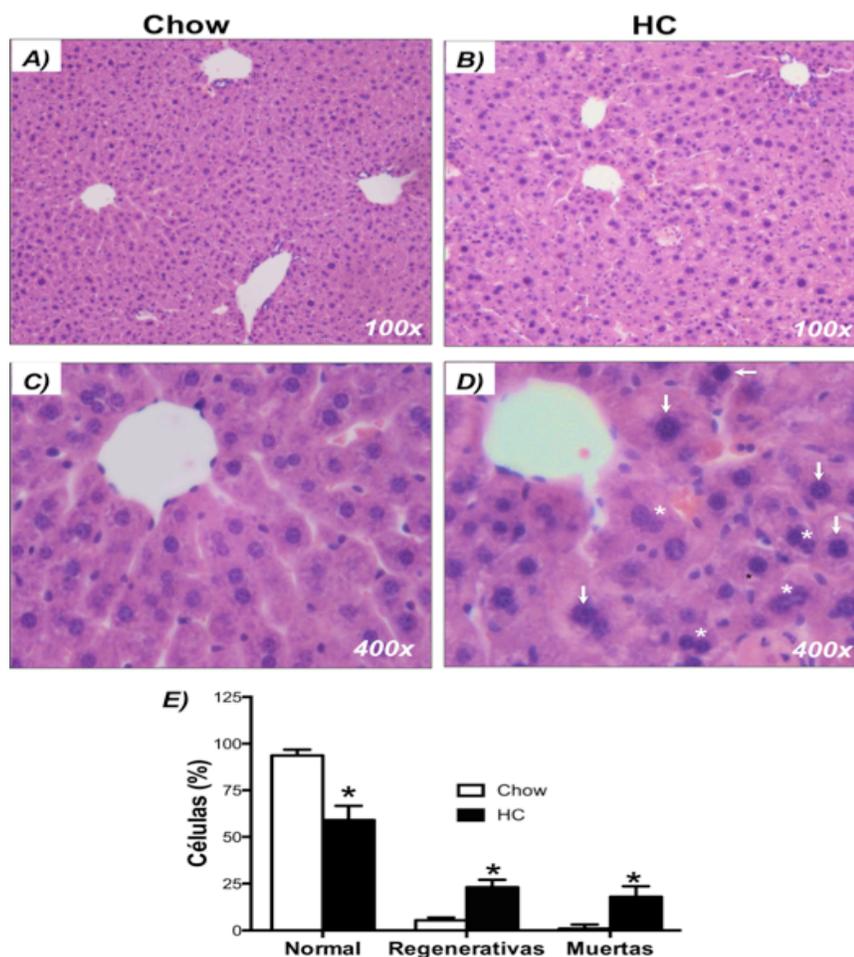


Figura 11. La sobrecarga de colesterol induce daño tisular en el hígado. Tinción con H & E (100x y 400x, 5 micras poner la rayita que corresponda 5 micras), A y C) apariencia histológica normal del hígado Chow. B y D) Hígado HC mostrando numerosos hepatocitos con núcleos condensados y hiper cromáticos (picnóticos) (flecha) y algunas células binucleadas indicativos de los hepatocitos regenerativos (asterisco). E) Análisis morfométrico, se incluyeron al menos cinco campos de cinco hígados por tratamiento. Las imágenes son representativas de al menos 5 experimentos independientes. Las columnas muestran el promedio \pm EE de al menos 4 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs hepatocitos de ratones alimentados con la dieta Chow.

Para corroborar la presencia de esteatosis se evaluó la concentración de lípidos en el tejido hepático y los hepatocitos aislados. Los resultados mostraron que los

hígados HC incrementan 4.1 veces la concentración de TG (Fig. 12B) y hasta 6.2 veces las concentraciones de colesterol total (Fig. 12A) con respecto a sus controles.

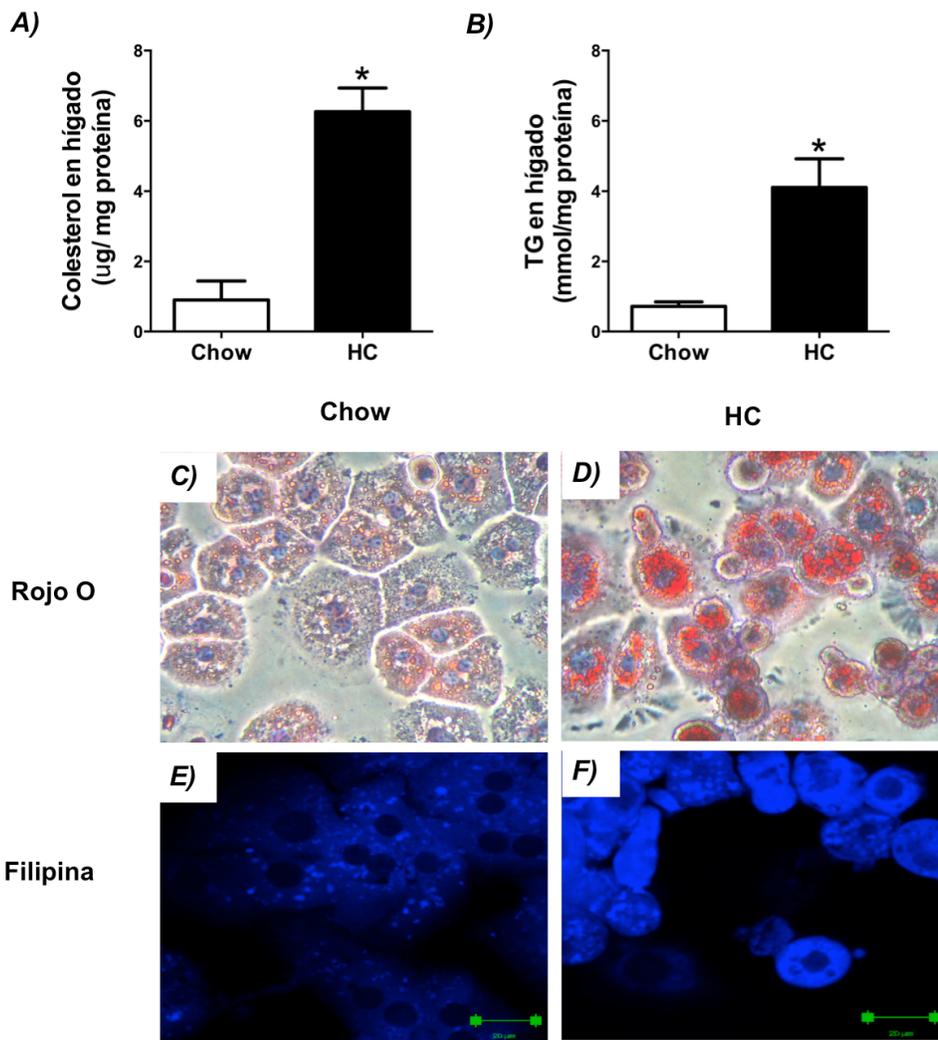


Figura 12. La dieta aterogénica induce la acumulación de lípidos. Los TG y el colesterol fueron cuantificados en homogenado de hígado de ratones alimentados con la dieta Chow y HC por espectrofotometría. Para la cuantificación de B) triglicéridos (TG) se realizó usando un ensayo comercial y el B) colesterol total se determinó utilizando o-ftaldehído. El contenido de lípidos en cultivo primario se determinó por C-D) tinción con rojo O para detección de lípidos neutros y D-E) tinción con filipina (0.05 mg/mL) para colesterol libre. Las columnas muestran el promedio \pm EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs hígados de los ratones alimentados con la dieta Chow. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

También fueron caracterizados los lípidos en hepatocitos para corroborar que el aislamiento no modifica la acumulación de lípidos encontrada en el tejido hepático, por ello se determinó mediante la tinción con aceite rojo O, el contenido de lípidos neutros (Fig. 12C-D) y con filipina, el contenido de colesterol (Fig. 12E-F). Los resultados muestran que los hepatocitos que provienen de los ratones alimentados con la dieta HC presentan un mayor contenido tanto de lípidos neutros como de colesterol libre (Fig. 12 D y F).

La lipotoxicidad ocasionada por la acumulación de grasa en tejidos no adiposos como el hepático está asociada con la disfunción celular y la apoptosis (Videla, 2009). Corroboramos el daño producido por la sobrecarga de lípidos, realizando una prueba de viabilidad en hepatocitos aislados, la cual se ve disminuida en un 50% en los hepatocitos de los ratones alimentados con la dieta HC con respecto a los hepatocitos Chow (Fig. 13).

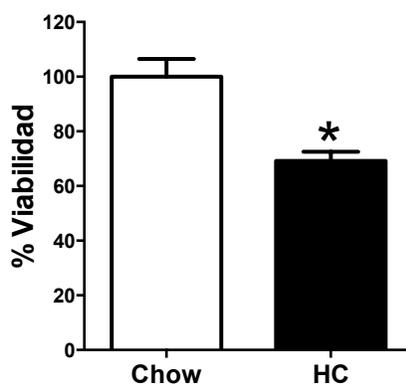


Figura 13. La acumulación de lípidos induce disminución en la viabilidad de los hepatocitos. La viabilidad de los hepatocitos aislados se realizó el ensayo CCK-8. La sobrecarga de lípidos en los hepatocitos de los animales alimentados con una dieta HC disminuyen la viabilidad. Las columnas muestran el promedio \pm EE de al menos 8 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs hepatocitos de ratones alimentados con la dieta Chow.

El daño hepático por acumulación de lípidos fue confirmado mediante la cuantificación de las concentraciones séricas de marcadores de daño hepático como son las transaminasas AST y ALT y de funcionalidad hepática la ALF. En la gráfica 12A, los ratones HC muestran una elevación de diez veces la actividad de ALT mientras que la gráfica 14B muestra un aumento de hasta dos veces la de AST. Así mismo en la figura 14, también se observa el aumento de tres veces la concentración de la ALF, estos resultados confirman que la acumulación de lípidos resultado de la ingesta de la dieta HC provoca daño y disfunción en el hígado.

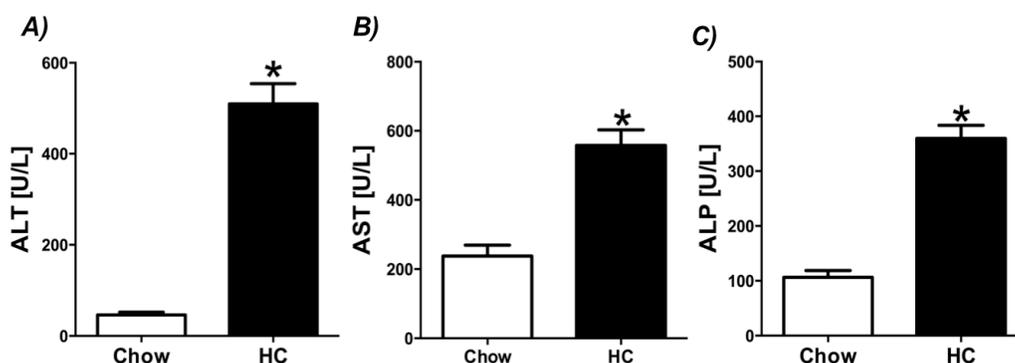


Figura 14. La acumulación de lípidos inducidos por la dieta HC produce daño hepático. La actividad de la alanino amino transferasa (ALT), aspartato amino transferasa (AST), y fosfatasa alcalina (ALP) en suero determinadas mediante la utilización de tiras reactivas específicas muestra un incremento en los animales con dieta HC. Las columnas muestran el promedio \pm EE de al menos 5 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratones alimentados con la dieta Chow.

VI.2 La sobrecarga de colesterol induce estrés oxidante.

Una de las principales consecuencias de la acumulación de colesterol es la generación de las ERO (Mari *et. al.*, 2006), por lo que se determinaron estas especies en el tejido hepático de los ratones. Las secciones de hígado frescos incluidos en OCT fueron tratados con DHE y DCFH. La figura 15B muestra un

aumento en la fluorescencia en los tejidos de hígado HC al ser tratados con DHE, una sonda fluorescente permeable a las células que reacciona principalmente con el anión superóxido (O_2^-). Sin embargo, se observa un mayor incremento en la fluorescencia emitida por la 2',7'-dicloro-fluoresceína (Fig. 15D), como consecuencia de su oxidación por la presencia de H_2O_2 , comparado con sus controles.

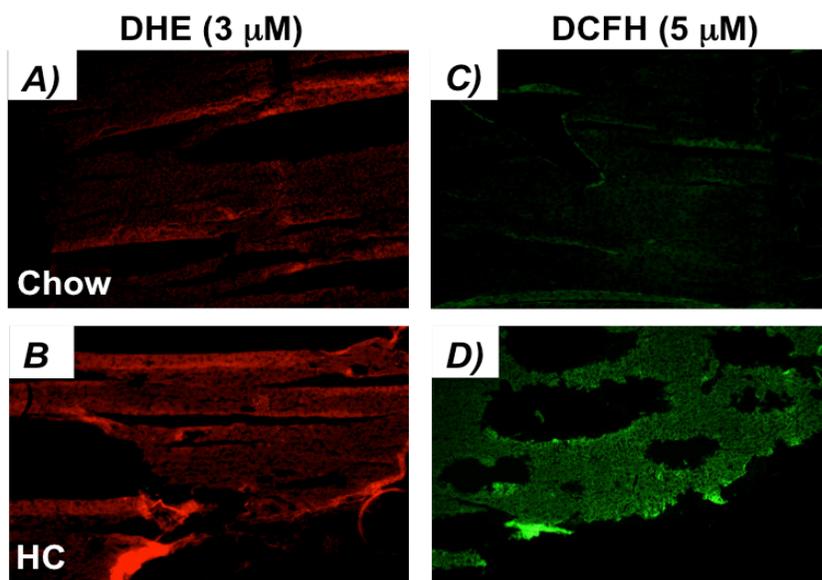


Figura 15. La sobrecarga de colesterol induce un incremento de las ERO. Secciones de hígado fresco embebidas en OCT fueron tratadas con dihidroetidio (DHE) (A y B) o con y las 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH) (C y D). Las muestras fueron observadas por microscopía confocal siguiendo el procedimiento descrito en la sección de material y metodología. Las micrografías muestran un incremento en la presencia de anión superóxido (B), así como de H_2O_2 (D) en los cortes de hígados con dieta HC. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

Debido al aumento de ERO mostrado en las imágenes anteriores, y con la finalidad de evaluar algunas proteínas encargadas de la detoxificación de las ERO se realizó una serie de WB de proteínas antioxidantes y de citoprotección. La figura 16 muestra que la dieta HC disminuye la expresión de Nrf2 y superóxido dismutasa 1 (SOD1), proteínas involucradas en la protección contra el estrés oxidante (Clavijo-

Cornejo *et. al.*, 2013). Sin embargo la dieta HC induce la expresión de la superóxido dismutasa 2 (SOD2), sugiriendo en gran medida la disminución en la producción de superóxido a nivel mitocondrial (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2014). Del mismo modo, hay un aumento en la expresión de la GSH transferasa (GST), enzima encargada del procesamiento de xenobióticos. Interesantemente, se encontró un efecto dual de la dieta en la cantidad de GPxs. Los resultados muestran una expresión diferencial entre las isoformas 1 y 4 en los ratones que recibieron la dieta HC. Mientras que la GPx1 se encuentra disminuida, la GPx4 se incrementa notablemente su expresión en los hígados HC. Finalmente la catalasa no mostró cambio alguno.

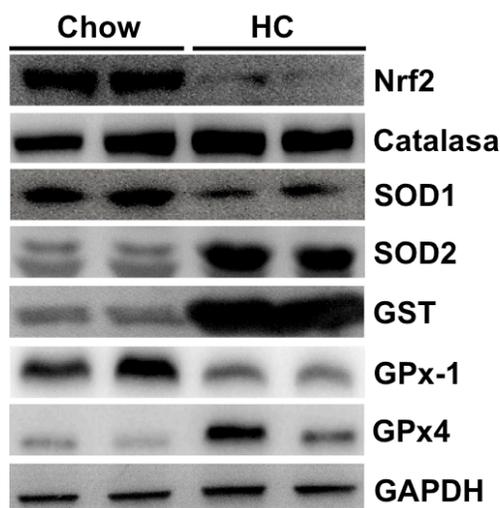


Figura 16. Expresión de proteínas antioxidantes y citoprotectoras. La proteína total se aisló a partir de tejido hepático de ratones alimentados con dieta Chow y dieta HC y se llevó a cabo el análisis por Western blot como se especifica en material y métodos. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La GAPDH se usó como control de carga

Para determinar si la dieta HC ejercía un efecto oxidante, se determinó la oxidación de las proteínas, como resultado final del aumento de las ERO. Este ensayo se realizó en lisado celular total y en fracciones ricas en mitocondrias (Fig.

17A-B) debido al contenido diferencial encontrado en las enzimas citosólicas y mitocondriales (Fig. 15). En la gráfica se puede observar que los lisados totales de los hígados de los ratones HC aumentan en un 40% la cantidad de grupos carbonilos (Fig. 17C) como producto final de la oxidación proteica, indicando así, que la dieta HC genera un estado pro-oxidante en el tejido hepático. Sin embargo, en las fracciones mitocondriales la oxidación de proteínas tuvo un efecto contrario, ya que disminuyó hasta en un 25% en los lisados provenientes de hígados HC.

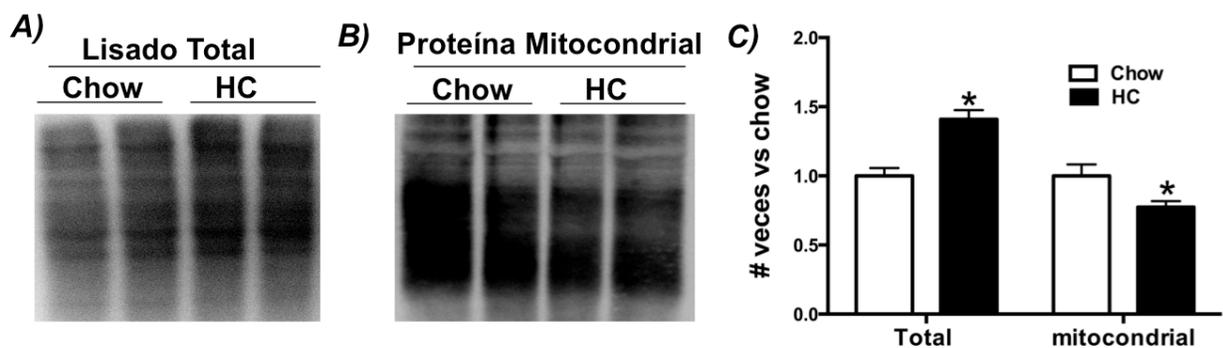


Figura 17. La dieta HC tiene un efecto dual sobre la oxidación proteica. Se determinó el contenido de proteínas oxidadas en lisado total celular y fracción mitocondrial mediante un kit comercial Oxyblot siguiendo las instrucciones del fabricante. Las imágenes muestran un incremento en la oxidación de proteínas en el lisado total (A) y una disminución de las proteínas oxidadas en el lisado mitocondrial (B). La densitometría de los resultados se muestra en (C). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Las columnas muestran el promedio \pm EE del análisis densitométrico de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs proteínas de los ratones alimentados con la dieta Chow.

VI.3 El incremento en el colesterol produce cambios morfológicos, biogénesis mitocondrial y pérdida del balance energético.

Cabe señalar que la SOD2 y la GPx-4, son enzimas mitocondriales que incrementan en respuesta al estrés que presenta el organelo, (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2014, Cole-Ezea *et. al.*, 2012), lo cual sugiere una fuerte participación de la

mitocondria, en el daño producido por la sobrecarga de lípidos. Por ello se evaluó la estructura, morfología y función de la mitocondrial hepática en los animales alimentados con las diferentes dietas. Para comenzar estimamos el contenido de colesterol que se encontraba en las mitocondrias, y la figura 18 muestra un aumento de hasta 2 veces las concentraciones de colesterol total.

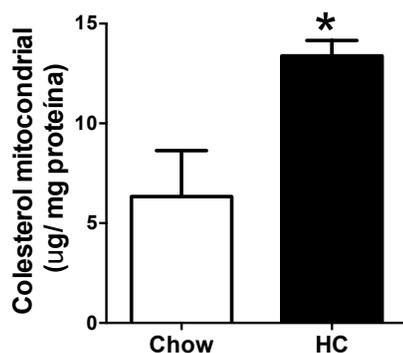


Figura 18. La dieta HC incrementa el de colesterol en las mitocondrias. El colesterol mitocondrial se cuantificó en homogenado de fracciones mitocondriales de ratones alimentados con dieta HC y Chow. El contenido de colesterol presentó valores de prácticamente dos veces en las mitocondrias de animales alimentados con dieta HC. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 4 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs mitocondrias de los ratones alimentados con la dieta Chow

Posteriormente con la finalidad de evaluar el efecto del aumento en el contenido de colesterol mitocondrial se determinó el balance energético de las mitocondrias. Se analizó el $\Delta\Psi_m$ en hepatocitos y en mitocondrias aisladas. En hepatocitos se realizó con MitoRed, que es permeable a la membrana celular (Fig. 19A-C). La intensidad de fluorescencia de estos fluoróforos depende del $\Delta\Psi_m$. La figura 18B muestra como la dieta alta en colesterol provoca una disminución de la intensidad del fluoróforo como consecuencia de la pérdida del $\Delta\Psi_m$ en los hepatocitos aislados. Al determinarlo en mitocondrias aisladas utilizando safranina, encontramos el mismo efecto, ya que hay

una disminución de la incorporación de la safranina en un 50% (Fig. 19C) en las mitocondrias de los ratones alimentados con la dieta HC. Por otro lado al evaluar el contenido de ATP en secciones de hígado (Fig. 19D), se encontró una reducción del 60% en los ratones HC.

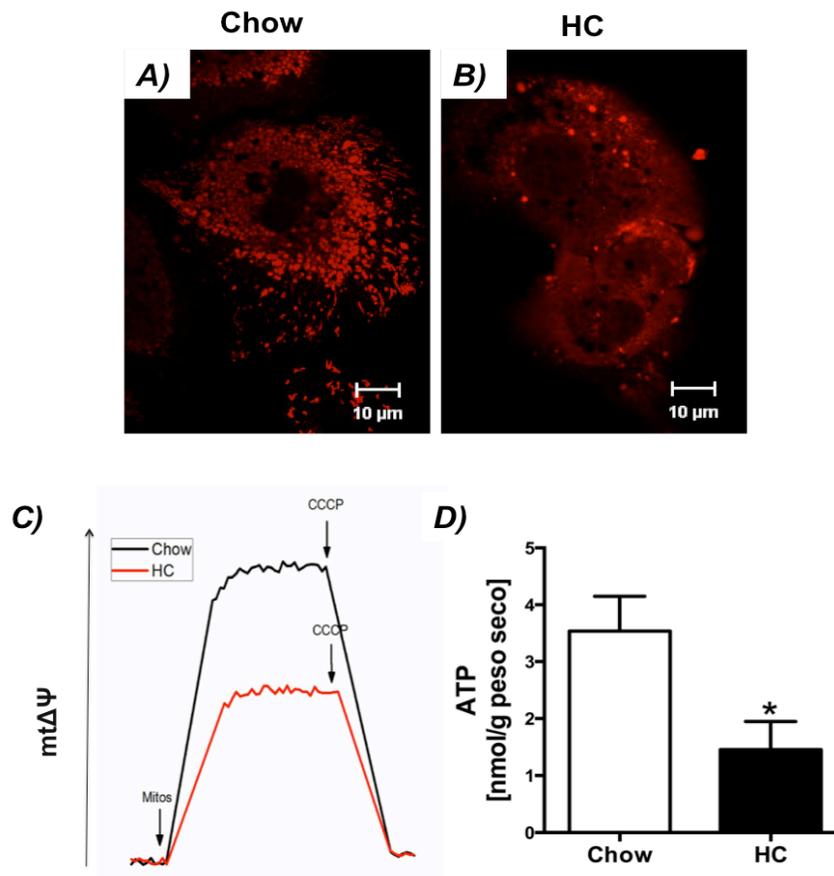


Figura 19. La acumulación de colesterol mitocondrial compromete energéticamente a las mitocondrias. Microscopías confocales de hepatocitos aislados de ratones A) Chow y B) HC incubados con MitoRed (100 nM) por 30 min. C) El $\Delta\psi_m$ se estimó a través de cambios de fluorescencia en safranina-O en mitocondrias aisladas. D) El contenido de ATP se determinó utilizando el ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Se encontró una disminución en el contenido de ATP en el hígado de los ratones con dieta HC. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 4 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratones alimentados con la dieta Chow.

Los datos anteriores nos indican que la dieta HC genera un déficit energético y en consecuencia un daño a nivel mitocondrial. En condiciones de estrés, así como en múltiples enfermedades, la mitofagia es particularmente relevante para la célula gracias a la degradación de mitocondrias disfuncionales y/o dañadas (Pi *et. al.*, 2013), que son potencialmente peligrosas para las células.

El siguiente punto a determinar fue evaluar por WB las principales proteínas involucradas en el proceso de mitofagia. La figura 20 muestra que la dieta HC no induce cambio alguno en la expresión de proteínas como Pink-1, proteína que actúa como receptor de la proteína ubiquitin ligasa Parkin, que permite la ubiquitinización de proteínas de la membrana mitocondrial. Del mismo modo, tampoco hay cambio en la expresión de proteínas de activación de la autofagia como LC3II y p62, siendo esta última la que interactúa con las proteínas ubiquitinadas de la mitocondria y se une a la proteína LC3 para formar el autofagosoma (Saito *et. al.*, 2015). Por otro lado, nuestros datos muestran que la dieta HC disminuye el contenido de las proteínas mitofusina 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2), proteínas que además de participar en la fusión mitocondrial también participan activamente con Parkin en el proceso de mitofagia (Chen *et. al.*, 2013, Gegg *et. al.*, 2010).

Los datos anteriores muestran que las mitocondrias se encuentran dañadas (Fig. 19) y la figura 20 sugiere que no se está llevando a cabo la degradación mitocondrial por mitofagia. Para corroborar esto se observó la estructura mitocondrial mediante TEM. En las microfotografías de los ratones alimentados con las dos dietas no se observa la formación de autofagosomas (Fig. 21A-D), lo cual está acorde con los

datos anteriores encontrados por WB (Fig. 20). Además se pueden apreciar las microgotas de grasa, una característica más de la esteatosis, en los hígados de los ratones alimentados con una dieta HC (Fig. 21C).

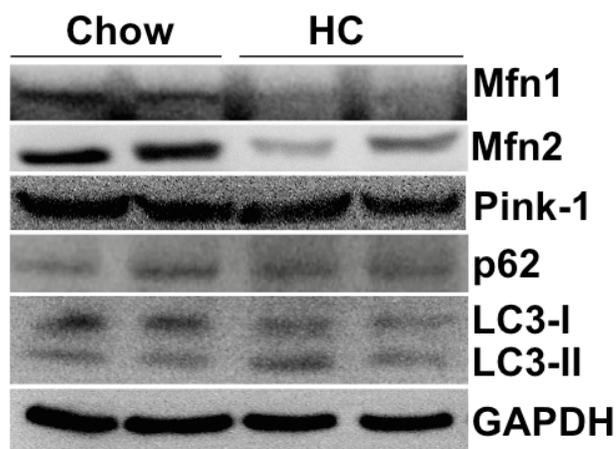


Figura 20. Determinación del contenido de proteínas relacionadas con la mitofagia. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático de ratones alimentados con dieta Chow y HC. Se llevó a cabo el análisis por Western blot de Mfn1, Mfn2, Pink-1, p62, LC3-I, LC3-II como se especifica en material y métodos. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La GAPDH se usó como control de carga.

Las mitocondrias muestran una forma irregular, algunas de ellas acortadas e hinchadas (Fig. 21D) en comparación con las mitocondrias controles (Fig. 21B). Se determinó el tamaño y número de mitocondrias (Fig. 21E) utilizando el programa ImageJ. La gráfica muestra que los ratones HC tienen una disminución en un 60% en el tamaño de las mitocondrias. Sin embargo, se encontró un aumento en el número de mitocondrias elevándose en un 100% más con respecto a las controles.

Con el fin de estudiar a que se debía en incremento de las mitocondrias en los hígados de los ratones HC se determinó el contenido de PGC1- α , Drp1 y OPA1, estas dos últimas encargadas de la dinámica mitocondrial. La figura 22 muestra un aumento en PGC-1 α , proteína principal de la biogénesis mitocondrial. Del mismo

modo se muestra un incremento en la proteína Drp1, proteína ejecutora de la fisión mitocondrial. Finalmente la imagen muestra una disminución de OPA1, proteína encargada de la fusión mitocondrial.

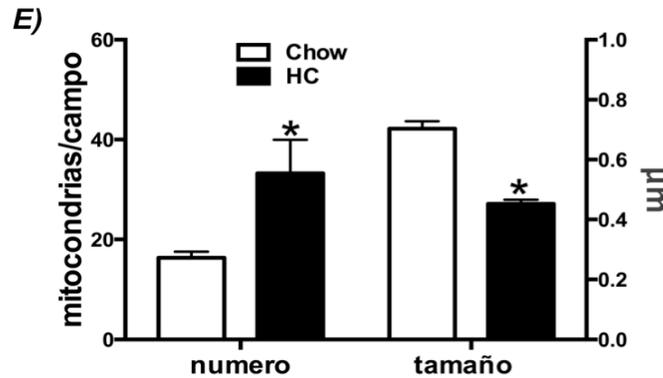
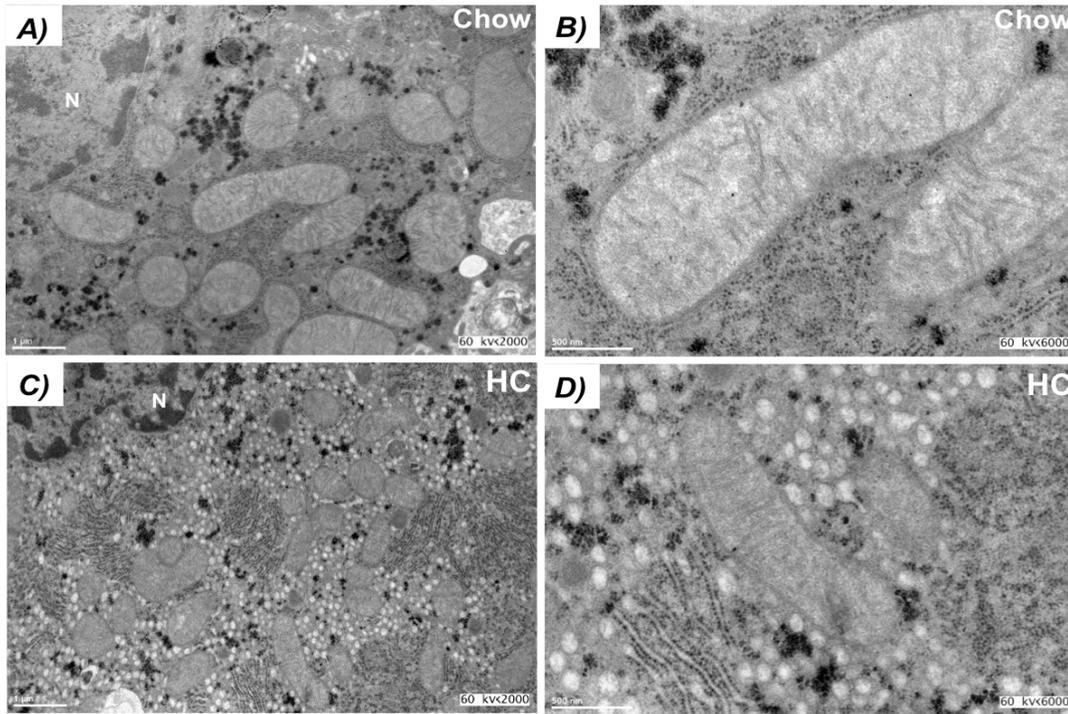


Figura 21. La sobrecarga de colesterol induce cambios morfológicos en las mitocondrias. Microfotografía de mitocondrias de hígados de ratones A y B) Chow y C y D) HC. E). En el hígado de animales con dieta HC se encuentra alteración en la morfología e incremento en el número de mitocondrias determinado por el programa ImageJ. Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 4 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratones alimentados con la dieta Chow.

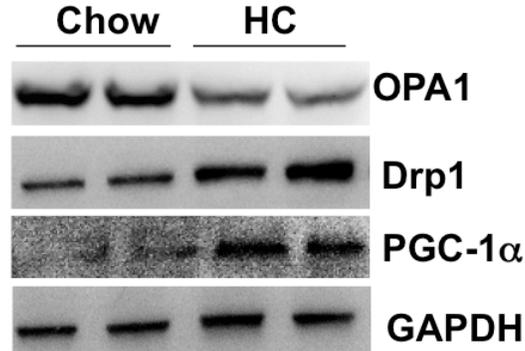


Figura 22. La dieta HC induce fisión y biogénesis mitocondrial. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático de ratones alimentados con dieta Chow y HC. La proteína total se sometió a un análisis por Western blot para determinar las proteínas OPA1, Drp 1 y PGC-1 α . La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La GAPDH se usó como control de carga.

VI.4 La sobrecarga de lípidos inhibe la apoptosis vía la activación del factor transductor de señal y activador de transcripción (STAT3).

Bajo condiciones de estrés la célula tiene la capacidad de repararse a sí misma reemplazando las mitocondrias dañadas para evitar la muerte innecesaria, a través de la mitofagia. Sin embargo, si la mitofagia se inactiva o es superada por el número de mitocondrias dañadas, entonces la célula activará el proceso de apoptosis y este se convertirá en la vía dominante de muerte para minimizar el daño (Kubli *et. al.*, 2012).

Para evaluar si la dieta HC induce la apoptosis de las células hepáticas en los hígados HC, se determinó la expresión de las proteínas implicadas en la apoptosis celular. El WB de la figura 23 muestra el incremento de la proteína pro-apoptótica BAX, además de la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 sugiriendo un aumento en la apoptosis en los hígados de los ratones HC, sin embargo al evaluar la actividad de la caspasa 3 (Fig. 23B), esta proteína considerada como la ejecutora de

la apoptosis, observamos que no hay cambio alguno, lo cual indica que no se está llevando la apoptosis en las células hepáticas de los ratones que recibieron la dieta HC.

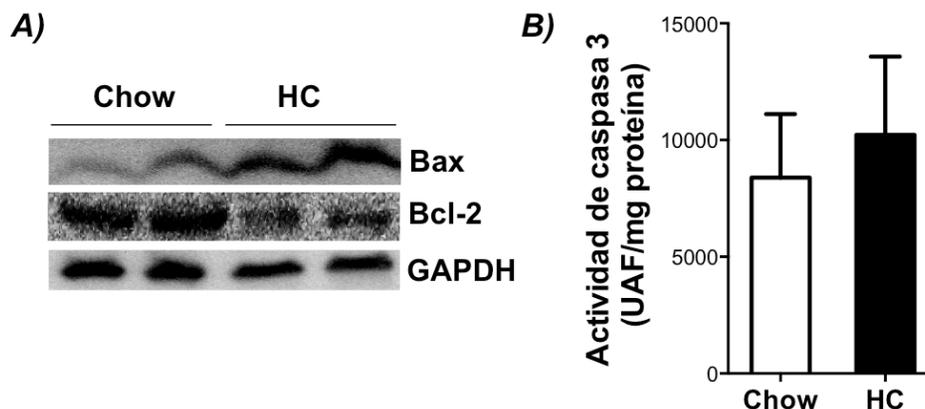


Figura 23. La sobrecarga de colesterol inhibe la apoptosis en el hígado. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático de ratones alimentados con dieta Chow y HC. A) Se determinó por Western blot las proteínas Bax y Bcl-2. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La GAPDH se usó como control de carga. B) La actividad de la caspasa 3 se determinó utilizando el kit Ac-DEVD-AMC Caspase-3 Fluorogenic Substrate BD Pharmagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratones alimentados con la dieta Chow.

Con la finalidad de explicar que posibles proteínas podrían estar participando en esta inhibición de la apoptosis se evaluaron otras proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1 y Bcl-X_L. En la figura 24 se observa que la dieta HC induce el aumento en el contenido proteico de estas dos proteínas, sugiriendo que estas proteínas podrían conferir la resistencia a la muerte celular por apoptosis.

Por otro lado, cabe mencionar que la expresión de estas proteínas está dirigida por el factor STAT3, por ello se determinó la activación de este factor de transcripción por WB de sus formas fosforiladas en serina 727 y tirosina 705. La

figura 24 muestra que la dieta HC induce la activación de STAT3 en serina 727 pero no en tirosina 705.

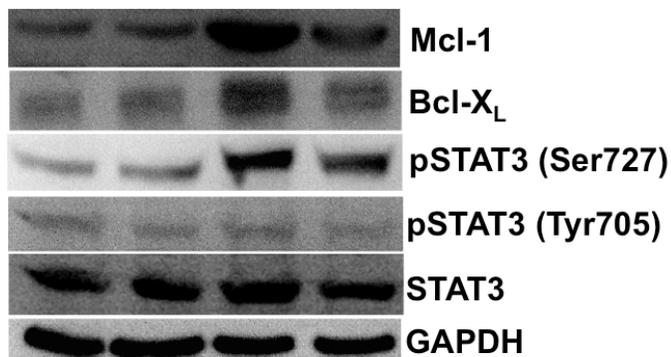


Figura 24. La acumulación de colesterol induce la activación de Stat 3 en serina 727 y aumenta la expresión de sus genes blanco. Se aisló proteína total a partir de tejido hepático de ratones alimentados con dieta Chow y HC. La proteína total se sometió a un análisis por Western blot para determinar las proteínas Mcl-1, Bcl-X_L, STAT3 total y sus formas fosforiladas. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La GAPDH se usó como control de carga.

VI.5 La acumulación de lípidos en el hígado disminuye el contenido de c-Met en membrana plasmática y la concentración de HGF en el suero.

Hay evidencias que indican que la sobrecarga de colesterol induce estrés oxidante mediante la inducción de la activación de sistemas prooxidantes tales como NADPH oxidasa (Lopez-Reyes *et. al.*, 2015) y la disminución de la concentración de mGSH (Mari *et. al.*, 2006). Así mismo está ampliamente reportado el papel que tiene la señalización de HGF y c-Met en el control del estrés oxidante y la homeostasis lípidica (Kaposi-Novak *et. al.*, 2006) .

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que HGF/c-Met induce una respuesta de reparación, sobrevivencia y de protección mediante la regulación dual de la NADPH oxidasa (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2013), como la inducción de proteínas

antioxidantes y antiapoptóticas ((Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2013, Gomez-Quiroz *et. al.*, 2008), incluso es capaz de proteger contra los efectos citotóxicos del etanol (Valdes-Arzate *et. al.*, 2009) o fármacos (Enriquez-Cortina *et. al.*, 2013). Sin embargo no se ha esclarecido el papel protector de HGF/c-Met en un modelo con esteatosis inducido por la dieta HC. Por ello decidimos evaluar el efecto de HGF/c-Met sobre estrés oxidante inducido por la dieta HC, ya que muchos de los parámetros que encontramos alterados debido a ella están en parte regulados por el HGF.

Debido a que previamente Nuño reportó en su tesis de maestría que la activación del receptor c-Met se ve retardada en hepatocitos aislados de ratones alimentados con la dieta HC a dos días al ser tratados con HGF (Nuño N, 2009), decidimos evaluar el efecto de la dieta HC sobre los niveles séricos de HGF y el contenido del receptor c-Met en la membrana plasmática. La figura 25A muestra una disminución significativa en la concentración en suero de HGF en animales de HC, y el contenido de c-Met en membrana plasmática, se reduce considerablemente en el tejido hepático HC a juzgar por inmunofluorescencia del receptor (Fig. 25B).

Para conocer si el HGF revierte el daño oxidante inducido por la dieta HC, se obtuvo el cultivo primario de los ratones alimentados a 2 días para eliminar la participación de HGF proveniente de otro tipo celular. Se corroboró que la dieta a 2 días mantenía la esteatosis y el estrés oxidante en los hepatocitos aislados mediante la evaluación del contenido lipídico y la generación de ERO. La figura 26 muestra que los lípidos neutros y el colesterol libre determinados por aceite rojo O y filipina respectivamente, aumentaron en los hepatocitos HC en comparación con las células

de los animales alimentados con la dieta control, así mismo la imagen muestra el incremento de la fluorescencia de la DCFH lo cual es proporcional al aumento de ERO

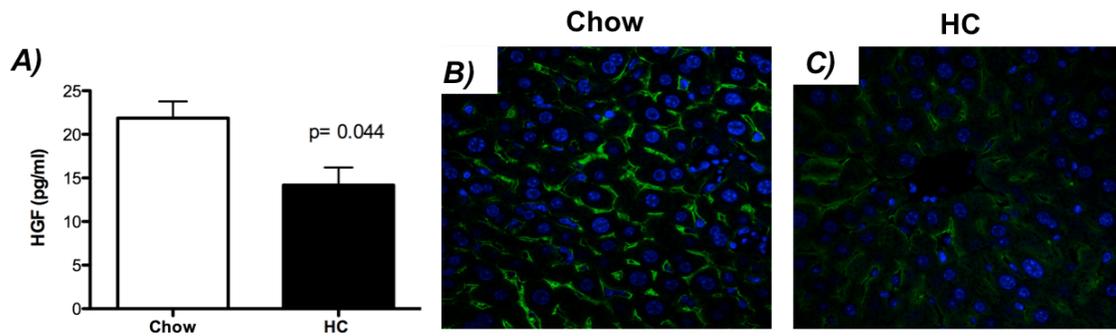


Figura 25. La sobrecarga de colesterol afecta los niveles de HGF y la expresión de c-Met. A) La concentración de HGF en suero se determinó por ELISA. B-C) La expresión de c-Met se realizó por inmunofluorescencia. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs ratones alimentados con la dieta Chow.

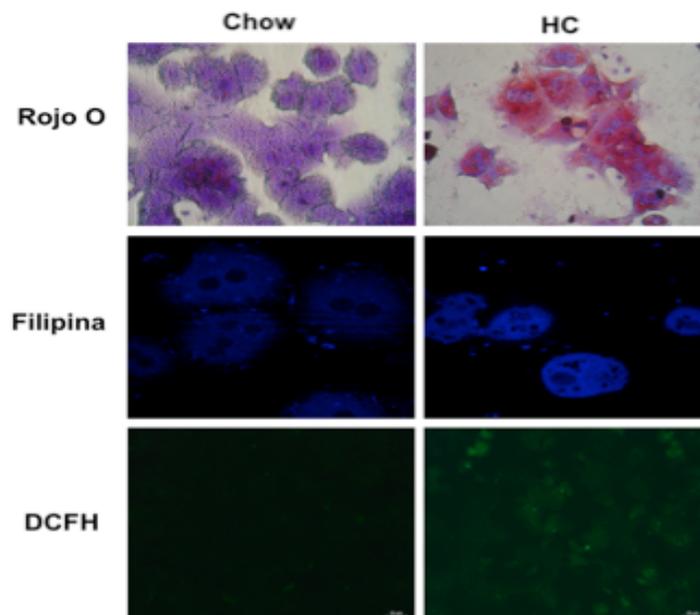


Figura 26. La ingesta de dos días de la dieta HC incrementa el contenido lipídico y el estrés oxidante en los hepatocitos. La concentración de lípidos se determinó por tinción con rojo O para detección de lípidos neutros y tinción con filipina para colesterol libre. La detección de ERO fueron determinados por epifluorescencia utilizando DCFH (5 μ M). Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

VI.6 HGF disminuye el contenido de ERO en los hepatocitos de HC mediante el aumento de sistema antioxidante de GSH.

A continuación se realizó una serie de experimentos tendientes a conocer si el HGF revierte el daño oxidante inducido por la sobrecarga de colesterol en los hepatocitos. Los hepatocitos se trataron con HGF (50 ng/mL) durante diferentes tiempos y se determinaron las ERO. La figura 27A muestra que el HGF disminuyó las ERO en los hepatocitos HC de manera dependiente al tiempo, obteniendo valores similares a las células de los ratones control a las 24 h; este efecto se corroboró por microscopía de fluorescencia donde se observa la disminución en la intensidad de la sonda DFCH a las 24 h del tratamiento con HGF (Fig. 27B).

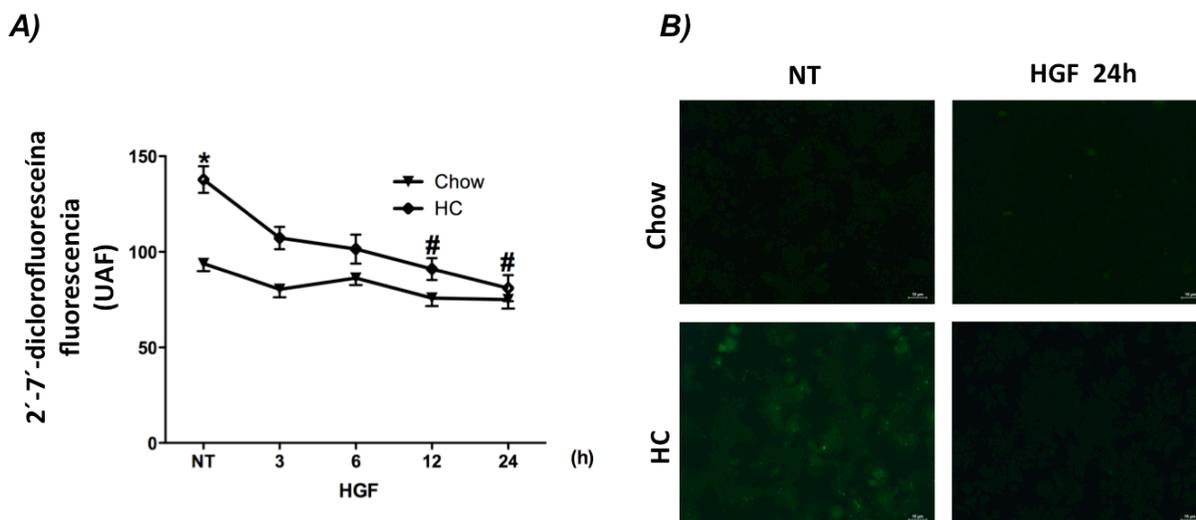


Figura 27. HGF disminuye el estrés oxidante inducido por la sobrecarga de colesterol. A) La cuantificación de la fluorescencia emitida por la 2,7-diclorofluoresceína se reportó como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF). Cada punto representa el promedio + EE de al menos 6 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs hepatocitos Chow. B) Las imágenes confocales son representativas del contenido de peróxidos determinado por DCFH (5 μ M) en las células Chow y HC tratados o no con HGF durante 24 h.

Está ampliamente reportado por nuestro grupo de investigación que el efecto protector de HGF está mediado por la inducción de diversas enzimas antioxidantes (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2013, Enriquez-Cortina *et. al.*, 2013, Gutierrez Ruiz *et. al.*, 2012, Valdes-Arzate *et. al.*, 2009). Con el objetivo de elucidar el sistema antioxidante que participa en la disminución de ERO en los hepatocitos HC tratados con el HGF, se determinó el estado que guarda el sistema antioxidante, particularmente la superóxido dismutasa 1 y la catalasa, así como las proteínas relacionadas con el sistema de la homeostasis del glutatión.

HGF indujo la expresión de la catalasa a las 12 y 24 h en las células Chow. SOD1 también se incrementó en las células de HC pero no en los hepatocitos Chow (Fig. 28A) . Para confirmar esto, se analizó la actividad de estas enzimas a 24 h de tratamiento HGF, la figura 28B muestra que la actividad de catalasa está considerablemente incrementada en las células HC no tratadas, en comparación con Chow no tratadas, pero no se observaron cambios con el tratamiento de HGF entre los hepatocitos HC y Chow; en el caso de la actividad total de la SOD no hay diferencia en las células no tratadas, y el tratamiento con HGF solamente indujo un aumento de la actividad en las células Chow (Fig. 28C).

Finalmente para corroborar la participación del sistema de GSH en el control del estrés oxidante inducido por el HGF se determinó por HPLC el cociente de las concentraciones de GSH reducido y oxidado. La figura 29A muestra un aumento de la concentración de GSH a 12 h de tratamiento, lo cual coincide con la disminución de ERO en hepatocitos HC y Chow.

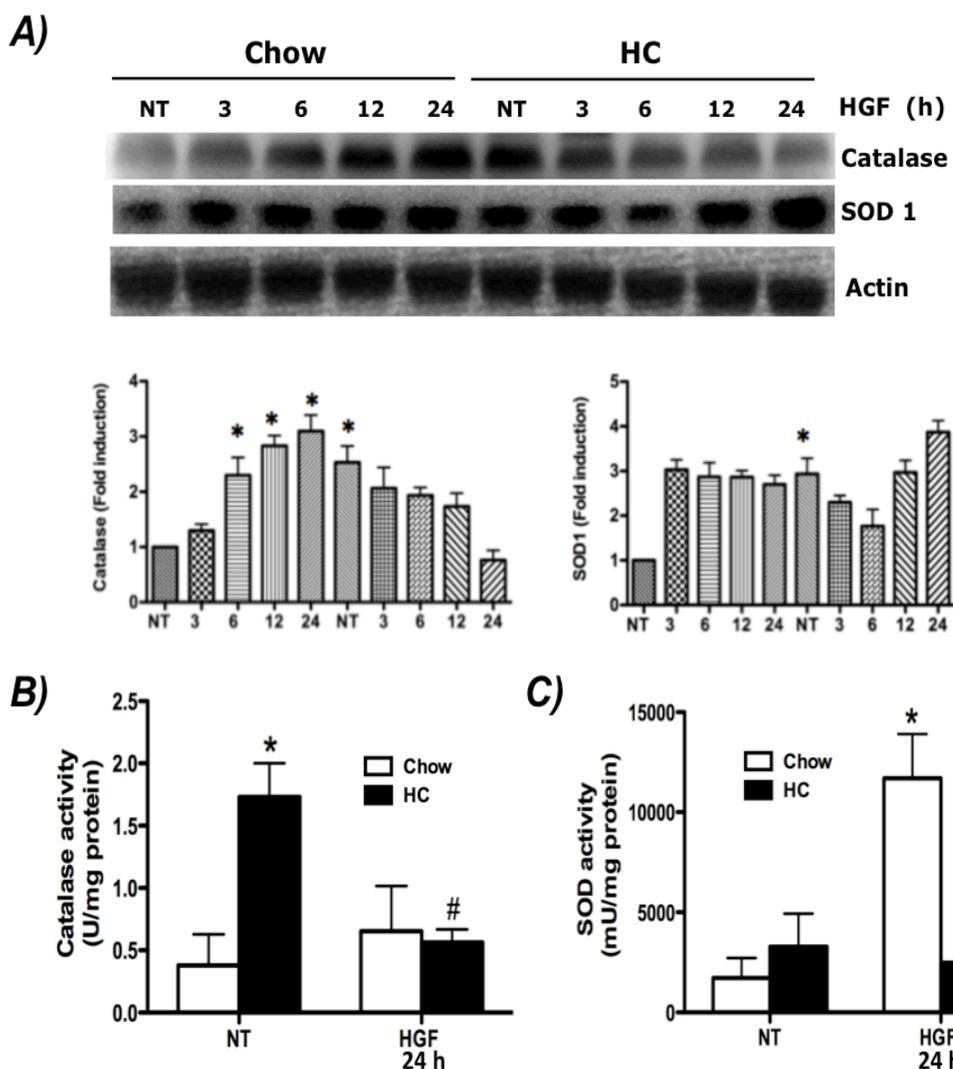


Figura 28. Efecto del HGF sobre la expresión y la actividad de SOD1 y catalasa. Se aisló proteína total a partir de cultivo primario de hepatocitos de ratones alimentados con dieta Chow y HC. A) Western blot y análisis densitométrico de las proteínas SOD1 y catalasa tratadas con HGF por diferentes tiempos. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La actina se usó como control de carga. La actividad enzimática de B) catalasa y C) SOD1 en hepatocitos tratados o no con HGF se determinó por espectrofotometría. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs hepatocitos Chow.

La figura 29B muestra que HGF indujo a las enzimas γ -GCS, Gpx 3/4/5, GST y G6PD en los hepatocitos control, estas enzimas relacionadas con la homeostasis del

GSH, por otro lado no se encontraron cambios significativos en γ -GCS en los hepatocitos HC, sin embargo la expresión de G6PD se encontró elevada en los hepatocitos HC lo cual sugiere que el HGF induce un mecanismo de protección mediante el reciclaje de GSSG.

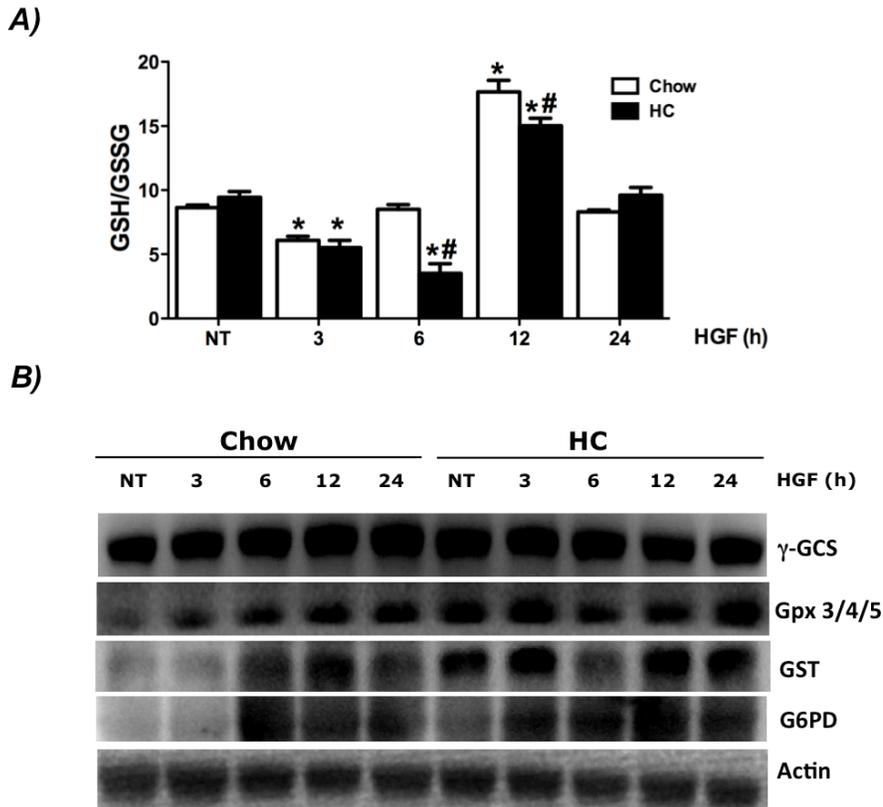


Figura 29. Efecto del HGF sobre el cociente de GSH/GSSG y las enzimas involucradas en el sistema de GSH Las células HC y Chow fueron tratadas con HGF a diferentes tiempos. A) El cociente de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) fue determinado por HPLC. Cada columna representa el promedio + EE de al menos 3 experimentos independientes. * $p \leq 0.05$ vs hepatocitos Chow. Se aisló proteína total a partir de cultivo primario de hepatocitos de ratones alimentados con dieta Chow y HC. A) La proteína total se sometió a un análisis por Western blot para determinar las proteínas γ .GCS, Gpx 3/4/5, GST, G6PD. La imagen es representativa de al menos tres experimentos independientes. La actina se usó como control de carga.

VII. DISCUSIÓN.

La NAFLD, como ya hemos señalado, inicia con una acumulación de grasa en el hígado debido a una alteración del metabolismo controlada principalmente por la síntesis de TG, la beta-oxidación y la deficiencia en la secreción de lípidos en forma de lipoproteínas (Sozio *et. al.*, 2010, Trauner *et. al.*, 2010a). Sin embargo, aunque en la literatura se asume que la NAFLD es el resultado de la acumulación de TG, es importante reconocer el potencial patogénico del tipo de lípido presente, como el colesterol.

El desarrollo de la presente tesis doctoral se centró en estudiar la implicación de la sobrecarga de colesterol y su asociación con la sobreproducción de los radicales libres y la disfunción mitocondrial como una de las principales causas de la progresión del hígado graso y la importancia de la regulación del estado redox, como un mecanismo necesario para el restablecimiento de la función normal del hepatocito.

En el presente trabajo se encontró que la dieta HC induce la acumulación de lípidos en el tejido hepático (Fig.12), incluyendo colesterol, y esto produce un desarreglo en la arquitectura hepática, una hipertrofia celular, mostrando numerosos hepatocitos hipercromáticos y con núcleos condensados al ser analizados en los cortes histológicos (Fig. 11D) (Sozio *et. al.*, 2010, Wang *et. al.*, 2010). En pacientes con NAFLD aproximadamente el 20% de los individuos además de presentar esteatosis también presentan inflamación parenquimal y portal, incluso algunos

pacientes presentan distintos niveles de fibrosis con el potencial de progresar a cirrosis (Rafiq *et. al.*, 2009).

Aunque la NAFLD se ha considerado clínicamente una condición benigna, reversible, asintomática y con pocas complicaciones clínicas asociadas, está se considera que puede ser un factor detonante para la progresión en el daño hepático y se considera como la mayor causa que lleva al daño crónico hepático (Machado *et. al.*, 2016). En la actualidad existen pocas pruebas no invasivas que permitan el diagnóstico de la NAFLD, aunque el ultrasonido es la prueba más factible y económica, los marcadores bioquímicos en suero como la ALT, AST, GST, ALF entre otras, han permitido inferir la presencia de la NAFLD (Byrne *et. al.*, 2009).

Hay reportes que indican una asociación entre los pacientes con esteatosis y la elevación de los marcadores séricos de daño hepático (Das *et. al.*, 2008). Se ha encontrado que la transaminasa ALT tiene una relación con esta patología y a menudo se usa en estudios epidemiológicos como un marcador indirecto de daño hepático asociado a NAFLD (Chen *et. al.*, 2008, Schindhelm *et. al.*, 2006). En el presente estudio se muestra que al administrar una dieta alta en colesterol, las enzimas ALT, AST y FA se elevan significativamente (Fig. 14), (Das *et. al.*, 2008) indicando un daño hepático, que corrobora el daño histológico (Fig. 11).

Las alteraciones morfológicas observadas en la histología hepática generadas por la acumulación de lípidos, incluido el colesterol (Fig. 11), van asociadas con cambios importantes en los parámetros relacionados con el estrés oxidante, el daño lipoperoxidativo y la muerte celular (Fig. 13) (Matsunami *et. al.*, 2010, Videla *et. al.*,

2004). El exceso de lípidos produce el aumento de la β -oxidación que conduce al incremento en la entrega de electrones a la ETC causando alteraciones mitocondriales y al incremento en la formación de ERO (Rolo *et. al.*, 2012). Asociado a esto, el aumento de colesterol en la membrana mitocondrial disminuye la actividad del transportador de mGSH impactando en el control del estrés oxidante que se produce en la mitocondria (Ribas *et. al.*, 2014).

Las primeras consecuencias que se originan por la sobreproducción de ERO y una deficiencia en su destoxificación, es la oxidación de macromoléculas, proteínas principalmente (Han *et. al.*, 2006). De hecho se ha reportado que los pacientes con NAFLD presentan un índice más alto en la oxidación de proteínas en el hígado debido a la unión con hierro que favorece la interacción de las proteínas con las ERO para producir la formación de carbonilos, y así agravar el daño oxidante en el hígado (Videla *et. al.*, 2004).

En el presente trabajo, nosotros confirmamos incremento en el estrés oxidante como resultado de un ambiente pro-oxidante, puede promover la severidad de la esteatosis y el riesgo de desarrollar NASH (Videla, 2009). En la figura 17, se puede observar como la dieta HC aumenta la producción de grupos carbonilos de las proteínas en los ratones HC como consecuencia del incremento en la generación de ERO. El estrés oxidante producido por el aumento de las ERO, genera daño celular y dispara una respuesta inflamatoria, generando, aún más daño, contribuyendo de esta forma, a la progresión de la enfermedad, aspecto que se ha corroborado clínicamente (Matsunami *et. al.*, 2010, Neuschwander-Tetri, 2010).

Nosotros, y otros autores hemos reportado anteriormente que la sobrecarga de colesterol induce efectos citotóxicos y estrés oxidativo en el hígado (Gutierrez Ruiz *et. al.*, 2012, Lopez-Reyes *et. al.*, 2015, Mari *et. al.*, 2006). Si bien es conocido que la progresión de la NAFLD está determinada por incremento del estrés oxidante como un segundo daño, nuestro conocimiento acerca del mecanismo de la lesión hepatocelular inducida por el estrés oxidante ha sido parcialmente caracterizado (Mari *et. al.*, 2006).

Entre los blancos principales de las ERO, se encuentran la activación de proteínas de señalización y factores de transcripción, como el factor nuclear relacionado a eritroides 2 (Nrf2) que recientemente ha tomado particular relevancia en la NAFLD. Nuestros datos muestran que la expresión de Nrf2 se ve abatida en los ratones HC (Fig. 16), lo que concuerda con lo reportado recientemente, donde se ha observado que la disminución en la actividad o la eliminación de Nrf2 provoca una rápida progresión de NAFLD a NASH, dándole un papel relevante a este factor de transcripción en el control de la progresión del daño hepático (Chowdhry *et. al.*, 2010, Sugimoto *et. al.*, 2010), debido a que este factor de transcripción dirige la expresión de un amplio rango de genes antioxidantes de citoprotección y de fase de destoxificación II y III que llevan cabo la biotransformación y eliminación de xenobióticos (Klaassen *et. al.*, 2010).

Es bien conocido que las células responden ante el estrés oxidante mediante un mecanismo general que reside básicamente en la expresión de proteínas de defensa antioxidante (Mari *et. al.*, 2010), por lo que decidimos evaluar a las principales

enzimas que pudieran neutralizar la generación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Está ampliamente reportado que la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ es realizada por las SOD dependiendo de la localización de ésta. La figura 16 muestra que la expresión SOD1, enzima citosólica, se encuentra disminuida en los ratones que recibieron la dieta, sin embargo se observa un incremento en la expresión de SOD2, enzima que actúa sólo dentro de las membranas mitocondriales, estos datos sugieren que el incremento del $O_2^{\cdot-}$ puede provenir de la mitocondria (Zelko *et. al.*, 2002). La dismutación del $O_2^{\cdot-}$ puede conducir a un incremento neto de H_2O_2 , si la acumulación de éste no se limita entonces el $O_2^{\cdot-}$ participa en reacciones en cadena (Haber-Weiss-Fenton) que genera los radicales libres más reactivos (Mari *et. al.*, 2010).

Por otro lado, también existen mecanismos de detoxificación del H_2O_2 que evitan la formación de radicales hidroxilo, tales como las glutatión peroxidasas (Gpxs) y la catalasa, y su acción depende de las concentraciones de H_2O_2 (Inoue, 2009). La catalasa es considerada la enzima más eficiente de la neutralización de peróxidos debido a que puede transformar altas concentraciones de H_2O_2 en agua y oxígeno (Mari *et. al.*, 2010), sin embargo, la catalasa no presenta cambio alguno en su expresión en hígados HC, la GPx1 presenta una disminución en su expresión, y la GPx4 incrementa su contenido en estos hígados (Fig. 16).

En contraste con la Gpx-1, la isoforma Gpx-4 puede utilizar a una gama de sustratos reducidos, incluyendo al GSH y tioles proteicos, para neutralizar al H_2O_2 (Brigelius-Flohe *et. al.*, 2013, Ribas *et. al.*, 2014) La Gpx-4 muestra una capacidad única para reducir hidroperóxidos de lípidos tales como el colesterol y los ésteres de

colesterol, incluso cuando se insertan en las biomembranas o lipoproteínas, por lo tanto juega un papel clave en la defensa contra lipoperoxidación (Cole-Ezea *et. al.*, 2012, Ribas *et. al.*, 2014).

La lipoperoxidación es una de las consecuencias del daño oxidante que promueven la progresión de NAFLD a NASH, fibrosis o cirrosis (Frijhoff *et. al.*, 2015). Hardwick *et. al.* (2010) reportaron que la ausencia de lípidos oxidados en biopsias de pacientes con NAFLD, es gracias a la formación del 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) por una isoforma de GST, lo cual implicaría la detoxificación de este subproducto de la lipoperoxidación (Hardwick *et. al.*, 2010). La GST tiene una amplia distribución intracelular, incluso se ha reportado que las GST mitocondriales además de tener actividad de transferasa, detoxificando subproductos nocivos mediante la conjugación de GSH, también posee actividad de peroxidasa (Cole-Ezea *et. al.*, 2012).

El incremento en las enzimas GST, Gpx-4 y SOD2 (Fig. 16), podría explicar la disminución de la oxidación de proteínas mitocondriales (Fig. 17), sin embargo el estado prooxidante en los ratones HC se mantiene, corroborado por la aumento en la generación de ERO (Fig. 15) y en la producción de grupos carbonilos de las proteínas totales en los ratones HC (Fig. 16).

Numerosos estudios han establecido que la disfunción mitocondrial juega un papel clave en la progresión de la NAFLD, debido a que la mitocondria es considerada la principal fuente de ERO en la NAFLD (Mari *et. al.*, 2006, Musso *et. al.*, 2009, Trauner *et. al.*, 2010a). Recientemente se ha señalado la importancia de las

modificaciones estructurales en la mitocondrial, como el hinchamiento (megamitocondrias) y formación de inclusiones en la matriz mitocondrial (Caldwell *et. al.*, 2009, Sanyal *et. al.*, 2001), en variedad de enfermedades crónicas hepáticas, incluyendo la NAFLD (Farrell *et. al.*, 2012).

Nuestro estudio mostró que la dieta HC induce un aumento de hasta 2 veces el colesterol en las mitocondrias (Fig. 18), cabe resaltar que estos organelos son de bajo contenido de colesterol, por lo tanto una acumulación de colesterol modifica la estructura y función mitocondrial, que conlleva una sobreproducción de ERO y como consecuencia a un estrés oxidante celular (Marí *et. al.*, 2010, Nunnari *et. al.*, 2012).

Se han reportado anomalías mitocondriales hepáticas en NAFLD, desde hace más de una década considerando a las mitocondrias como el origen o el destino de la lesión (Caldwell *et. al.*, 2004, Sanyal *et. al.*, 2001). En pacientes con NASH, al menos el 40% de las mitocondrias son estructuralmente anormales, describiendo mitocondrias agrandadas, pérdida de las crestas mitocondriales e inclusiones paracristalinas, las cuales las asocian con un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, contribuyendo a una mayor formación de ERO (Caldwell *et. al.*, 2009, Farrell *et. al.*, 2012). Por TEM se puede observar que las mitocondrias de los hígados de los ratones alimentados con una dieta HC muestran alteraciones al compáralas con los hígados de los animales control (Fig. 21C), consistentes en un mayor número de ellas, una notoria disminución en el tamaño, además de alteraciones en la crestas mitocondriales (Fig. 21D).

Con el fin de elucidar, en nuestro modelo murino con esteatosis, el aumento en el número de mitocondrias y fisión de ellas, conforme a lo observado por TEM, decidimos evaluar el contenido de las proteínas importantes para la biogénesis y fisión mitocondrial como PGC-1 α , Drp1 y OPA1. La figura 22 muestra que PGC-1 α , Drp1 se encontraron incrementadas en los ratones HC a diferencia de OPA1 que se encontró disminuida (Fig. 22), esta última encargada de la fusión mitocondrial.

En estudios de modelos de ratón con enfermedades mitocondriales, la sobreexpresión de PGC-1 α y Drp1 compensa los defectos mitocondriales, desencadena la proliferación mitocondrial y mejora la respiración mitocondrial (Srivastava *et. al.*, 2009). Por otro lado, Carabelli *et. al.*, reportan que en ratones alimentados con una dieta alta en grasas aumenta de la biogénesis mitocondrial en el hígado, mejorando la función mitocondrial (Carabelli *et. al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de que encontramos un incremento en el contenido de PGC-1 α en los hígados de los ratones HC, estos presentaban la pérdida del $\Delta\Psi$ (Fig. 19B-C), y una disminución en las concentraciones de ATP (Fig. 19D) indicando un déficit energético y en consecuencia un daño funcional a nivel mitocondrial.

Asimismo, el incremento de Drp1 asociado con la caída del $\Delta\Psi$ acelera la fisión mitocondrial, debido a que las mitocondrias dañadas tienden a fragmentarse para posteriormente ser eliminadas mediante un proceso de muerte selectivo conocido como mitofagia. (Twig *et. al.*, 2008, Zolezzi *et. al.*, 2013). Pero en nuestro modelo, las principales proteínas encargadas de la eliminación de mitocondrias y de la formación de autofagosomas no se presentan en los hígados de los ratones que recibieron la

dieta HC (Fig. 20), estos datos muestran que no se está llevando a cabo la mitofagia, lo cual se corroboró en las TEM donde no se observan formaciones de autofagosomas (Fig. 21C-D). La inhibición de este proceso contribuye a la acumulación de mitocondrias disfuncionales que son potencialmente peligrosas para las células, ya que a menudo generan una sobreproducción de ERO en ausencia de la síntesis de ATP y son propensas a ser plenamente permeabilizadas y por tanto conduce a la liberación de los inductores de muerte celular (Kubli *et. al.*, 2012, Saito *et. al.*, 2015, Twig *et. al.*, 2008).

Además de las vías de activación de Drp1 comentadas hasta el momento, esta proteína también promueve la despolarización de la membrana mitocondrial, y se ha relacionado con la muerte celular por apoptosis asociada a condiciones de estrés metabólico (Zolezzi *et. al.*, 2013). Las mitocondrias fragmentadas son más susceptibles a la oligomerización de Bax, una proteína pro-apoptótica (Montessuit *et. al.*, 2010). La formación de canales de Bax en la MEM induce la liberación del citocromo c que resulta en la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas, incluyendo a la caspasa ejecutora 3, que finalmente conducen a la apoptosis (Osada *et. al.*, 2006, Parra *et. al.*, 2008, Twig *et. al.*, 2008). Sin embargo, los datos de este estudio muestran que no hay cambios en la actividad de la caspasa 3, sugiriendo que no hay inducción de la apoptosis en los ratones que recibieron la dieta HC, a pesar de que la proteína apoptótica Bax se encontró elevada en los hígados HC y la proteína Bcl-2 disminuyó su contenido en dichos hígados (Fig. 23).

Constantemente se ha relacionado una elevada presencia de Bax con la disminución de la actividad de Bcl-2, una proteína pro-apoptótica, ya que continuamente se calcula el cociente entre el contenido de estas dos proteínas para estimar la relación de supervivencia celular (Strasser, 2005). Sin embargo, se ha dejado a un lado el papel que desempeñan otros miembros de la familia de Bcl-2 como Bcl-XL y Mcl-1, los cuales comparten la mayor homología con Bcl-2.

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que la disminución en la proteína Bcl-2 está compensada por un incremento en las proteínas Bcl-X_L y Mcl-1 en los hígados HC (Fig. 24), esto sugiere que el aumento de estas dos proteínas permite la inhibición de la muerte celular. Considerando a la proteína Mcl-1 de mayor relevancia, debido a que una eliminación de esta proteína anti-apoptótica induce daño del hígado, fibrosis y aumenta la susceptibilidad a apoptosis en los hepatocitos (Vick *et. al.*, 2009).

Es bien conocido que la expresión de Mcl-1 y Bcl-X_L son inducidos por la activación del factor de transcripción STAT3. Este factor de transcripción desarrolla una respuesta adaptativa ante una agresión al hígado amplificando genes que mantienen la homeostasis celular (Szczepanek *et. al.*, 2012). La figura 24 muestra que la sobrecarga de colesterol induce la activación de STAT3 en Ser727, pero no tiene cambio en la activación en Tyr 705.

STAT3 se encuentra inactivo en el citosol, pero una vez activado por citocinas o factores de crecimiento es fosforilado a nivel de Tyr 705. Canónicamente esta activación en Ty705 dispara la dimerización y la translocación al núcleo. Una vez

núcleo el dímero de Stat3, es fosforilado por las MAPK en el residuo de Ser 727, para que pueda unirse al ADN y dirigir la expresión de sus genes blanco (Timofeeva *et. al.*, 2012, You *et. al.*, 2015).

A pesar de la presencia del dímero fosforilado en tirosina, es importante para la activación de sus genes blanco, Yang *et. al.*, demostraron que la no fosforilación en STAT3 en Tyr705, aún puede conducir a la expresión génica de amplio rango de proteínas. Ellos emplearon un mutante Y705F STAT3, que no puede ser fosforilada en el residuo 705, y mostraron que los niveles de muchos ARN mensajeros se vieron fuertemente afectados, incluyendo varias proteínas proto-oncogénicas tales MRAS y c-Met (Yang *et. al.*, 2005).

Aunque en la literatura asume que la fosforilación de STAT en Ser 727 se realiza en el núcleo para la activación de sus genes blancos, recientemente se ha demostrado la existencia de STAT3 mitocondrial que ejecuta funciones de transcripción independientes al núcleo. Normalmente la tasa de STAT3 mitocondrial es aproximadamente el 10% del STAT3 citosólico, sin embargo, bajo estímulos como la isquemia hay una translocación de STAT3 hacia mitocondria donde se puede encontrar en forma de monómero y fosforilada en Ser 727. Esta fosforilación en ser727 participa en la estabilización del complejo I de la mitocondria, y por ende en la disminución de las ERO, sin embargo, el mecanismo no está del todo caracterizado (You *et. al.*, 2015).

Recientemente se ha reportado la relevancia de HGF/c-Met en la toxicidad inducida por los lípidos como el colesterol en células epiteliales (Yu *et. al.*, 2010),

incluso en células no hepáticas, como la línea celular derivada de un insulinoma, las células RINm5F, donde el factor de crecimiento reprime la apoptosis inducida por los FFA, contrarrestando el estrés oxidante (Santangelo *et. al.*, 2007). Además, la eliminación específica de c-Met en el hígado mostró una esteatosis agravada en ratones alimentados con una dieta MCD (Kroy *et. al.*, 2014). Sin embargo a la fecha, no se ha estudiado el mecanismo por el cual HGF/c-Met controla el estrés oxidante debido a una acumulación de lípidos. La figura 25A muestra que en nuestro modelo de esteatosis, la sobrecarga de lípidos induce una disminución significativa en la concentración en suero de HGF en animales de HC, y el contenido de c-Met en membrana plasmática en el tejido hepático HC.

HGF/c-Met muestra una respuesta antioxidante cuando se daña al hígado con diferentes insultos, canónicamente induce protección por la expresión de antioxidante (Yang *et. al.*, 2008), y las proteínas anti-apoptóticas (Gomez-Quiroz *et. al.*, 2008). Con el fin de caracterizar la respuesta de HGF en células hepáticas sobrecargadas de colesterol, se aislaron hepatocitos primarios de ratón a partir de animales alimentados con la dieta HC. Los hepatocitos de ratón de los animales HC, mostraron claramente un aumento de lípidos neutros y contenido de colesterol libre, y del estrés oxidante (Fig. 26) que corrobora con lo encontrado en el tejido hepático (Fig. 12 y 15), esto indica que el proceso de aislamiento de células no modifica la concentración lipídica y estrés oxidante.

HGF muestra de manera eficiente una respuesta antioxidante mediante el aumento de las enzimas claves que regulan la generación de ERO (Chiang *et. al.*,

2015), tales como la catalasa, o SOD1, por un mecanismo dependiente de la activación del factor nuclear kappa B (Valdes-Arzate *et. al.*, 2009). La Figura 27 muestra que el tratamiento con HGF disminuye la producción de ERO y la oxidación de proteínas (dato no mostrado). Curiosamente, el contenido de catalasa, evaluado por Western Blot, muestra un aumento en hepatocitos de animales alimentados con la dieta Chow, pero su contenido se redujo de una manera dependiente del tiempo en células de HC, por otro lado, el contenido de SOD1 aumentó sólo en las células HC pero sin cambios significativos en los hepatocitos Chow (Fig. 28).

Para tener mayor confianza, decidimos ensayar la actividad de ambas enzimas a las 24 h del tratamiento con HGF. El colesterol induce un aumento de hasta 4 veces la actividad de la catalasa y el tratamiento con HGF disminuye la actividad de esta enzima hasta a valores basales, este resultado concuerda con lo observado en el Western blot. En el caso de SOD, no se observaron cambios en la actividad de la enzima en los hígados de los ratones que recibieron la dieta, sin embargo, como se ha reportado, el HGF induce la actividad de SOD a las 24 h en los ratones Chow. Estas proteínas se encuentran entre las principales enzimas que detoxifican a las ERO, y particularmente las isoformas de las SOD disminuyen su contenido o actividad dependiendo de las concentraciones de ERO (Clavijo-Cornejo *et. al.*, 2014), sin embargo, la sobrecarga de colesterol en hepatocitos no parece alterar SOD por lo menos en dos días bajo dieta HC a diferencia de lo encontrado en ratones alimentados a por treinta días (Fig. 16) en donde el contenido se ve afectado en ratones HC.

Para continuar la exploración de la respuesta antioxidante provocada por el HGF, nos centramos en el sistema GSH. Tenemos evidencia clara de que el HGF puede estimular la maquinaria del sistema GSH, en particular a la enzima clave para la síntesis de GSH, la γ -GCS, la cual aumenta el contenido de GSH (Gomez-Quiroz *et. al.*, 2008, Valdes-Arzate *et. al.*, 2009), en la presente tesis encontramos el mismo efecto en los hepatocitos Chow, sin embargo en las células HC el contenido de esta enzima disminuyó ligeramente al ser tratadas con el HGF (Fig. 29B). Al analizar la relación GSH/GSSG los datos mostraron que el HGF induce una disminución en la relación de este tripéptido a las 6 h en células HC comparadas con las células Chow, pero a las 12h la relación de GSH mostro una recuperación significativa (Fig. 29A).

Los datos anteriores concordaban con la expresión de las principales enzimas relacionadas con la homeóstasis del GSH. La figura 29B muestra que el tratamiento con HGF en células Chow induce la expresión de las de las enzimas GPx, GST y G6PDH, esta última encargada de proporcionar el NADPH como donante principal de electrones en la reducción de GSSG a GSH por la GSH reductasa (Ho *et. al.*, 2014). En las células de HC no tratados mostraron una sobreexpresión basal de estas enzimas antioxidantes, en comparación con las células Chow no tratadas, pero se observó un incremento a las 12 y 24 h de tratamiento con HGF.

Estos datos indican claramente que el HGF protege mediante la inducción de los sistemas de GSH, como se indica por Mari *et. al.*, donde reportan que la disminución del mGSH en ratas alimentadas con la misma dieta experimental, induce la

sensibilización de la lesión mediada por los factores de muerte y que el restablecimiento del mGSH evita este efecto (Mari *et. al.*, 2006).

VIII. CONCLUSIONES.

Como se ha demostrado en el presente trabajo, la dieta alta en colesterol puede conducir a estrés oxidante, característica que puede agravar la enfermedad del hígado, tales como esteatosis o esteatohepatitis.

La acumulación de lípidos, entre ellos el colesterol, induce la disfunción mitocondrial producida por disminución en la producción de ATP, un incremento en la producción de ERO, pérdida del $\Delta\Psi_m$, y defectos en la dinámica mitocondrial. Aun cuando las células han desarrollado diferentes mecanismos para mantener la integridad mitocondrial, tales como el aumento de la biogénesis mitocondrial, la eliminación de las mitocondrias dañadas por mitofagia y la muerte celular por apoptosis en nuestro modelo murino de NAFLD, el colesterol le confiere a la célula una inactivación de la mitofagia y una resistencia a la apoptosis mediada por la activación de STAT3 en ser727. Por lo tanto la disminución en el control de calidad mitocondrial y la resistencia a la muerte celular permitirá la pérdida de la integridad del tejido hepático y eso podría explicar la progresión de la NAFLD.

Por otra parte el sistema antioxidante se eleva en respuesta a la acumulación de lípidos en los hepatocitos HC con dos días de dieta, sin embargo a mayor tiempo de ingesta con la dieta la respuesta se ve abatida lo que provoca el incremento en las especies reactivas de oxígeno, oxidación proteica y el daño tisular.

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

XIX. REFERENCIAS

Abd El-Kader S. M. y El-Den Ashmawy E. M. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol* 2015;7:846-858.

Agrawal R. P., Sheroan V., Ola V., Sulemani A. A., Singh N., Sirohi P., Gothwal S., et al. Hepatocyte growth factor, adiponectin and hepatic histopathology in non-alcoholic steatohepatitis. *J Assoc Physicians India* 2013;61:789-792.

Angulo P. y Lindor K. D. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17 Suppl:S186-190.

Arthur J. R. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1825-1835.

Auger C., Alhasawi A., Contavadoo M. y Appanna V. D. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:40.

Baulies A., Ribas V., Nunez S., Torres S., Alarcon-Vila C., Martinez L., Suda J., et al. Lysosomal Cholesterol Accumulation Sensitizes To Acetaminophen Hepatotoxicity by Impairing Mitophagy. *Sci Rep* 2015;5:18017.

Bellentani S. y Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009;8 Suppl 1:S4-8.

Bossy-Wetzel E., Barsoum M. J., Godzik A., Schwarzenbacher R. y Lipton S. A. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:706-716.

Brand M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 2010;45:466-472.

Brigelius-Flohe R. y Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:3289-3303.

Browning J. D., Szczepaniak L. S., Dobbins R., Nuremberg P., Horton J. D., Cohen J. C., Grundy S. M., et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-1395.

Brunt E. M. y Tiniakos D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:5286-5296.

Byrne C. D., Olufadi R., Bruce K. D., Cagampang F. R. y Ahmed M. H. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2009;116:539-564.

Caldwell S. H., Chang C. Y., Nakamoto R. K. y Krugner-Higby L. Mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004;8:595-617, x.

Caldwell S. H., de Freitas L. A., Park S. H., Moreno M. L., Redick J. A., Davis C. A., Sisson B. J., et al. Intramitochondrial crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009;49:1888-1895.

Cano-Ramirez D., Torres-Vargas C. E., Guerrero-Castillo S., Uribe-Carvajal S., Hernandez-Pando R., Pedraza-Chaverri J. y Orozco-Ibarra M. Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol* 2012;26:206-211.

Carabelli J., Burgueno A. L., Rosselli M. S., Gianotti T. F., Lago N. R., Pirola C. J. y Sookoian S. High fat diet-induced liver steatosis promotes an increase in liver mitochondrial biogenesis in response to hypoxia. *J Cell Mol Med* 2011;15:1329-1338.

Chan D. C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:79-99.

Chen J., Petersen D. R., Schenker S. y Henderson G. I. Formation of malondialdehyde adducts in livers of rats exposed to ethanol: role in ethanol-mediated inhibition of cytochrome c oxidase. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:544-552.

Chen Y. y Dorn G. W., 2nd. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 2013;340:471-475.

Chen Z. W., Chen L. Y., Dai H. L., Chen J. H. y Fang L. Z. Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008;9:616-622.

Chiang C. H., Wu W. W., Li H. Y., Chien Y., Sun C. C., Peng C. H., Lin A. T., et al. Enhanced antioxidant capacity of dental pulp-derived iPSC-differentiated hepatocytes and liver regeneration by injectable HGF-releasing hydrogel in fulminant hepatic failure. *Cell Transplant* 2015;24:541-559.

Chowdhry S., Nazmy M. H., Meakin P. J., Dinkova-Kostova A. T., Walsh S. V., Tsujita T., Dillon J. F., et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2010;48:357-371.

Clavijo-Cornejo D., Enriquez-Cortina C., Lopez-Reyes A., Dominguez-Perez M., Nuno N., Dominguez-Meraz M., Bucio L., et al. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie* 2013;95:1177-1184.

Clavijo-Cornejo D., Gutierrez-Carrera M., Palestino-Dominguez M., Dominguez-Perez M., Nuno N., Souza V., Miranda R. U., et al. Acetaldehyde targets superoxide dismutase 2 in liver cancer cells inducing transient enzyme impairment and a rapid transcriptional recovery. *Food Chem Toxicol* 2014;69:102-108.

Cole-Ezea P., Swan D., Shanley D. y Hesketh J. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2012;53:488-497.

Das K. S., Balakrishnan V., Mukherjee S. y Vasudevan D. M. Evaluation of blood oxidative stress-related parameters in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:323-334.

Das S., Hajnoczky N., Antony A. N., Csordas G., Gaspers L. D., Clemens D. L., Hoek J. B., et al. Mitochondrial morphology and dynamics in hepatocytes from normal and ethanol-fed rats. *Pflugers Arch* 2012;464:101-109.

Degli Esposti D., Hamelin J., Bosselut N., Saffroy R., Sebah M., Pommier A., Martel C., et al. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. *Biochem Res Int* 2012;2012:387626.

Enriquez-Cortina C., Almonte-Becerril M., Clavijo-Cornejo D., Palestino-Dominguez M., Bello-Monroy O., Nuno N., Lopez A., et al. Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicol Sci* 2013;135:26-36.

Fabbrini E., Mohammed B. S., Magkos F., Korenblat K. M., Patterson B. W. y Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:424-431.

Farrell G. C., van Rooyen D., Gan L. y Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* 2012;6:149-171.

Fernandez-Checa J. C. y Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:263-273.

Finck B. N. y Kelly D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006;116:615-622.

Foveau B., Ancot F., Leroy C., Petrelli A., Reiss K., Vingtdoux V., Giordano S., et al. Down-regulation of the met receptor tyrosine kinase by presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis. *Mol Biol Cell* 2009;20:2495-2507.

Frank S., Gaume B., Bergmann-Leitner E. S., Leitner W. W., Robert E. G., Catez F., Smith C. L., et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 2001;1:515-525.

Frijhoff J., Winyard P. G., Zarkovic N., Davies S. S., Stocker R., Cheng D., Knight A. R., et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 2015;23:1144-1170.

Funakoshi H. y Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clin Chim Acta* 2003;327:1-23.

Galloway C. A., Lee H., Brookes P. S. y Yoon Y. Decreasing mitochondrial fission alleviates hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G632-641.

Galloway C. A. y Yoon Y. Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:415-430.

Gegg M. E., Cooper J. M., Chau K. Y., Rojo M., Schapira A. H. y Taanman J. W. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 2010;19:4861-4870.

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

Grimm S. The ER-mitochondria interface: the social network of cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:327-334.

Guicciardi M. E. y Gores G. J. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut* 2005;54:1024-1033.

Gutierrez Ruiz M. C., Dominguez Perez M., Rodriguez Gonzalez S., Nuno Lambarri N., Licona Retama C. y Gomez-Quiroz L. E. [High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]. *Gac Med Mex* 2012;148:236-242.

Guturu P. y Duchini A. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: role of obesity, insulin resistance and mechanisms of hepatotoxicity. *Int J Hepatol* 2012;2012:212865.

Hamaguchi M., Takeda N., Kojima T., Ohbora A., Kato T., Sarui H., Fukui M., et al. Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome. *World J Gastroenterol* 2012;18:1508-1516.

Han D., Hanawa N., Saberi B. y Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G1-7.

Han X. J., Tomizawa K., Fujimura A., Ohmori I., Nishiki T., Matsushita M. y Matsui H. Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta Med Okayama* 2011;65:1-10.

Handschin C. y Spiegelman B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* 2006;27:728-735.

Hardwick R. N., Fisher C. D., Canet M. J., Lake A. D. y Cherrington N. J. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos* 2010;38:2293-2301.

Hernandez I., Dominguez-Perez M., Bucio L., Souza V., Miranda R. U., Clemens D. L., Gomez-Quiroz L. E., et al. Free fatty acids enhance the oxidative damage induced by ethanol metabolism in an in vitro model. *Food Chem Toxicol* 2015;76:109-115.

Hiratsuka A., Adachi H., Fujiura Y., Yamagishi S., Hirai Y., Enomoto M., Satoh A., et al. Strong association between serum hepatocyte growth factor and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:2927-2931.

Ho H. Y., Cheng M. L. y Chiu D. T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--beyond the realm of red cell biology. *Free Radic Res* 2014;48:1028-1048.

Horvath S. E. y Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res* 2013;52:590-614.

Huss J. M. y Kelly D. P. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* 2004;95:568-578.

Ibrahim S. H., Hirsova P., Malhi H. y Gores G. J. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci* 2015.

Ishihara N., Eura Y. y Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 2004;117:6535-6546.

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

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

Klaassen C. D. y Reisman S. A. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;244:57-65.

Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:III-XIII, 1-151.

Koshiba T., Detmer S. A., Kaiser J. T., Chen H., McCaffery J. M. y Chan D. C. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 2004;305:858-862.

Kosone T., Takagi H., Horiguchi N., Ariyama Y., Otsuka T., Sohara N., Kakizaki S., et al. HGF ameliorates a high-fat diet-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G204-210.

Kroy D. C., Schumacher F., Ramadori P., Hatting M., Bergheim I., Gassler N., Boekschoten M. V., et al. Hepatocyte specific deletion of c-Met leads to the development of severe non-alcoholic steatohepatitis in mice. *J Hepatol* 2014;61:883-890.

Kubli D. A. y Gustafsson A. B. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 2012;111:1208-1221.

Lee Y. J., Jeong S. Y., Karbowski M., Smith C. L. y Youle R. J. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 2004;15:5001-5011.

Liesa M., Palacin M. y Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;89:799-845.

Liesa M. y Shirihai O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 2013;17:491-506.

Llambi F., Wang Y. M., Victor B., Yang M., Schneider D. M., Gingras S., Parsons M. J., et al. BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell* 2016.

Lopez-Reyes A. G., Martinez-Flores K., Clavijo-Cornejo D., Nuno-Lambarri N., Palestino-Dominguez M., Souza V., Bucio L., et al. [Cholesterol overload in hepatocytes affects nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH)

activity abrogating hepatocyte growth factor (HGF) induced cellular protection]. *Gac Med Mex* 2015;151:456-464.

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

Machado M. V. y Diehl A. M. Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 2016.

Mannella C. A. Structural diversity of mitochondria: functional implications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1147:171-179.

Mari M., Caballero F., Colell A., Morales A., Caballeria J., Fernandez A., Enrich C., et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;4:185-198.

Marí M., Caballero F., Colell A., Morales A., Caballeria J., Fernandez A., Enrich C., et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism* 2006;4:185-198.

Mari M., Colell A., Morales A., von Montfort C., Garcia-Ruiz C. y Fernandez-Checa J. C. Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2010;12:1295-1331.

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

Matsunami T., Sato Y., Ariga S., Sato T., Kashimura H., Hasegawa Y. y Yukawa M. Regulation of oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor 2 in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Clin Exp Pathol* 2010;3:472-481.

Meshkani R. y Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2009;42:1331-1346.

Montero J., Morales A., Llacuna L., Lluís J. M., Terrones O., Basanez G., Antonsson B., et al. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:5246-5256.

Montessuit S., Somasekharan S. P., Terrones O., Lucken-Ardjomande S., Herzig S., Schwarzenbacher R., Manstein D. J., et al. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell* 2010;142:889-901.

Murphy M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 2009;417:1-13.

Musso G., Gambino R. y Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009;48:1-26.

Musso G., Gambino R. y Cassader M. Emerging molecular targets for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Med* 2010;61:375-392.

Nakamura T., Sakai K., Nakamura T. y Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:188-202.

Nanda K. Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Pediatr Transplant* 2004;8:613-618.

Narendra D., Tanaka A., Suen D. F. y Youle R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008;183:795-803.

Narendra D. P., Jin S. M., Tanaka A., Suen D. F., Gautier C. A., Shen J., Cookson M. R., et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010;8:e1000298.

Neuschwander-Tetri B. A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774-788.

Nunnari J. y Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012;148:1145-1159.

Osada S., Imai H., Tomita H., Tokuyma Y., Okumura N., Sakashita F., Nonoka K., et al. Vascular endothelial growth factor protects hepatoma cells against oxidative stress-induced cell death. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:988-993.

Osellame L. D., Blacker T. S. y Duchon M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:711-723.

Palikaras K. y Tavernarakis N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp Gerontol* 2014;56:182-188.

Parra V., Eisner V., Chiong M., Criollo A., Moraga F., Garcia A., Hartel S., et al. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* 2008;77:387-397.

Perez-Carreras M., Del Hoyo P., Martin M. A., Rubio J. C., Martin A., Castellano G., Colina F., et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:999-1007.

Perichart-Perera O., Balas-Nakash M., Rodriguez-Cano A., Munoz-Manrique C., Monge-Urrea A. y Vadillo-Ortega F. Correlates of dietary energy sources with cardiovascular disease risk markers in Mexican school-age children. *J Am Diet Assoc* 2010;110:253-260.

Pessayre D. y Fromenty B. NASH: a mitochondrial disease. *J Hepatol* 2005;42:928-940.

Pi H., Xu S., Zhang L., Guo P., Li Y., Xie J., Tian L., et al. Dynamin 1-like-dependent mitochondrial fission initiates overactive mitophagy in the hepatotoxicity of cadmium. *Autophagy* 2013;9:1780-1800.

Ponziani F. R., Pecere S., Gasbarrini A. y Ojetti V. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;9:1055-1067.

Presnell J. y Schreibman M. Humason's Animal tissue techniques. 5th ed. ed. Johns Hopkins University Press: Baltimore, 1997.

Rafiq N., Bai C., Fang Y., Srishord M., McCullough A., Gramlich T. y Younossi Z. M. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:234-238.

Ribas V., Garcia-Ruiz C. y Fernandez-Checa J. C. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol* 2014;5:151.

Robertson G., Leclercq I. y Farrell G. C. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1135-1139.

Rolo A. P., Teodoro J. S. y Palmeira C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 2012;52:59-69.

Rosas-Lemus M., Uribe-Alvarez C., Chiquete-Felix N. y Uribe-Carvajal S. In *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphate contributes to the Crabtree effect through closure of the mitochondrial unspecific channel. *Arch Biochem Biophys* 2014;555-556:66-70.

Rudel L. L. y Morris M. D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J Lipid Res* 1973;14:364-366.

Saito T. y Sadoshima J. Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart. *Circ Res* 2015;116:1477-1490.

Sakai K., Aoki S. y Matsumoto K. Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. *J Biochem* 2015;157:271-284.

Santangelo C., Matarrese P., Masella R., Di Carlo M. C., Di Lillo A., Scazzocchio B., Vecci E., et al. Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. *J Mol Endocrinol* 2007;38:147-158.

Sanyal A. J., Campbell-Sargent C., Mirshahi F., Rizzo W. B., Contos M. J., Sterling R. K., Luketic V. A., et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192.

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

Schwimmer J. B., Behling C., Newbury R., Deutsch R., Nievergelt C., Schork N. J. y Lavine J. E. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;42:641-649.

Shannon A., Alkhoury N., Carter-Kent C., Monti L., Devito R., Lopez R., Feldstein A. E., et al. Ultrasonographic quantitative estimation of hepatic steatosis in children With NAFLD. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;53:190-195.

Shirihai O. S., Song M. y Dorn G. W., 2nd. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circ Res* 2015;116:1835-1849.

Simonen P., Kotronen A., Hallikainen M., Sevastianova K., Makkonen J., Hakkarainen A., Lundbom N., et al. Cholesterol synthesis is increased and absorption decreased in non-alcoholic fatty liver disease independent of obesity. *J Hepatol* 2011;54:153-159.

Sozio M. S., Liangpunsakul S. y Crabb D. The role of lipid metabolism in the pathogenesis of alcoholic and nonalcoholic hepatic steatosis. *Semin Liver Dis* 2010;30:378-390.

Srivastava S., Diaz F., Iommarini L., Aure K., Lombes A. y Moraes C. T. PGC-1alpha/beta induced expression partially compensates for respiratory chain defects in cells from patients with mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet* 2009;18:1805-1812.

Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005;5:189-200.

Sugimoto H., Okada K., Shoda J., Warabi E., Ishige K., Ueda T., Taguchi K., et al. Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;298:G283-294.

Sumiyoshi M., Sakanaka M. y Kimura Y. Chronic intake of a high-cholesterol diet resulted in hepatic steatosis, focal nodular hyperplasia and fibrosis in non-obese mice. *The British journal of nutrition* 2010;103:378-385.

Svegliati-Baroni G., Candelaresi C., Saccomanno S., Ferretti G., Bachetti T., Marzioni M., De Minicis S., et al. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006;169:846-860.

Szczepanek K., Lesniewsky E. J. y Larner A. C. Multi-tasking: nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol* 2012;22:429-437.

Tellez-Avila F. I., Sanchez-Avila F., Garcia-Saenz-de-Sicilia M., Chavez-Tapia N. C., Franco-Guzman A. M., Lopez-Arce G., Cerda-Contreras E., et al. Prevalence of metabolic syndrome, obesity and diabetes type 2 in cryptogenic cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008;14:4771-4775.

Timofeeva O. A., Chasovskikh S., Lonskaya I., Tarasova N. I., Khavrutskii L., Tarasov S. G., Zhang X., et al. Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *J Biol Chem* 2012;287:14192-14200.

Tomiya T., Ogata I. y Fujiwara K. Transforming growth factor alpha levels in liver and blood correlate better than hepatocyte growth factor with hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Am J Pathol* 1998;153:955-961.

Trauner M., Arrese M. y Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2010a;1801:299-310.

Trauner M., Arrese M. y Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochimica et biophysica acta* 2010b;1801:299-310.

Twig G., Elorza A., Molina A. J., Mohamed H., Wikstrom J. D., Walzer G., Stiles L., et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008;27:433-446.

Utzschneider K. M. y Kahn S. E. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4753-4761.

Valdes-Arzate A., Luna A., Bucio L., Licona C., Clemens D. L., Souza V., Hernandez E., et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med* 2009;47:424-430.

Valente E. M., Salvi S., Ialongo T., Marongiu R., Elia A. E., Caputo V., Romito L., et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004;56:336-341.

Ventura-Clapier R., Garnier A. y Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 2008;79:208-217.

Vick B., Weber A., Urbanik T., Maass T., Teufel A., Krammer P. H., Opferman J. T., et al. Knockout of myeloid cell leukemia-1 induces liver damage and increases apoptosis susceptibility of murine hepatocytes. *Hepatology* 2009;49:627-636.

Videla L. A. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. *World J Hepatol* 2009;1:72-78.

Videla L. A., Rodrigo R., Orellana M., Fernandez V., Tapia G., Quinones L., Varela N., et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clin Sci (Lond)* 2004;106:261-268.

Wang Y., Ausman L. M., Russell R. M., Greenberg A. S. y Wang X. D. Increased apoptosis in high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats is associated with c-Jun NH2-terminal kinase activation and elevated proapoptotic Bax. *J Nutr* 2008;138:1866-1871.

Wang Y. M., Zhang B., Xue Y., Li Z. J., Wang J. F., Xue C. H. y Yanagita T. The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids Health Dis* 2010;9:4.

Winterbourn C. C., Hawkins R. E., Brian M. y Carrell R. W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med* 1975;85:337-341.

Xu G., Pan L. X., Li H., Shang Q., Honda A., Shefer S., Bollineni J., et al. Dietary cholesterol stimulates CYP7A1 in rats because farnesoid X receptor is not activated. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G730-735.

Yamaguchi K., Yang L., McCall S., Huang J., Yu X. X., Pandey S. K., Bhanot S., et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-1374.

Yang H., Magilnick N., Xia M. y Lu S. C. Effects of hepatocyte growth factor on glutathione synthesis, growth, and apoptosis is cell density-dependent. *Exp Cell Res* 2008;314:398-412.

Yang J., Chatterjee-Kishore M., Staugaitis S. M., Nguyen H., Schlessinger K., Levy D. E. y Stark G. R. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res* 2005;65:939-947.

You L., Wang Z., Li H., Shou J., Jing Z., Xie J., Sui X., et al. The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy* 2015;11:729-739.

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

Zelko I. N., Mariani T. J. y Folz R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002;33:337-349.

Zhao J., Liu T., Jin S. B., Tomilin N., Castro J., Shupliakov O., Lendahl U., et al. The novel conserved mitochondrial inner-membrane protein MTGM regulates mitochondrial morphology and cell proliferation. *J Cell Sci* 2009;122:2252-2262.

Zolezzi J. M., Silva-Alvarez C., Ordenes D., Godoy J. A., Carvajal F. J., Santos M. J. y Inestrosa N. C. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARalpha agonists modulate mitochondrial fusion-fission dynamics: relevance to reactive oxygen species (ROS)-related neurodegenerative disorders? *PLoS One* 2013;8:e64019.

Research Article

Hepatocyte Growth Factor Reduces Free Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress

Mayra Domínguez-Pérez,^{1,2} Natalia Nuño-Lámbarri,^{1,2,3} Denise Clavijo-Cornejo,^{2,4} Armando Luna-López,⁵ Verónica Souza,^{2,6} Leticia Bucio,^{2,6} Roxana U. Miranda,^{2,6} Linda Muñoz,^{6,7} Luis Enrique Gomez-Quiroz,^{2,6} Salvador Uribe-Carvajal,⁸ and María Concepción Gutiérrez-Ruiz^{2,6}

¹Posgrado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 09340 México, DF, Mexico

²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, 09340 México, DF, Mexico

³Unidad de Medicina Traslacional, Clínica y Fundación Médica Sur, 14050 México, DF, Mexico

⁴Laboratorio de Sinovioanálisis, Instituto Nacional de Rehabilitación, 14389 México, DF, Mexico

⁵Instituto Nacional de Geriátrica, Secretaría de Salud, 10200 México, DF, Mexico

⁶Red Fisiopatología de las Enfermedades Hepáticas, PRODEP-SEP, 09340 México, DF, Mexico

⁷Unidad de Hígado "Dr. José E González", Hospital Universitario, UANL, 66450 Monterrey, NL, Mexico

⁸Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to María Concepción Gutiérrez-Ruiz; mcgr@xanum.uam.mx

Received 2 December 2015; Accepted 4 February 2016

Academic Editor: Borna Relja

Copyright © 2016 Mayra Domínguez-Pérez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cholesterol overload in the liver has shown toxic effects by inducing the aggravation of nonalcoholic fatty liver disease to steatohepatitis and sensitizing to damage. Although the mechanism of damage is complex, it has been demonstrated that oxidative stress plays a prominent role in the process. In addition, we have proved that hepatocyte growth factor induces an antioxidant response in hepatic cells; in the present work we aimed to figure out the protective effect of this growth factor in hepatocytes overloaded with free cholesterol. Hepatocytes from mice fed with a high-cholesterol diet were treated or not with HGF, reactive oxygen species present in cholesterol overloaded hepatocytes significantly decreased, and this effect was particularly associated with the increase in glutathione and related enzymes, such as γ -gamma glutamyl cysteine synthetase, GSH peroxidase, and GSH-S-transferase. Our data clearly indicate that HGF displays an antioxidant response by inducing the glutathione-related protection system.

1. Introduction

Nowadays, lipid toxicity is gaining more attention due to the pandemic problem of obesity. Although every lipid possesses specific effects in cells and tissues, cholesterol is positioned as one of the more noxious lipids when it is overloaded in cells. An increase in the consumption of dietary cholesterol represents the main root to complications in the

nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), such as nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [1, 2]; in fact, interference in cholesterol synthesis has proved to induce protective effects against ischemia-reperfusion injury; in addition, cholesterol overload in hepatocytes sensitizes to damage mediated by death receptors ligands such as TNF- α and FAS [2].

The mechanism of cholesterol-induced cell toxicity is not well understood. Some evidences indicate disturbances in cell

plasma membrane [3] and others changes in redox homeostasis by inducing the activation of prooxidant systems such as NADPH oxidase, which, in addition, increases reactive oxygen species (ROS) production, as we recently reported [4], or depletion in mitochondrial glutathione (GSH) [2].

It has been widely reported that the hepatocyte growth factor (HGF) displays a response that regulates the redox homeostasis by different mechanisms and diverse liver diseases such as the expression of antioxidant proteins, or repression of prooxidant systems in alcoholic liver disease [5–8], in drug-induced liver injury [9, 10], or by the action of cytotoxic growth factors like transforming growth factor beta (TGF- β) [11]; even more, HGF can suppress the activity and expression of one of the main ROS generator systems, the NADPH oxidase [12].

The antioxidant response of HGF and the other canonical functions such as proliferation, antiapoptosis, or motogenesis are triggered by its receptor c-Met [13–15]. More evidence have shown that c-Met signaling abrogation, by genetic interference in the receptor, leads to oxidative stress-associated disease progression or aggravation, particularly in fibrosis [16], apoptosis mediated by death receptors [17], or chemical-induced hepatocarcinogenesis [18]; in all cases c-Met KO mice exhibited oxidative stress, even, in the absence of any other stimulus.

In the present work, we were focused on figuring out the antioxidant effect of the HGF in the cholesterol-induced toxicity in primary mouse hepatocytes, using a dietary model of cholesterol liver overload.

2. Material and Methods

2.1. Materials. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH) was purchased from Invitrogen (catalog number c-6827) and recombinant human HGF from PeproTech (Rocky Hill, NJ). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (San Louis, MO).

2.2. Mice, Hepatocyte Isolation, and Culture. CD1 male mice (8 to 10 weeks old) were maintained in pathogen-free housing and cared for in accordance with the Universidad Autónoma Metropolitana and NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Twenty mice were randomly divided in two groups; in HC group 10 animals were fed with a high-cholesterol diet (HC, 2% cholesterol and 0.5% sodium cholate) for two days, as reported by Mari and coworkers [2]. Ten control animals were fed with a regular rodent Chow diet (Purina #5001). After the two days under HC and Chow diets, five animals were sacrificed.

Hepatocytes were isolated from the rest of the HC and Chow mice by the two-step collagenase perfusion, as we previously described [12]. The viability was >90% as assessed by trypan blue exclusion. Hepatocytes were seeded at 2.13×10^5 cells per cm^2 either in Lab-Tek chambered slides or in 10 cm dishes (Nalge, Nunc) in the Ham's F-12/Dulbecco's modified Eagle's basal hepatocyte growth medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 4 h of cells attachment, media were replaced by a serum-free basal

hepatocyte growth medium. In the following day, cells were treated with 50 ng/mL HGF.

2.3. Biochemical Determinations, HGF Serum Content, and Analysis of Liver Function. Serum levels of cholesterol, aspartate aminotransferase (AST), alanine transferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP) activities were determined by automated method using Reflovet Plus (Roche).

Serum samples were obtained from NASH patients and healthy volunteer donors (referred to as control), in the Liver Unit at the University Hospital (UANL, Monterrey, NL, Mexico). All participants signed the document of informed consent process. Serum content of HGF was addressed by ELISA assay using either Mouse/Rat or human HGF Quantikine Immunoassays (R&D systems, Minneapolis, MN), following manufacturer's instructions.

2.4. Western Blot Analysis. Western blot analysis was performed as we previously described [17] using antibodies listed in Supplementary Table 1, in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7960386>.

2.5. Protein Content Determination. Total protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) kit (Pierce Thermo Scientific, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions.

2.6. Oxidative Stress Parameters. Reactive oxygen species (ROS) content was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH), as previously reported [12]. Hepatocytes from both animals Chow and HC were seeded in 96-well plates (5×10^4 cells/well); after overnight stabilization cells were incubated with $5 \mu\text{M}$ DCFH, a cell-permeable nonfluorescent probe that is deesterified intracellularly and converted to the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein upon oxidation by ROS, particularly peroxides (H_2O_2); fluorescence was detected using a DTX 880 multimodal detector (Beckman Coulter) with excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 520.

Carbonyl modification of proteins is a key biomarker for the identification of oxidative stress and was addressed by using Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore, Darmstadt, Germany).

SOD and catalase enzymes activities were determined as we previously reported [19], and GSH and GSSG content were assayed by HPLC as previously reported [17].

2.7. Histology and Immunohistochemistry. Formalin-fixed paraffin-embedded liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) following standard procedures.

2.8. c-Met Immunofluorescence. Immunofluorescence of c-Met was determined as previously reported [20] using anti-c-Met antibody (Cell Signaling Inc.).

2.9. Free Cholesterol Determination by Filipin Staining. Isolated hepatocytes were fixed with formalin 10% for 1 h at room temperature. For free cholesterol determination, cells were incubated with filipin 0.2 mg/mL overnight at 4°C protected

from light. After 3 final washes in PBS, cells were mounted and confocal microscopy images were collected using UV light excitation.

2.10. Neutral Lipid Determination by Oil Red O (ORO). Neutral lipids were determined by ORO staining as previously reported [21]. Fixed hepatocytes were stained with 0.2% ORO solution for 4 h. After rinsing with PBS, cells were counterstained with hematoxylin.

2.11. Statistical Analysis. The data are presented as mean \pm SEM for at least three independent experiments carry out by triplicate. Comparisons between groups were made using Student's *t*-test, and Mann-Whitney test. GraphPad Prism 6 software for OSX was used to run analysis. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. A HC Diet Induces Steatosis and Liver Damage. Animals were fed with a high-cholesterol diet for two days; Figure 1(a) shows gross inspection of the livers; HC exhibits the characteristic pale color of steatosis, and a gallbladder increased in size, in comparison with animals fed with Chow regular diet. Routine H&E staining revealed a microvesicular steatosis and high number of binucleated hepatocytes (arrows) in HC tissue, suggesting ongoing repair process after tissue damage.

The analysis of liver damage markers reveals hepatocellular injury due to HC diet increasing the ALT, AST, and ALP activity in serum from animals under that diet (Figure 1(b)).

Hepatocytes isolated from HC mice and cultured for 24 h exhibited an increment in lipid content, as bright field microscopy clearly shows (Figure 1(c)). Neutral lipids and free cholesterol determination by ORO and filipin staining, respectively, confirmed lipid content in comparison with cells from animals fed with Chow diet; the lipid overload was observed even with bright field microscopy; these results indicate that hepatocytes are overloading lipids and cell culture did not affect this feature.

3.2. Lipid Accumulation in the Liver Decreases *c*-Met Content in Plasma Membrane and HGF Concentration in Serum. Due to HGF and *c*-Met transducing the main repair and survival signals in the damaged liver [13], we decided to address the HGF serum levels in animals under both diets. Figure 2(a) shows a significant decrease in serum HGF concentration in HC animals, and *c*-Met content in plasma membrane is considerably decreased in HC liver tissue as judged by immunofluorescence of the receptor (Figure 2(b)).

3.3. Hepatocytes from HC Fed Animals Are under Oxidative Stress. One of the main consequences of cell lipid overload is ROS generation. Supplementary Figure 1 shows that HC hepatocytes are overproducing ROS judged by DCFH fluorescence (Supplementary Figures 1A and B), and it was related to an increment in protein oxidation (Supplementary Figure 1C) when comparing with Chow cells.

3.4. HGF Decreases ROS Content in HC Hepatocytes by Increasing GSH Antioxidant System. As previously reported

HGF can control cellular redox status [12]; to figure out if HGF is able to induce this response in cholesterol overloaded cells, we treated hepatocytes with HGF (50 ng/mL) for different times and ROS content was determined. Figure 3(a) shows that HGF decreased ROS in HC hepatocytes in a time-dependent manner, reaching control values at 24 h; this effect was corroborated by fluorescence microscopy (Figure 3(b)) at 24 h. HGF induced the expression of catalase at 12 and 24 h in Chow cells. SOD1 was also increased in HC cells but failed in Chow hepatocytes (Figure 4(a)). To confirm that, we assayed the activity of these enzymes at 24 h of HGF treatment; Figure 4(b) shows the activity of the enzymes; catalase activity is considerably increased in HC NT cells, in comparison with Chow NT, but no changes were observed in HGF treatment; in the case of total SOD activity there is no difference in NT cells, and HGF only induced an increase in the activity in Chow cells.

To gain more evidence of the HGF-induced antioxidant response, we assayed the GSH ratio by HPLC; Figure 4(c) depicts an increase in GSH ratio at 12 h of treatment, which is consistent with the cellular response elicited by HGF. The immunoblot analysis of the main GSH-related antioxidant enzymes (Figure 4(d)) shows that HGF was able to induce the expression of γ -GCS, G6PD, MGST, and GPX3/4/5 in Chow cells; interestingly no significant changes were observed in γ -GCS in HC hepatocytes; however, G6PD was elevated in HC suggesting GSSG recycling as a mechanism of protection (Supplementary Figure 2).

Finally, in order to find the significance of HGF in cholesterol-relevant human liver disease, such as nonalcoholic steatohepatitis in humans [1], we assayed serum HGF levels in patients with NASH. Figure 5 shows the ELISA result of HGF quantification; it is clear that NASH patients present a significant increase in circulating levels of HGF; these data suggest that HGF/*c*-Met signaling is required for a proper response against NASH in humans where free cholesterol is frequently accumulated.

4. Discussion

We, and others, have previously reported that cholesterol overload induces cytotoxic effects and oxidative stress in the liver [2, 4, 22], as Figure 1 supports; although Marí and collaborators reported that mitochondrial GSH depletion is related to sensitization to TNF- or FAS-induced cellular damage [2], the mechanism of oxidative stress-mediated injury remained partially characterized.

It has been extensively reported that HGF displays an antioxidant response under canonical liver insults, inducing protection by the expression of antioxidant [8], and antiapoptotic proteins [17]. In order to characterize the response of HGF in cholesterol overloaded hepatic cells, we isolated primary mouse hepatocytes from animals fed with a high-cholesterol diet for two days. Although the dietary model that we followed is not canonical of NASH, primary mouse hepatocytes from HC animals clearly exhibited an increment in neutral lipids and free cholesterol content, as Figure 1(c) shows; in addition, oxidative stress was also confirmed (Supplementary Figure 1); our results in mice are

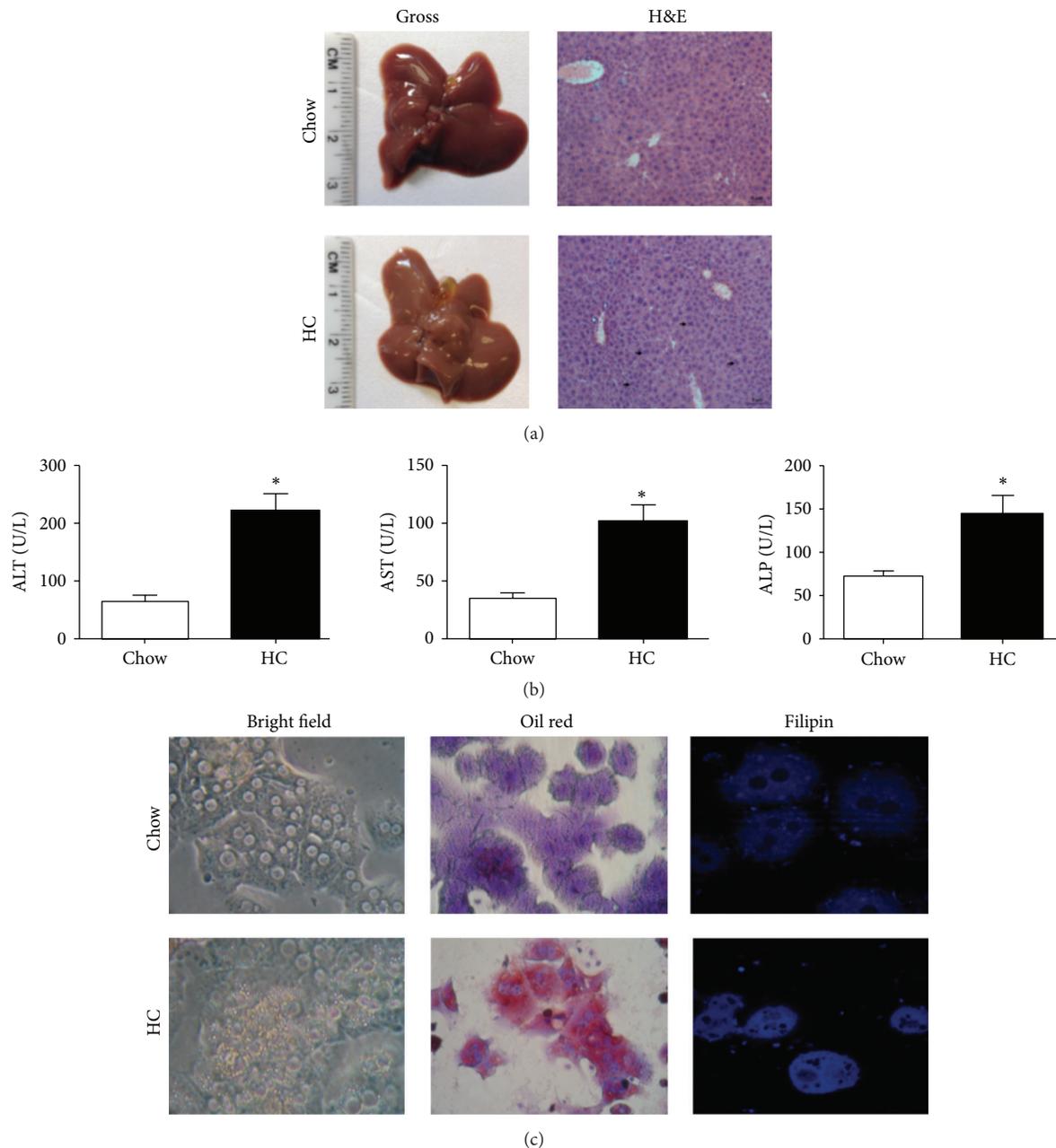


FIGURE 1: High-cholesterol diet induces liver injury and hepatocytes lipid overload. (a) Gross inspection of the liver and hematoxylin and eosin (H&E) staining of liver tissue from animals under normal Chow and high-cholesterol (HC) diet for two days. Arrows indicate hepatocyte proliferation. (b) Liver function test: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP). (c) Bright field microscopy; neutral lipids and free cholesterol content assessed by Oil Red and filipin staining, respectively, of HC and Chow hepatocytes. Images are representative of at least three independent experiments. Original magnification, 200x. Each column represents mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ versus Chow diet.

in agreement with those found in rats by Marí and coworkers [2].

HGF efficiently displays an antioxidant response by increasing key enzymes that maintain ROS under control [23], such as catalase or SOD1, in a mechanism dependent on the activation of nuclear factor kappa B [5]. It is important to note that alcohol-induced oxidative stress is dependent on the activity of the cytochrome P450 2E1 located in the

endoplasmic reticulum; in the steatosis model used in this study, mitochondria play a significant role [2], and we were focused to know if HGF can also display a protective response in cells with mitochondria dysfunction as it does control NADPH oxidase- or Cyp2E1-mediated damage, in hepatic cells [5]. Figure 3(a) shows that HGF treatment decreases ROS production and protein oxidation. Interestingly, catalase content, determined by western blotting, was induced in

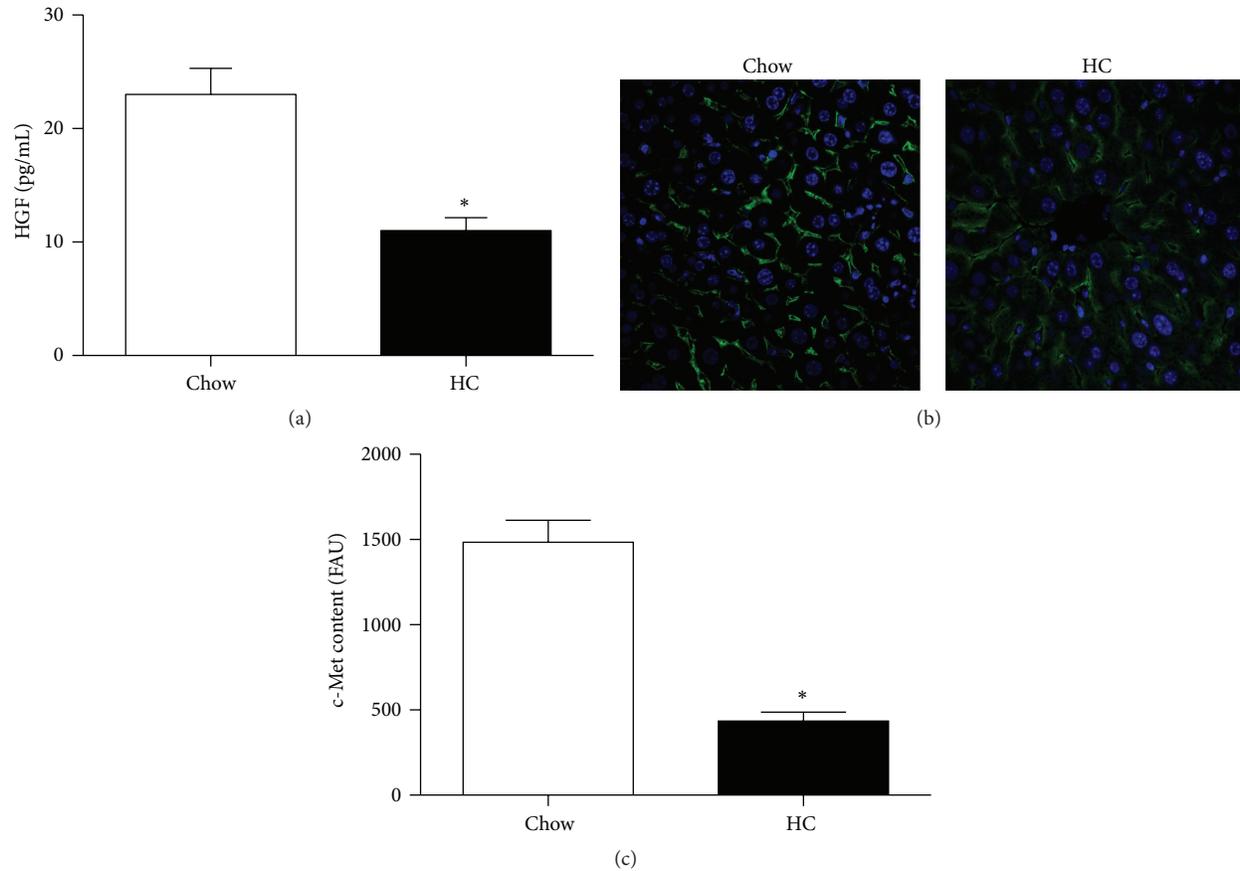


FIGURE 2: Cholesterol overload in primary mouse hepatocytes affects HGF levels and c-Met expression. A high cholesterol diet induces a decrease in serum HGF levels (a), quantified by ELISA, and c-Met expression assayed by immunofluorescence, original magnification, 200X (b). c-Met immunofluorescence quantification (c). Images are representative of at least three independent experiments. Each column represents mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ versus Chow.

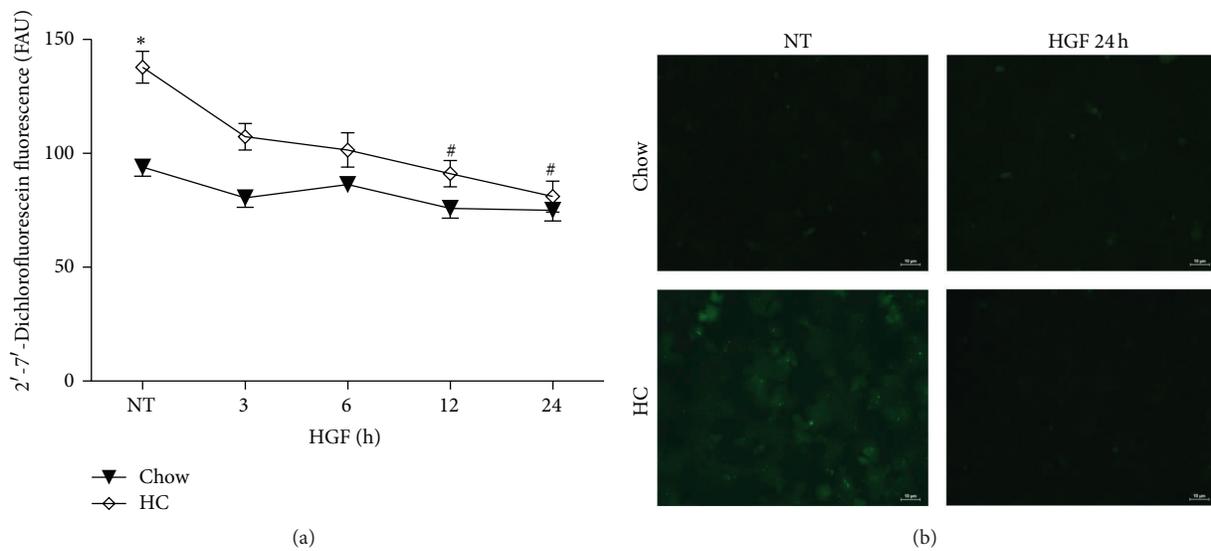


FIGURE 3: HGF decreases the oxidative stress induced by the cholesterol overload. (a) Quantification of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence: data are reported as fluorescence arbitrary units (FAU). Each point represents mean \pm SEM of at least four independent experiments. (b) Representative confocal images of peroxides content determined by 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in Chow and HC cells treated or not with HGF for 24 h. * $p < 0.05$ versus Chow, # $p < 0.05$ versus nontreated HC cells.

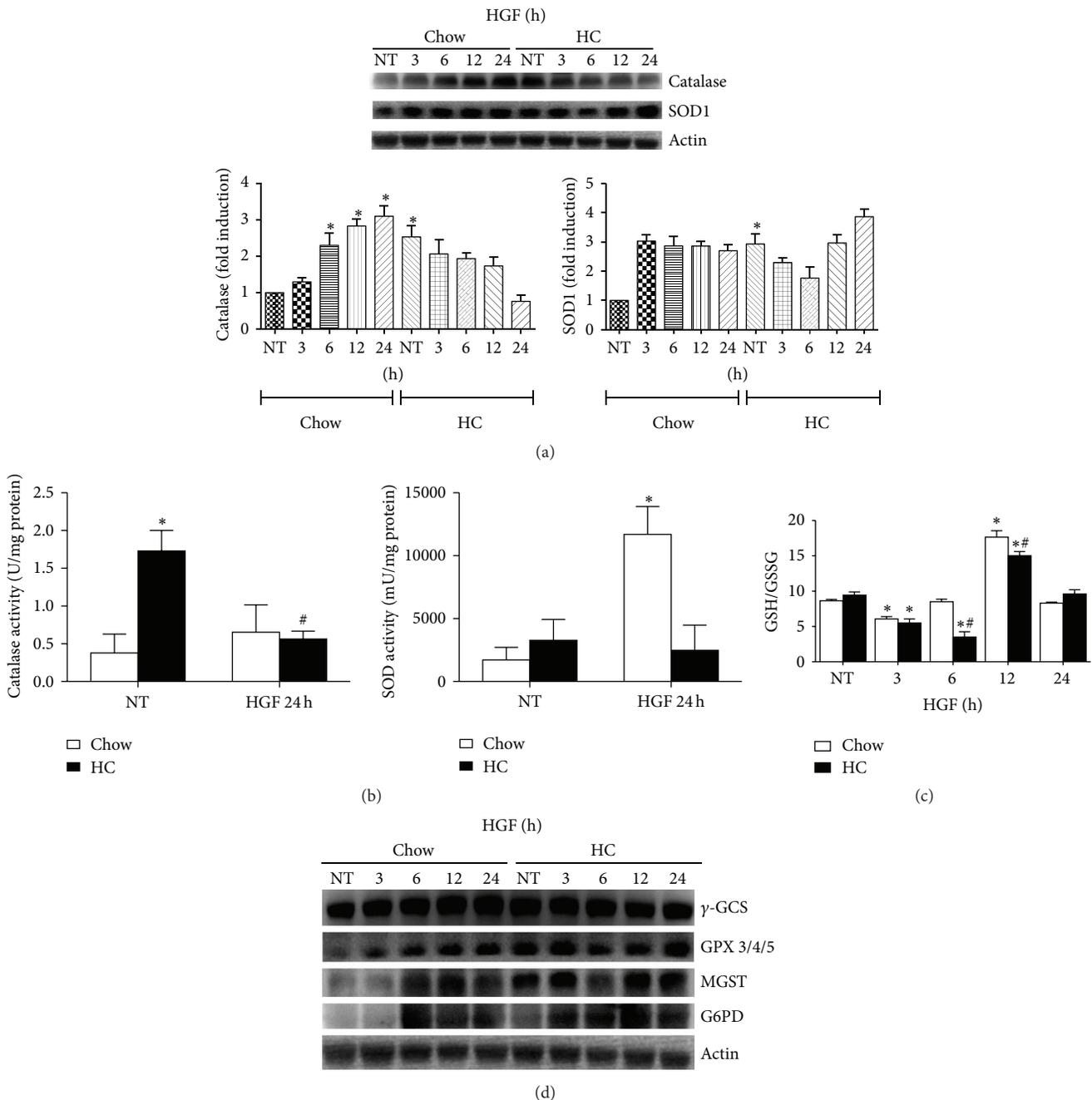


FIGURE 4: HGF effect on antioxidants enzymes and GSH ratio. (a) Western blot and densitometric analysis of catalase and superoxide dismutase 1 (SOD1) under HGF treatment for different times. (b) Enzymatic activity of catalase and SOD, in Chow and HC cells treated with HGF for 24 h. (c) Ratio of reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), determined by HPLC. Chow and HC cells were treated with HGF for different times. Each column represents the mean \pm SEM of three independent experiments. (d) Western blot analysis of γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS); GSH peroxidase (GPX) 3/4/5; mammal GSH-S-transferase (MGST); and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Images are representative of at least three independent experiments. Actin was used as housekeeping loading control. Each column represents mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ versus nontreated Chow cells; # $p < 0.05$ versus nontreated HC cells.

hepatocytes from Chow fed animals, but its content decreased in a time-dependent manner in HC cells; even more, SOD1 increases in HC cells, with no significant changes in Chow hepatocytes (Figure 4(a)).

To confirm our data, we decided to assay the activity of both enzymes at 24 h of HGF treatment. Cholesterol induced 4-fold increment catalase activity and HGF treatment decrease it to basal values; this result is in agreement

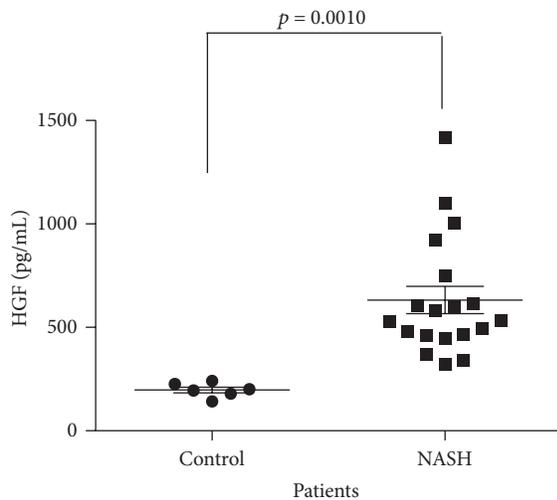


FIGURE 5: Serum HGF levels in NASH patients and healthy volunteers (control) determined by ELISA.

with that observed in western blot. In the case of SOD, no changes were observed in the activity of the enzyme under cholesterol treatment; however, as expected, HGF induced the SOD activity at 24 h. These proteins are among the main ROS detoxifying enzymes, and particularly the three forms of SOD are quite sensitive to ROS changes inducing their content decrement or activity as we recently showed [24]; however, cholesterol overload in hepatocytes does not seem to alter SOD at least at two days under HC diet.

To continue exploring the antioxidant response elicited by HGF, we were focused on the GSH system. We have clear evidence that HGF can stimulate the GSH system machinery, particularly the key enzyme in GSH synthesis, the gamma-glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), which, in addition, increases GSH content [5, 17]; in the present study we did find the same effect in Chow cells; interestingly, γ -GCS content in HC cells slightly decreased with HGF treatment, but GSH/GSSG ratio presented a different behavior; HGF induced a decrease in the tripeptide ratio at 6 h comparing with Chow cells, and at 12 h GSH ratio exhibited a significant recovery. These were in agreement with the expression of the main enzymes related to GSH, such as γ -GCS, GSH peroxidase, GSH-S-transferase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase, which provide NADPH, the main electron donor in the reduction of GSSG into GSH by GSH reductase [25]; all these enzymes were induced by HGF in the Chow cells, in a time-dependent manner; nontreated HC cells exhibited a basal overexpression of these antioxidant enzymes; comparing with nontreated Chow cells, a slight increment was observed at 12 and 24 h. These data clearly indicate that HGF protects by inducing GSH systems. As indicated by Marí and coworkers in rat hepatocytes [2], mitochondrial GSH depletion induced the sensitization to death receptors-mediated injury; the reestablishment of GSH avoided this effect. Similarly it has been observed that c-Met signaling deletion triggered more liver lesions in animals

under N-nitrosodiethylamine treatment [18]; the coadministration of N-acetyl-cysteine, a well known GSH precursor [26], induced a significant decrease in lesion formation and in size of tumors, leaving the relevance of GSH in HGF-mediated cellular protection clear.

The relevance of HGF in lipid-induced toxicity has been confirmed even in nonhepatic cells such as the insulinoma-derived cell line RINm5F, where the growth factor repressed the free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress [15]. In addition, the specific c-Met elimination in the liver presented an aggravated steatosis under methionine-choline deficient diet, compared with WT litter mice [27], characterized for an enhanced apoptosis and inflammatory response.

Finally, it is clear that HGF induces an antioxidant response; however, it is well known that this growth factor can control many other cellular responses. As it has been proved in the present work, high-cholesterol diet can lead to oxidative stress, characteristic that can aggravate the liver disease, such as steatosis or steatohepatitis. More research is required to understand the impact of HGF, even far away from ROS manage.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT no. 166042 and no. 252942 and PRODEP-SEP no. 913026-14612111, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I).

References

- [1] F. Caballero, A. Fernández, A. M. De Lacy, J. C. Fernández-Checa, J. Caballería, and C. García-Ruiz, "Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH," *Journal of Hepatology*, vol. 50, no. 4, pp. 789–796, 2009.
- [2] M. Marí, F. Caballero, A. Colell et al., "Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis," *Cell Metabolism*, vol. 4, no. 3, pp. 185–198, 2006.
- [3] J. Grouleff, S. J. Irudayam, K. K. Skeby, and B. Schiott, "The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1848, pp. 1783–1795, 2015.
- [4] A. G. Lopez-Reyes, K. Martinez-Flores, D. Clavijo-Cornejo et al., "Cholesterol overload in hepatocytes affects nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH) activity abrogating hepatocyte growth factor (HGF) induced cellular protection," *Gaceta Médica de México*, vol. 151, no. 4, pp. 456–464, 2015.
- [5] A. Valdés-Arzate, A. Luna, L. Bucio et al., "Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 4, pp. 424–430, 2009.
- [6] M. T. Donato, J. Gómez-Lechón, R. Jover, T. Nakamura, and J. V. Castell, "Human hepatocyte growth factor down-regulates the

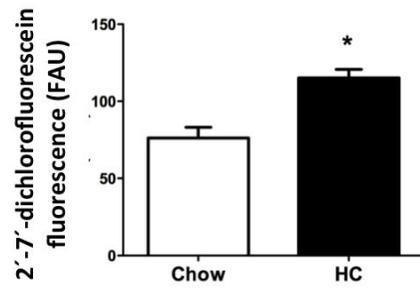
- expression of cytochrome P450 isozymes in human hepatocytes in primary culture,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 284, no. 2, pp. 760–767, 1998.
- [7] S. Tsuboi, “Elevation of glutathione level in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor via induction of γ -glutamylcysteine synthetase,” *Journal of Biochemistry*, vol. 126, no. 5, pp. 815–820, 1999.
- [8] H. Yang, N. Magilnick, M. Xia, and S. C. Lu, “Effects of hepatocyte growth factor on glutathione synthesis, growth, and apoptosis is cell density-dependent,” *Experimental Cell Research*, vol. 314, no. 2, pp. 398–412, 2008.
- [9] C. Enriquez-Cortina, M. Almonte-Becerril, D. Clavijo-Cornejo et al., “Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage,” *Toxicological Sciences*, vol. 135, no. 1, pp. 26–36, 2013.
- [10] D. Han, N. Hanawa, B. Saberli, and N. Kaplowitz, “Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 291, no. 1, pp. G1–G7, 2006.
- [11] A. Martínez-Palacián, G. del Castillo, A. Suárez-Causado et al., “Mouse hepatic oval cells require met-dependent PI3k to impair TGF- β -induced oxidative stress and apoptosis,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e53108, 2013.
- [12] D. Clavijo-Cornejo, C. Enriquez-Cortina, A. López-Reyes et al., “Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 95, no. 6, pp. 1177–1184, 2013.
- [13] L. Trusolino, A. Bertotti, and P. M. Comoglio, “MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 11, no. 12, pp. 834–848, 2010.
- [14] P. M. Comoglio, “Pathway specificity for Met signalling,” *Nature Cell Biology*, vol. 3, no. 7, pp. E161–E162, 2001.
- [15] C. Santangelo, P. Matarrese, R. Masella et al., “Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress,” *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 38, no. 1-2, pp. 147–158, 2007.
- [16] J. U. Marquardt, L. Gomez-Quiroz, L. O. Arreguin Camacho et al., “Curcumin effectively inhibits oncogenic NF-kappaB signaling and restrains stemness features in liver cancer,” *Journal of Hepatology*, vol. 63, pp. 661–669, 2015.
- [17] L. E. Gómez-Quiroz, V. M. Factor, P. Kaposi-Novak, C. Coulouarn, E. A. Conner, and S. S. Thorgeirsson, “Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 21, pp. 14581–14589, 2008.
- [18] T. Takami, P. Kaposi-Novak, K. Uchida et al., “Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis,” *Cancer Research*, vol. 67, no. 20, pp. 9844–9851, 2007.
- [19] L. Gómez-Quiroz, L. Bucio, V. Souza et al., “Interleukin 8 response and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde or lipopolysaccharide,” *Hepatology Research*, vol. 26, no. 2, pp. 134–141, 2003.
- [20] J. U. Marquardt, D. Seo, L. E. Gómez-Quiroz et al., “Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl₄ exposure through deregulation of multiple molecular pathways,” *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, vol. 1822, no. 6, pp. 942–951, 2012.
- [21] I. Hernández, M. Domínguez-Pérez, L. Bucio et al., “Free fatty acids enhance the oxidative damage induced by ethanol metabolism in an in vitro model,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 76, pp. 109–115, 2015.
- [22] M. C. Gutierrez Ruiz, M. Dominguez Perez, S. Rodriguez Gonzalez, N. Nuno Lambarri, C. Licona Retama, and L. E. Gomez-Quiroz, “High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor,” *Gaceta Médica de México*, vol. 148, no. 3, pp. 236–242, 2012.
- [23] C.-H. Chiang, W.-W. Wu, H.-Y. Li et al., “Enhanced antioxidant capacity of dental pulp-derived iPSC-differentiated hepatocytes and liver regeneration by injectable HGF-releasing hydrogel in fulminant hepatic failure,” *Cell Transplantation*, vol. 24, no. 3, pp. 541–559, 2015.
- [24] D. Clavijo-Cornejo, M. Gutiérrez-Carrera, M. Palestino-Domínguez et al., “Acetaldehyde targets superoxide dismutase 2 in liver cancer cells inducing transient enzyme impairment and a rapid transcriptional recovery,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 69, pp. 102–108, 2014.
- [25] H.-Y. Ho, M.-L. Cheng, and D. T.-Y. Chiu, “Glucose-6-phosphate dehydrogenase—beyond the realm of red cell biology,” *Free Radical Research*, vol. 48, no. 9, pp. 1028–1048, 2014.
- [26] Y. Samuni, S. Goldstein, O. M. Dean, and M. Berk, “The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, vol. 1830, no. 8, pp. 4117–4129, 2013.
- [27] D. C. Kroy, F. Schumacher, P. Ramadori et al., “Hepatocyte specific deletion of c-Met leads to the development of severe non-alcoholic steatohepatitis in mice,” *Journal of Hepatology*, vol. 61, no. 4, pp. 883–890, 2014.

Supplementary information and data

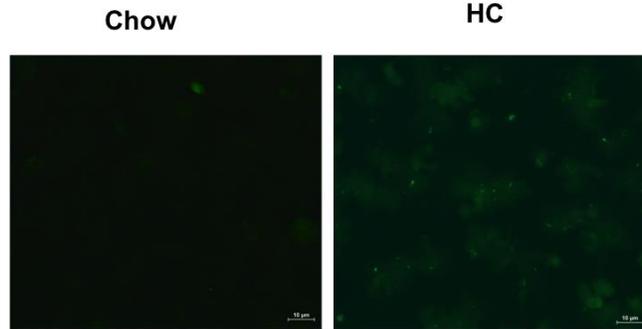
Antibody	Catalog	Company	Dilution
Catalase	C0979	Sigma Aldrich	1:3000
SOD 1	sc-11407	Santa Cruz Biotechnology	1:2000
γ -GCS	sc-22755	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
MGST	sc-138	Santa Cruz Biotechnology	1:200
GPX 3/5/6	sc-55102	Santa Cruz Biotechnology	1:200
G6PD	8866	Cell Signaling	1:1000
Actin	A3854	Sigma Aldrich	1:10,000

Supplementary table 1. Antibodies used in Western blots studies in the present work
SOD, Superoxide dismutase; γ -GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; MGST, mammal
Glutathione S transferase; GPX, Glutathione peroxidase. G6PD, Glucose-6-Phosphate
Dehydrogenase

A)



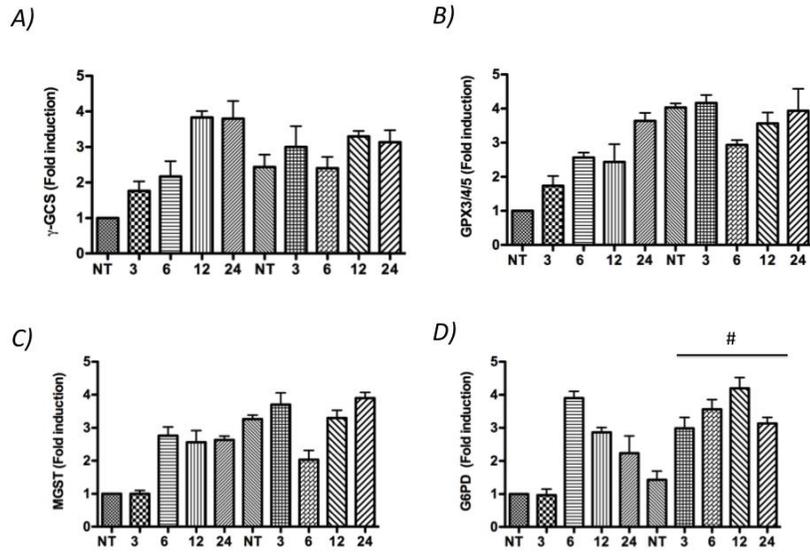
B)



C)



Supplementary figure 1 *Cholesterol induces oxidative stress in primary mouse hepatocytes.* Peroxides content determined by DCFH fluorescence in, (A) chow and, (B) HC hepatocytes. (C) Quantification of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence, data are reported as fluorescence arbitrary units (FAU). (D) Protein oxidation determined by oxyblot. Images are representative of at least three independent experiments. Each column represents mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ vs chow diet.



Supplementary figure 2 HGF effect on antioxidants enzymes. Densitometric analysis of Western blots of figure 4. (A) γ - gamma glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS); (B) GSH peroxidase (GPX) 3/4/5; (C) mammal GSH S transferase (MGST); and (D) glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Each column represents mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ vs not treated Chow cells, # $p < 0.05$ vs not treated HC cells.