



AVANCES EN EL ESTUDIO
EXPERIMENTAL DE LA
BIOQUÍMICA
HEPÁTICA

Blanca Alicia Delgado Coello • Jaime Mas Oliva

AVANCES EN EL ESTUDIO
EXPERIMENTAL DE LA
BIOQUÍMICA
HEPÁTICA

Blanca Alicia Delgado Coello

Jaime Mas Oliva



Instituto de
Fisiología
Celular,
U N A M



Ciudad de México, 2017

INICIO / CONTENIDO

Primera edición: 2017.

D.R. © 2017. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán,

C.P. 04510, Ciudad de México, México.

ISBN: 978-607-02-9076-3

El libro está disponible sin costo en los siguientes sitios:

https://www.researchgate.net/profile/B_Coello/info;
https://www.researchgate.net/profile/Jaime_Mas-Oliva
mas-oliva-lab.com
www.ifc.unam.mx

Prohibida la reproducción total o parcial con fines comerciales por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Diseño y armado editorial:

BMD Bojalil Multimedia y Diseño.

Hecho en México.

Las autoras de los capítulos deseamos agradecer el apoyo entusiasta e incondicional que la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Directora del Instituto de Fisiología Celular, brindó para la publicación de este libro.

Contenido

Prólogo	I
---------	---

Introducción	II
--------------	----

Autoras	III
---------	-----

CAPÍTULO 1.	
Aislamiento y cultivo de células hepáticas	19
Marcela Sosa Garrocho	

CAPÍTULO 2.	
Fibrosis hepática y carcinoma hepatocelular	61
Blanca Alicia Delgado Coello	
Marcela Sosa Garrocho	

CAPÍTULO 3.

La hepatectomía parcial como modelo de estudio de la regeneración hepática 85

Blanca Alicia Delgado Coello

CAPÍTULO 4.

Papel de las balsas lipídicas membranales en el hepatocito 113

Blanca Alicia Delgado Coello

CAPÍTULO 5.

Ingeniería de tejidos 141

Blanca Alicia Delgado Coello

CAPÍTULO 6.

Regulación epigenética en el tejido hepático 165

Blanca Alicia Delgado Coello

Rocío Alcántara Hernández

Prólogo

A lo largo de la historia de la civilización, el hombre por naturaleza ha buscado entender los fenómenos que lo rodean. Sin embargo, tuvieron que transcurrir muchos siglos para poder desarrollar desde una visión intuitiva y dogmática, nuestra visión actual de la ciencia basada en la observación y en la experimentación. Como ejemplo de este concepto, podría ser mencionada la transición llevada a cabo desde la generación de los conceptos vertidos por Hipócrates y más tarde por Aristóteles, al postular los cuatro “humores” fundamentales; la sangre, la bilis amarilla, la bilis negra y la flema, a las cuales Galeno añadió el pneuma que a su vez subdividió en tres espíritus. Solamente con la llegada de Andreas Vesalio fue que finalmente se corrigió y aumento el conocimiento de la anatomía humana en su tratado *De humani corporis fabrica*, donde como ejemplo de estas precisiones, el quinto libro de este tratado presenta al hígado humano con dos lóbulos y no cinco como fuera postulado por Galeno. De manera verdaderamente increíble, la pausa llevada a cabo entre el trabajo de Galeno nacido en la actual Bergama, Turquía en el año 130 y Andreas Vesalio quien naciera en Bruselas, Bélgica en el año 1514 corresponde a un lapso de prácticamente 14 siglos en los cuales los conceptos galénicos fueron transmitidos de generación en generación en el mundo antiguo y solamente con la llegada de Vesalio el dogma pudo ser eliminado a través de la observación y la experimentación. Un número importante de autores consideran este momento como el inicio de la medicina científica. De alguna forma, este avance clave permitió por ejemplo a Francis Glisson en el siglo XVII describir la relación entre la estructura lobular hepática y la distribución de los vasos sanguíneos, así como llevar a cabo el descubrimiento de que la bilis es secretada

por el parénquima hepático. Dentro del mismo siglo, Marcello Malpighi, considerado padre de la histología fue el primero en observar a la célula hepática. Con base en este tipo de observaciones realizadas por diversos estudiosos de la época, se inició el establecimiento del fenómeno general de que los tejidos y finalmente los seres vivos están constituidos por un gran número de unidades actualmente conocidas como células y por lo tanto reconociéndose a la teoría celular como fundamento de la vida. Con soporte en este tipo de avances, es que la bioquímica como ciencia inicia el estudio a nivel molecular de esta unidad mínima que es la célula. Ya en años posteriores se describieron un número importante de vías metabólicas y diversas estructuras celulares como lo son los organelos y las membranas, para finalmente ya adelantado el siglo XX y con la definición de la estructura molecular del ADN naciera el concepto de la biología molecular.

Las participantes de este libro y en especial la maestra Blanca Delgado no han pretendido elaborar un compendio de la especialidad, sino más bien ha prevalecido la idea de enmarcar de una manera sencilla y práctica algunos puntos de la bioquímica de la célula hepática con el propósito de facilitar algunos aspectos del aprendizaje experimental y conocimiento integral de tendencias con enfoque celular y molecular.

Dr. Jaime Mas Oliva

Instituto de Fisiología Celular

Universidad Nacional Autónoma de México

Introducción

Gran parte de los nuevos conocimientos biomédicos surgen de laboratorios donde se realiza investigación básica que eventualmente puede tener aplicación en mejores tratamientos para los pacientes. La fisiología hepática comprende un área de interés desde el punto de vista bioquímico y clínico que debe revisarse constantemente por la gran cantidad de información que se genera. Por tanto, el objetivo primordial de esta compilación es ofrecer a los alumnos de pregrado que deseen aproximarse al conocimiento básico de la bioquímica hepática y sus aplicaciones, una serie de fundamentos teóricos y algunos de los avances de mayor interés que sin duda serán de utilidad en su futuro profesional. Los tópicos no se exponen de manera exhaustiva pero se ofrece una serie selecta de referencias clásicas y recientes a consideración de las autoras quienes realizamos investigación de la bioquímica hepática desde distintos enfoques. Es importante destacar, que en algunos de los capítulos se incluyen detalles metodológicos que son parte de la experiencia de las autoras en sus grupos de trabajo.

Brevemente, este trabajo comienza con la descripción de las bases teóricas del contexto hepático y de la metodología básica de perfusión del hígado que permite la eliminación de células sanguíneas y la posterior digestión del tejido para el aislamiento y cultivo de los distintos tipos celulares que lo componen. Cada célula tiene funciones relevantes tanto en condiciones de salud como en procesos patológicos lo cual queda en evidencia en el capítulo referente al desarrollo de

fibrosis, cirrosis hepática y carcinomas hepatocelulares. Presentamos también los interesantes modelos para el estudio de la regeneración hepática, con énfasis en la técnica de hepatectomía parcial que es el método quirúrgico más utilizado. Asimismo, abordamos los avances y controversias en torno a dominios específicos presentes en las membranas plasmáticas de los hepatocitos conocidos como balsas lipídicas. Los dos últimos capítulos incluyen enfoques de vanguardia como lo es la ingeniería de tejidos cuyo gran reto es generar en primera instancia matrices biocompatibles, y lograr usarlas como sustratos para producir tejido hepático tridimensional y funcional útil en trasplantes. Además, hemos incluido un capítulo que aborda el interesante enfoque relacionado con el estudio de la regulación génica por mecanismos epigenéticos subyacentes a distintas patologías del hígado que se estudian activamente en la actualidad.

Finalmente, las autoras hacemos patente nuestro deseo de lograr mediante este trabajo el doble propósito de motivar a los alumnos a iniciarse en el campo experimental y de contribuir con una guía teórica que fundamente el ejercicio práctico de los estudiantes que inician tesis y estudios de posgrado de la carrera de Biología y ciencias experimentales afines.

Blanca Alicia Delgado Coello

Autoras



Rocío Alcántara Hernández.

Técnico Académico Titular "C", de tiempo completo adscrita al laboratorio del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz del Departamento de Biología Celular y Desarrollo del IFC de la UNAM cuya línea de investigación se centra en la regulación de distintos receptores acoplados a proteínas G.

Blanca Alicia Delgado Coello.

Técnico Académico Titular "C", de tiempo completo adscrita al laboratorio del Dr. Jaime Mas Oliva del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del IFC de la UNAM donde uno de sus intereses es el estudio del papel de las ATPasas de calcio de membrana plasmática en la homeostasis de calcio y sus mecanismos de regulación principalmente en el tejido hepático.





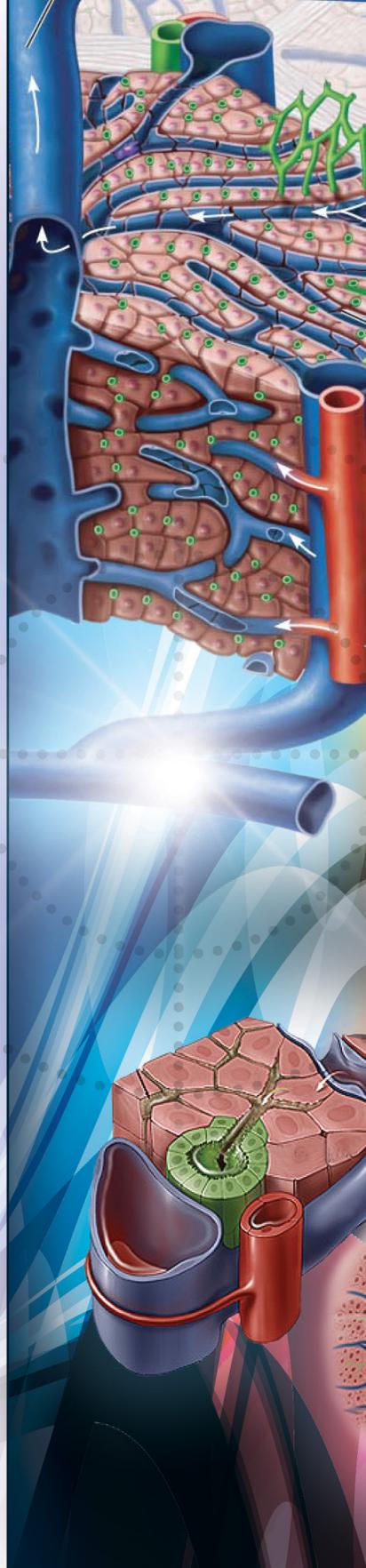
Marcela Sosa Garrocho.

Técnico Académico Titular "B", de tiempo completo adscrita al laboratorio de la Dra. Marina Macías Silva del Departamento de Biología Celular y Desarrollo del IFC de la UNAM cuyos estudios abordan los mecanismos de señalización mediados por el factor de crecimiento transformante (TGF- β) en células hepáticas normales y en líneas celulares neoplásicas.

CAPÍTULO 01

Aislamiento y cultivo de células hepáticas

Marcela Sosa Garrocho



Generalidades de la anatomía y fisiología hepática

El hígado es un órgano esencial encargado de una gran diversidad de funciones, entre las de tipo sintéticas destacan, la síntesis de albúmina, el metabolismo de lípidos y carbohidratos; también lleva a cabo la secreción de ácidos biliares y la eliminación (detoxificación) de ciertos químicos. En etapas fetales, el hígado participa además en hematopoiesis y en la homeostasis de calcio (Delgado-Coello y Mas-Oliva, 2014). El hígado recibe un doble aporte sanguíneo, el 75% proveniente de los intestinos, del bazo y del páncreas a través de la vena porta y el 25% del suministro sanguíneo de la arteria hepática, el cual contribuye a la intercomunicación del hígado con estos órganos que es fundamental para realizar sus funciones.

A nivel macroscópico el hígado está formado por lóbulos claramente distinguibles, donde el lóbulo derecho representa un 60-70% de la masa hepática, en tanto los lóbulos izquierdo y caudado forman el 30% restante. De acuerdo a la clasificación de Couinaud basada en criterios más bien funcionales, en el humano el hígado puede dividirse en 8 segmentos cada uno recibiendo aporte de una tríada portal, así el lóbulo caudado contiene al segmento I; el lóbulo izquierdo los segmentos II-IV y el lóbulo derecho, los segmentos V-VIII (Tsong y Geller, 2011).

El lobulillo hepático representa la unidad estructural y funcional del hígado, que presenta forma poligonal cuyo centro está ocupado por la vena central y hacia los bordes de tres a seis tríadas portales. Cada tríada portal está formada por el ducto biliar, una rama de la arteria hepática y otra de la vena porta. En un corte de la tríada portal puede distinguirse la ubicación de los distintos componentes celulares (Fig. 1). En el lobulillo hepático pueden distinguirse tres zonas, la zona periportal (o zona 1); la zona media (o zona 2) y la zona pericentral (o zona 3), que reciben un mayor (zona periportal) a menor (zona pericentral) aporte de oxígeno y nutrientes (Krishna, 2013). Los hepatocitos residentes en cada una de estas zonas desempeñan también funciones diferenciadas; aquellos de

la zona 1 participan mayoritariamente en la gluconeogénesis, síntesis de urea y la β -oxidación de ácidos grasos (Stanger, 2015). Los hepatocitos de la zona 3 intervienen en la glucólisis y en lipogénesis. Estas zonas corresponden con las poblaciones de hepatocitos que proliferan primero (zona 1) y las que lo hacen más tardíamente (zona 3) cuando el hígado prolifera después de distintos estímulos (Capítulo 3). En condiciones de homeostasis, el tejido hepático que se caracteriza por presentar un bajo índice mitótico muestra que los hepatocitos pericentrales, son capaces de hacer uso de sus propiedades tipo célula madre y repoblar el hígado en caso necesario (Wang y col., 2015). En condiciones de daño crónico moderado, recientemente se han descrito poblaciones de hepatocitos híbridos que comparten genes propios de hepatocitos (HNF4 α) y de células ductales (Sox9) y que al parecer son capaces de repoblar el tejido (Font-Burgada y col., 2015).

El tejido hepático está conformado en un 85% por hepatocitos, cuyo tamaño oscila entre 15 y 25 μm (algunos mencionan hasta 40 μm), que son llamados genéricamente células parenquimatosas. Una característica frecuente en los hepatocitos desde etapas embrionarias, es la poliploidía que podría conferirles resistencia al daño crónico por diversos estímulos. El 15% del hígado comprende a las células no parenquimatosas, las cuales son menores de 10 μm e incluyen a las células de Kupffer, las células sinusoidales endoteliales y las células estrelladas (o de Ito) en proporciones de 30, 60 y 10%, respectivamente (Valatas y col., 2003). Existen otras células en menor proporción: las células epiteliales del ducto biliar, las células dendríticas, entre otras, cada una con características morfológicas y funcionales definidas. Los hepatocitos forman placas alineadas y entre ellas se encuentra una red compleja de espacios vasculares llamados sinusoides, recubiertos por un endotelio discontinuo y fenestrado conformado por las células endoteliales (SEC, por sus siglas en inglés, "*sinusoidal endothelial cells*"), a través del sinusoides circulan sangre oxigenada proveniente de la arteria hepática y nutrientes provenientes de la vena porta, residen ahí también las células de Kupffer (KC, por sus siglas en inglés, "*Kupffer cells*") y otras células del sistema inmune. Los sinusoides están separados de

los hepatocitos por el espacio perisinusoidal o espacio de *Disse*, donde radican las células estrelladas (HSC, por sus siglas en inglés, “*hepatic stellate cells*”) intercaladas entre los cordones de hepatocitos (Fig. 1). El espacio de Disse fue descrito por Joseph Hugo Vincent Disse en 1890 (Schmid, 1991), el cual comprende un estrecho espacio de 0.5-1 μm donde se realizan importantes funciones de señalización mediadas de manera autócrina y parácrina, e intercambio de nutrientes entre los distintos tipos celulares hepáticos.

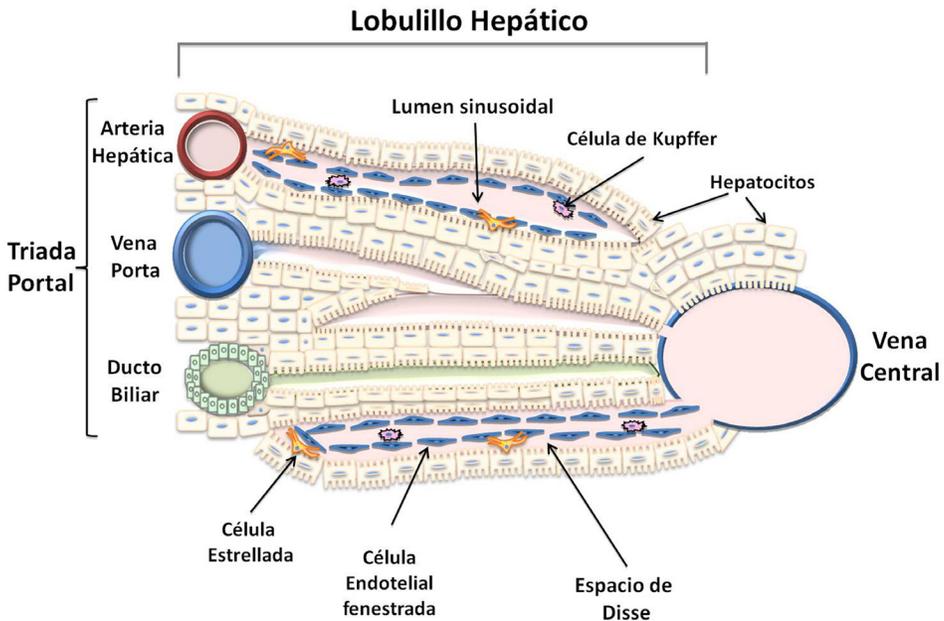


Figura 1. Estructura tridimensional del lobulillo hepático y del sinusoides. Los hepatocitos conforman el componente epitelial del hígado organizados en placas y entre ellos se encuentra el sinusoides, en donde se localizan los otros componentes celulares. El sinusoides está recubierto por células endoteliales fenestradas, el espacio que se establece entre las células endoteliales y los hepatocitos corresponde al espacio de Disse. Las células de Kupffer se encuentran en el lumen sinusoidal, mientras que las células estrelladas tienen una localización perisinusoidal. (Sosa-Garrocho M.).

Las KC son los macrófagos residentes del hígado cuya función es remover bacterias y materiales extraños para la célula, son esenciales en la homeostasis del tejido, además promueven respuestas mediadas por la producción de citocinas y eicosanoides (Cubero y Nieto, 2006). Las HSC representan el sitio de almacenamiento de ésteres de retinol (vitamina A), triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, en forma de gotitas evidentes en su citoplasma; en un hígado sano, almacenan el 80% del total de retinoides en el hígado (Friedman, 2008). Las células estrelladas también secretan prostaglandinas, y diversas citocinas de gran relevancia en el proceso de activación inducido por distintos estímulos, el cual será revisado en el capítulo sobre fibrosis hepática.

La importancia del hígado como modelo experimental es innegable, ya que la mayoría de sus funciones son tejido-específicas, sus células son ampliamente utilizadas para estudios de función metabólica, de transducción de señales, toxicológicos, farmacocinéticos, carcinogénicos y de expresión genética. Las células hepáticas son capaces de retener *in vitro* muchas de las propiedades funcionales del hígado intacto por lo que contar con un procedimiento adecuado para el aislamiento de cada uno de estos tipos celulares, es de suma importancia. A continuación se describen brevemente los procesos de aislamiento de las células hepáticas partiendo de un recuento histórico de los primeros intentos por conseguirlo.

Antecedentes históricos

Los primeros trabajos describen la preparación de una suspensión celular enriquecida con células hepáticas en donde la dispersión del tejido era lograda mecánicamente, al forzar el paso del tejido por una malla o tela (Schneider y Potter, 1943; Kaltenbach, 1954), por agitación con perlas de vidrio (St Aubin y col., 1951), o por homogenización (Palade y Claude, 1949), entre otros. Estos métodos alcanzaban un rendimiento de un 10% y un daño celular evidente. Posteriormente se introdujo la

perfusión, pero aún asociada con homogenización (Anderson, 1953) en presencia de soluciones sin Ca^{2+} , que desde entonces se sabía que participaba en regular la adhesión celular. Ahora se sabe que el estrés por ausencia de Ca^{2+} es responsable del rompimiento de los desmosomas (Amsterdam y Jamieson, 1974). Durante la perfusión se utilizaron también, soluciones con citrato (Anderson, 1953) con bajo pH (Longmuir y Rees, 1956), quelantes de Ca^{2+} como EDTA (Leeson y Kalant, 1961), o soluciones con alta osmolaridad como la sacarosa (Jacob y Bhargava, 1962). Sin embargo, el rendimiento era aún bajo y las células mostraban daños a nivel de membrana plasmática, liberando enzimas citoplasmáticas al medio, así como a otras estructuras internas (Berry y Simpson, 1962). Posteriormente se desarrollaron métodos enzimáticos para disolver la matriz extracelular en combinación con tratamientos mecánicos. El primer aislamiento exitoso de hepatocitos intactos se logró incubando rebanadas de hígado de rata con una mezcla de colagenasa y hialuronidasa para la obtención de un homogenado del tejido (Howard y col., 1967). Cabe mencionar que en este procedimiento el hígado era perfundido vía la vena porta pero fuera del animal. Estos mismos autores (Howard y col., 1973), demostraron posteriormente que el estricto control del pH así como la presencia de Ca^{2+} durante el proceso de digestión, lograban mantener una estructura celular intacta. Sin embargo, hasta entonces el principal problema continuó siendo el rendimiento.

Berry y Friend desarrollaron un método rápido para la digestión del tejido por medio de una perfusión recirculante continua *in situ* (el hígado es canulado directamente dentro del animal, conectado al aparato de perfusión) y un tratamiento enzimático, por perfusión del hígado con colagenasa y hialuronidasa a través de la vena porta, favoreciendo que se alcanzaran los espacios internos del órgano, y en consecuencia, la liberación de un mayor número de células. El rendimiento alcanzó un 60-70% y la viabilidad de las células un 75%, ambos parámetros substancialmente mayores a los métodos anteriores, además se demostró por microscopía electrónica que las células mantenían su integridad estructural (Berry y Friend 1969). Con este

procedimiento las uniones celulares se perdían en su mayoría, lo que permitió la obtención de células individuales. Aunque con algunas limitantes bioquímicas, este procedimiento se convirtió en la base para los protocolos actuales.

La perfusión en dos etapas fue introducida por Seglen en los 70's (Seglen, 1972), en la primera etapa se lava el hígado y se remueve el Ca^{2+} extracelular. En la segunda etapa se restablece el Ca^{2+} y se inicia un tratamiento con colagenasa, logrando reducir el daño de los hepatocitos inducido por incubaciones prolongadas en ausencia de Ca^{2+} (Seglen, 1972). El Ca^{2+} realiza una doble función en el procedimiento, por un lado su remoción preliminar reduce las adherencias celulares eficientemente y por otro lado, actúa como cofactor de la colagenasa (Seglen, 1976). En estas condiciones se estabiliza tanto la función membranal como la morfología de los hepatocitos, alcanzando una viabilidad del 95% (Edmonson y Bang, 1981). Más recientemente, la optimización de las metodologías se ha enfocado en el aislamiento de hepatocitos dependiendo de su localización en relación a la vena porta, que ahora se han denominado hepatocitos periportales y perivenosos, los cuales muestran diferencias bioquímicas, morfológicas y funcionales (Bengtsson y col., 1981; Osypiw y col., 1994); o en el aislamiento de hepatocitos de etapas fetales (Leffert y Paul, 1972). Asimismo se han estandarizado técnicas para el aislamiento de hepatocitos de otras especies como los de ratón, caballo, bovino, mono, cerdo, pez, cobayo y por supuesto de humanos, los cuales son de gran utilidad en los estudios toxicológicos y farmacológicos (Harris y Cornell, 1983; Butterworth y col., 1989).

Aislamiento de hepatocitos de hígado de rata

En la actualidad, para el aislamiento de los distintos tipos celulares hepáticos aún son utilizados métodos basados en el procedimiento descrito por Berry y Friend (1969) y Seglen (1972). El proceso consta de tres etapas: canulación vía vena porta, perfusión del órgano (que permite la eliminación de células sanguíneas), extracción y posterior digestión enzimática del hígado. En la sección de protocolos experimentales de este capítulo se describe con detalle el procedimiento metodológico.

Cultivo de hepatocitos

Uno de los mayores retos del trabajo con cultivos primarios de hepatocitos es que su actividad metabólica y viabilidad disminuye después de 2 a 3h, por ello es importante contar con una preparación más estable y homogénea que preserve *in vitro* la mayoría de funciones específicas del hígado.

A partir de los años 70's se hicieron grandes avances en el desarrollo del cultivo celular de hepatocitos de hígado de rata como modelo experimental (Alwen y Gallhi-Atchard, 1972) desde entonces, se han implementando diferentes condiciones de cultivo para incrementar la viabilidad y mantener a los hepatocitos en una condición fisiológica y morfológica óptima. Tales condiciones incluyen presencia o ausencia de suero (Wanson y col., 1977), la presencia de un soporte de matriz extracelular como la colágena (Rojkind y col., 1980), o suplementos como insulina (Bernaert y col., 1977), hormonas (Tanaka y col., 1978), glicoproteínas, entre otros. Las funciones específicas del hígado se mantienen en los cultivos primarios de hepatocitos por un período breve de 3 a 5 días. Después de 1 a 2 semanas el cultivo exhibe cambios fenotípicos muy rápidamente hacia un estado tipo fetal ("fetalización"), que se ha interpretado como adaptación a un medio ambiente inadecuado (Bissel y Guzelian 1980; Guguen-Guillouzo y Guillouzo,

1983). Con objeto de lograr cultivos de hepatocitos por más tiempo con respuestas metabólicas normales se ha implementado el uso de factores de crecimiento para inducir proliferación, así como para promover diferenciación o dediferenciación (Michalopoulos y Pitot, 1975). Los hepatocitos no pueden ser subcultivados, el principal impedimento para ello es su incapacidad para dividirse en cultivo, aunque bajo algunas condiciones lo pueden hacer (Novicki y col., 1985). En cultivo los hepatocitos muestran una tendencia a asociarse, el contacto célula-célula se alcanza casi de inmediato. A las 24 horas las células parenquimatosas se ensamblan para formar agregados y reconstituyen estructuras similares a los canalículos biliares (Fig. 2) (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 1983). Las células inicialmente redondas, llegan a ser cuboidales y forman una monocapa confluyente que es viable por al menos 7 días pero sin capacidad de división, en esta etapa las células sufren un alargamiento del citoplasma adquiriendo una apariencia más parecida a fibroblastos, empiezan a mostrar un deterioro estructural y eventualmente mueren.

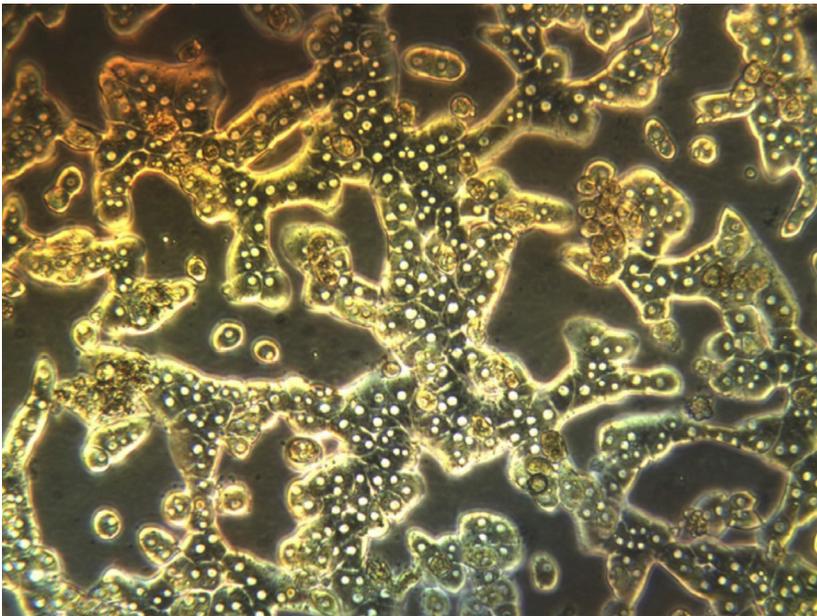


Figura 2. Cultivo primario de hepatocitos de hígado de rata (24 h, 200 X).

Aislamiento de células no parenquimatosas de hígado de rata

Las células no parenquimatosas están representadas principalmente por células endoteliales sinusoidales (SEC), células de Kupffer (KC), células estrelladas hepáticas o células de Ito (HSC). La separación de las diferentes poblaciones de células no parenquimatosas es de suma importancia ya que cada una de ellas presenta morfología y características metabólicas muy definidas. La principal limitante que ha presentado su aislamiento es que cada una de ellas representa solo una pequeña proporción del hígado. Al igual que para el aislamiento de hepatocitos, los métodos enzimáticos demostraron tener una gran eficiencia en el aislamiento de células no parenquimatosas. De gran relevancia ha sido el descubrimiento de que estas últimas son más resistentes que los hepatocitos a enzimas proteolíticas como la pronasa (mezcla de proteasas aisladas de *Streptomyces griseus*) (Mills y Zucker-Franklin, 1969). Algunas características de las células no parenquimatosas se han aprovechado para implementar las técnicas de purificación, una es su diferencia en tamaño y densidad que favorece su separación por centrifugación diferencial en gradientes de densidad y otra, la adherencia selectiva que muestran para algunos sustratos en cultivo.

Para la sedimentación con gradientes de densidad se requiere de fuerzas centrífugas relativamente altas para forzar a las células a agruparse a un nivel de densidad igual dentro del gradiente. Para separar las KC y SEC, se han utilizado también gradientes con Ficoll, Percoll (Smedsrod y col., 1985), Nycodens (Blomhoff y col., 1984; Ramadori y col., 1991). En el caso de las HSC la principal limitante es que representan apenas entre el 8-13% de las células no parenquimatosas, la principal ventaja es su densidad, que por ser menor que la de las KC y SEC, debido a la gran cantidad de vitamina A que acumulan en su citoplasma, permite su separación (Ramadori y col., 1991). A partir de una suspensión celular, se han descrito diferentes métodos de purificación que emplean básicamente gradientes discontinuos de

densidad empleando Percoll (Blomhoff y col., 1990), Stractan (Friedman, 1987), Nycodenz (Geerts y col., 1998; Knook y col., 1982). En algunos de estos protocolos se implementó el uso de la elutriación en contraflujo, con lo que se lograron obtener células SEC viables y puras (Knook y Sleyster, 1976; Samarasinghe 1998; Zahlten y col., 1978).

En el aislamiento de KC y SEC, se puede tomar ventaja de sus diferencias de afinidad por ciertos sustratos. Por ejemplo, las primeras se adhieren en medios libres de suero sobre superficies de vidrio o plástico, en tanto que las SEC se fijan sobre superficies cubiertas de fibronectina o colágena pero no en superficies de vidrio o plástico. Estas diferencias son utilizadas en el método de Percoll descrito por Pertoft y col., (1977) y posteriormente desarrollado por Smedsrod y col., (1985) el cual ofrece una alternativa al sistema de elutriación para el aislamiento de KC y SEC.

Cultivo de células estrelladas hepáticas (HSC), células endoteliales sinusoidales (SEC) y células de Kupffer (KC)

Las células estrelladas se dividen espontáneamente con una alta capacidad proliferativa, las células van perdiendo gradualmente los gránulos de vitamina A y llevan a cabo una transición fenotípica hacia una apariencia más mio-fibroblástica (Fig. 3).

Las células endoteliales sinusoidales y de Kupffer se separan relativamente fácil por adherencia selectiva, dado que una vez resuspendida la suspensión celular con medio de cultivo RPMI, en el lapso de 1 h, se adhieren al plástico las células de Kupffer, posteriormente, las células no adheridas (SEC), se retiran y se siembran sobre cajas preparadas previamente con algún sustrato como colágena de cola de rata o fibronectina (Fig. 4).

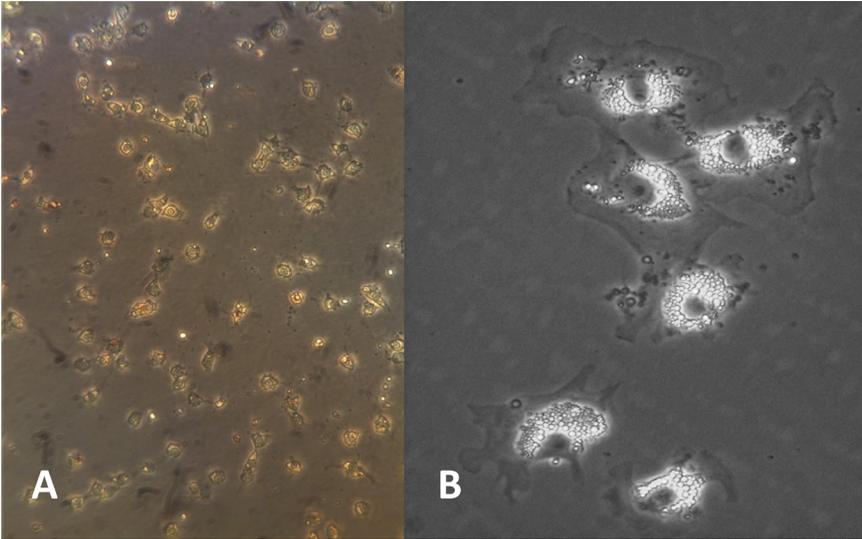


Figura 3. Cultivo primario de células estrelladas hepáticas de rata (24 h) donde se distinguen los gránulos de vitamina A en el citoplasma. **A.** 200X; **B.** 400X.

El método de Percoll utilizado en gradientes discontinuos es muy eficiente y reproducible para la obtención de preparaciones enriquecidas de KC y SEC, la remoción de células contaminantes con lavados suaves posteriores permiten incrementar la pureza de la preparación (Smedsrod y col., 1985). Por medio de este método es posible obtener cultivos de hasta 90% de células HSC y de un 70 a 80% de KC y SEC. La fracción 2 (enriquecida en KC y SEC) recuperada del gradiente de densidad, puede procesarse para separar los dos tipos celulares e incrementar el grado de pureza, mediante métodos como la elutriación y citometría de flujo (Seki y col., 2007). En la sección de protocolos experimentales se describe un método modificado, reproducible para la obtención de células aisladas no parenquimatosas.

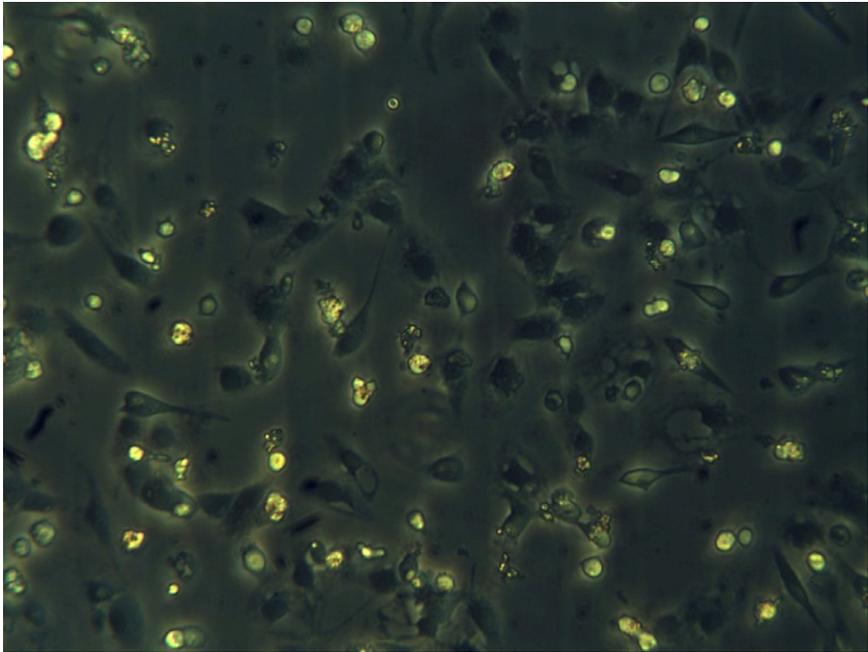


Figura 4. Cultivo primario de células endoteliales sinusoidales de hígado de rata (24 h, 200 X).

Las aplicaciones experimentales que pueden darse a los distintos cultivos de células hepáticas son variadas. Muchos estudios se han enfocado en inducir diferenciación o desdiferenciación y para ello se ajustan o modifican los medios de crecimiento de los cultivos primarios, también se han tratado de identificar subpoblaciones de los distintos tipos celulares, se han inducido funciones específicas de las células con el uso de suplementos de crecimiento y matrices de adherencia. Más recientemente se ha incrementado el interés por sembrar las distintas poblaciones celulares hepáticas en soportes o materiales biocompatibles para generar cultivos en dos y tres dimensiones que mimeticen su medio natural con la finalidad de facilitar los estudios de hepatotoxicidad, metabolismo de drogas, entre otros (Godoy y col., 2013) en vías de generar el conocimiento para la construcción de plataformas funcionales de tejido en 3D con aplicaciones clínicas que en un futuro puedan implementarse para el reemplazo de órganos (Sudo, 2014).

Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Marina Macías Silva por permitirnos compartir los procedimientos experimentales desarrollados en su laboratorio, así como por la lectura crítica de este capítulo. Al C.D. Javier Gallegos por su ayuda en el acopio de bibliografía para este trabajo.

Referencias

- Alwen J, Gallhi-Atchard JJ. (1972). A method of maintaining parenchymal cells from adult rat liver in vitro. *J Cell Sci* **11**:249-260.
- Amsterdam A, Jamieson JD. (1974). Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. *J Cell Biol* **63**:1037-1056.
- Anderson NG. (1953). The mass isolation of whole cells from rat liver. *Science* **117**:627-628.
- Bengtsson BG, Kiessling KH, Smith KA, Morland J. (1981). Partial separation and biochemical characteristics of periportal and perivenous hepatocytes from rat liver. *Eur J Biochem* **118**:591-597.
- Bernaert D, Wanson JC, Drochmans P, Popowski A. (1977). Effect of insulin on ultrastructure and glycogenesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Cell Biol* **74**:878-900.
- Berry MN, Simpson FO. (1962). Fine structure of cells isolated from adult mouse liver. *J Cell Biol* **15**:9-17.
- Berry MN, Friend DS. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **43**:506-520.
- Bissell DM, Guzelian PS. (1980). Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Ann N Y Acad Sci* **349**:85-98.
- Blomhoff R, Smedsrod B, Eskild W. (1984). Preparation of isolated liver endothelial cells and Kupffer cells in high yield by means of an enterotoxin. *Exp Cell Res* **150**:194-204.

- Blomhoff R, Berg T. (1990), Isolation and cultivation of rat liver stellate cells. *Meth Enzymol* **190**:58-71.
- Butterworth BE, Smith-Oliver T, Earle L, Louny DJ, White RD, et al. (1989). Use of primary cultures of human hepatocytes in toxicology studies. *Cancer Res* **49**:1075-1084.
- Cubero FJ, Nieto N. (2006). Kupffer cells and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig.* **98**:460-472.
- Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. (2014). Relevance of the plasma membrane calcium-ATPase in the homeostasis of calcium in the fetal liver. *Organogenesis* **10**:333-339.
- Edmondson JW, Bang NU. (1981). Deleterious effects of calcium deprivation on freshly isolated hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **241**:C3-8.
- Font-Burgada J, Shalapour S, Ramaswamy S, Hsueh B, Rossell D, et al. (2015). Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer. *Cell* **162**:766-779.
- Friedman SL, Rolls FJ. (1987). Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with stractan. *Anal Biochem* **161**:207-218.
- Friedman SL. (2008). Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**:125-172.
- Geerts A, Niki T, Hellemans K, De Craemer D, Van Den Berg K, et al. (1998). Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology* **27**:590-598.
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, et al. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanism of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* **87**:1315-1530.
- Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. (1983). Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* **53-54**:35-56.
- Harris RA, Cornell NW (eds). Isolation, characterization and use of hepatocytes. Elsevier Science Publishing Co., Inc, New York 1983. 624pp.

- Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA. (1967). The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol* **35**:675-684.
- Howard RB, Lee JC, Pesch LA. (1973). The fine structure, potassium content, and respiratory activity of isolated rat liver parenchymal cells prepared by improved enzymatic techniques. *J Cell Biol* **57**:642-658.
- Jacob ST, Bhargava PM. (1962). A new method for the preparation of liver cell suspensions. *Exp Cell Res* **27**:453-467.
- Kaltenbach JP. (1954). The preparation and utilization of whole cell suspensions obtained from solid mammalian tissues. *Exp Cell Res* **7**:568-571.
- Knook DL, Sleyster ECH. (1976). Separation of Kupffer and endothelial cells of the rat liver by centrifugal elutriation. *Exp Cell Res* **99**:444-449.
- Knook DL, Seffelaar AM, De Leeuw AM. (1982). Fat-storing cells of the rat liver. *Exp Cell Res* **139**:468-471.
- Krishna M. (2013) Anatomía microscópica del hígado. *Clinical Liver Disease* **2**(S5):109-112.
- Leeson TS, Kalant H. (1961). Effects of in vivo decalcification on ultrastructure of adult rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* **10**:95-104.
- Leffert HL, Paul D. (1972). Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. *The J Cell Biol* **52**:559-568.
- Longmuir IS, Rees AP. (1956). Preparation of cell suspensions from rat livers. *Nature* **177**:997.
- Michalopoulos G, Pitot HC. (1975). Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Exp Cell Res* **94**:70-78.
- Mills DM, Zucker-Franklin D. (1969). Electron microscopic study of isolated Kupffer Cells. *Am J Pathol* **54**:147-166.
- Novicki DL, Rosenberg MR, Michalopoulos G. (1958). Inhibition of DNA synthesis by chemical carcinogens in cultures of initiated and normal proliferating rat hepatocytes. *Cancer Res* **45**:337-344.
- Osypiw JC, Allen RL, Billington D. (1994). Subpopulations of rat hepatocytes separated by Percoll density-gradient centrifugation show characteristics consistent with different acinar locations.

- Biochem J **304**:617-624.
- Palade GE, Claude A. (1949). The nature of Golgi apparatus; parallelism between intercellular myelin figures and Golgi apparatus in somatic cells. *J Morphol* **85**:35-69.
- Pertoft H, Rubin K, Kjellen L, Laurent TC, Klingeborn B. (1977). The viability of cells grown or centrifuged in a new density gradient medium, percoll (TM). *Exp Cell Res* **110**:449-457.
- Ramadori G, Schwogler S, Veit T, Rieder H, Chiquet-Ehrismann R, et al. (1991). Tenascin gene expression in rat liver and in rat liver cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **60**:145-153.
- Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambone MA, Ponce P, Reid L. (1980). Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol* **87**:255-263.
- Samarasinghe DA. (1998). Culture of sinusoidal endothelial cells from rat liver. *J Gastroenterol Hepatol* **13**:851-854.
- Sattler CA, Michalopoulos G, Sattler GL, Pitot HC. (1978). Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Res* **38**:1539-1549.
- Schmid, R. (1991). Who was Disse? *Hepatology* **14**:1283-1285.
- Schneider WC, Potter VR. (1943). The assay of animal tissues for respiratory enzymes. *J Biol Chem* **149**:217-227.
- Seglen PO. (1972). Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res* **74**:450-454.
- Seglen PO. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Meth Cell Biol* **13**, Chapter 4: 29-83.
- Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, et al. (2007). TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **13**:1324-1332.
- Smedsrod B, Pertoft H, Eggertsen G, Sundström C. (1985). Functional and morphological characterization of cultures of Kupffer cells and liver endothelial cells prepared by means of density separation in Percoll. *Cell Tissue Res* **241**:639-649.
- Stanger, BZ. (2015). Cellular homeostasis and repair in the mammalian

- liver. *Annu Rev Physiol* **77**:179-200.
- St Aubin PM, Bucher NLR. (1952). A study of binucleate cells counts in resting and regenerating rat liver employing a mechanical method for the separation of liver cells. *Anat Rec* **112**:797-809.
- Sudo R. (2014). Multiscale tissue engineering for liver reconstruction. *Organogenesis* **10**:216-224.
- Tanaka K, Sato M, Tomita Y, Ichihara A. (1978). Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *J Biochem* **84**:937-946.
- Tsung A, Geller DA. (2011). Gross and cellular anatomy of the liver. En: *Molecular Pathology of Liver Diseases*. Monga Satdarshan P (ed). Pittsburgh, PA. Springer Science + Business Media, LLC. p. 3-6.
- Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. (2003). Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biol Int* **27**:67-73.
- Wang B, Zhao L, Fish M, Logan CY, Nusse R. (2015). Self renewing diploid Axin²⁺ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature* **524**:180-185.
- Wanson JC, Drochmans P, Mosselmans R, Ronveaux MF. (1977). Adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Cell Biol* **74**:858-877.
- Zahlten RN, Hagler HK, Nejtek ME, Day CJ. (1978). Morphological characterization of Kupffer and endothelial cells of rat liver isolated by counterflow elutriation. *Gastroenterology* **75**:80-87.

Protocolos Experimentales

Protocolo para el aislamiento y cultivo de hepatocitos de hígado de rata

A continuación se describe el procedimiento adaptado y desarrollado en el laboratorio de la Dra. Marina Macías-Silva en el Instituto de Fisiología Celular.

Aislamiento:

I. Preparar material y soluciones referidos en Tablas I y II

- a. Preparar 1L solución de Krebs-Ringer (KR), colocar la solución en el contenedor 1 del aparato de perfusión (Fig. 1), prender baño circulador a 37° C e iniciar el gaseo de carbógeno (mezcla de 95 % O₂/ 5% CO₂). A los 15 min, tomar un poco de la solución y medir el pH, éste debe de mantenerse en un rango de 7.34 a 7.4. Si el pH < 7.3, incrementar la cantidad de NaHCO₃ (6%) y/o disminuir la cantidad de carbógeno; si el pH > 7.4, es necesario incrementar la cantidad de carbógeno.
- b. Preparar 300 ml de una solución de Krebs-Ringer/Ca²⁺ (KR/ Ca²⁺), para ello, retirar 300 ml del contenedor 1 y agregar aproximadamente 800 µl de una solución de CaCl₂ al 7.85% (Tabla I) para tener una concentración de 1.27 mM. Mantener esta solución en un baño a 37°C y mantener con gaseo de carbógeno, colocar aproximadamente 25 ml en el contenedor 2, también con gaseo de carbógeno.

Colocar la cánula en el conector en forma de "Y" que une a los contenedores 1 y 2. Eliminar burbujas en las mangueras que provienen de los mismos.

II. Procedimiento de Anestesia

- Es indispensable que al trabajar con animales experimentales se respeten los códigos de ética vigentes.
- Pesar al animal para determinar la dosis exacta de anestésico.
- Preparar la mezcla de xilacina y ketamina y colocar en una jeringa con aguja de 25-27 G.
- Inyectar al animal por vía intramuscular (en los músculos posteriores del muslo).
- Colocar en una jaula de roedores y monitorear.
- Iniciar procedimiento quirúrgico cuando se verifique que la rata presente ausencia de movimiento y respuesta a estímulos externos.

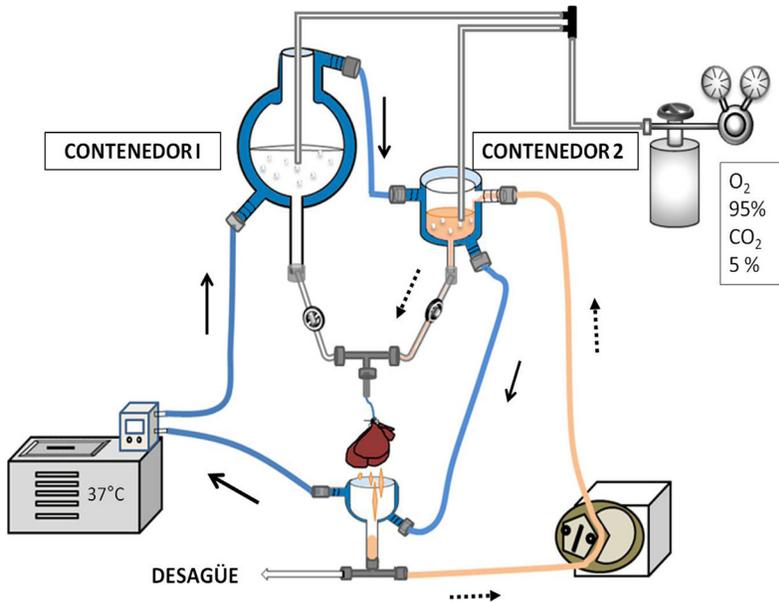


Figura 1. Aparato de perfusión. Consta de un circuito de 3 contenedores de vidrio de doble pared y un baño circulatorio de agua a 37°C. El medio de perfusión (Krebs Ringer) es colocado en el contenedor 1. En el contenedor 2 se coloca solución Krebs Ringer con Ca^{2+} y/o la solución enzimática que circula por gravedad hasta la cánula previamente introducida a la vena porta. La solución perfundida es colectada en el contenedor 3 y puede ser descartada o regresar al contenedor 2 por medio de una bomba peristáltica. Los contenedores 1 y 2 deben estar continuamente gaseados con $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5). El aparato esquematizado en esta figura, fue adaptado y diseñado por el Dr. Jesús Adolfo García Sáinz (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) (Sosa-Garrocho M).

III. Perfusión y digestión del hígado

Las cantidades y tiempos de incubación son los utilizados para una rata de 200-250 g de peso.

1. Para proceder a la canulación del hígado, el abdomen es abierto con una incisión en una línea recta y dos cortes perpendiculares a nivel de los riñones (Fig. 2A).
2. Los intestinos y demás órganos internos son movidos fuera de la cavidad abdominal, dejando libre el acceso a la vena porta y la parte inferior de la vena cava (Fig. 2B).
3. Colocar 2 ligaduras por debajo de la vena porta (VP); una en la parte inferior de la vena (Li, ligadura inferior) con un nudo sencillo y la otra 5 mm antes de la bifurcación hacia los diferentes lóbulos (Ls, Ligadura superior), pero en este caso dejar sin nudo (Fig. 2C).
4. Realizar un pequeño corte sobre la vena, un poco antes de la Ls e introducir la cánula previamente conectada al perfusor, realizar un nudo sujetando la vena y la cánula, apretar y repetir el nudo (Fig. 2C).
5. Iniciar el lavado con la Solución de KR de contenedor 1. Cortar la vena porta en la parte posterior del hígado para hacer más eficiente el lavado.
6. Sujetando la cánula y el amarre que la sujeta (Li), cortar todos los ligamentos que mantienen unido el hígado en la cavidad abdominal.
7. Extraer el hígado y por medio de la cánula colgarlo dentro del contenedor 3 del perfusor (Figs. 1 y 2D).

8. Drenar todo el líquido hacia el desagüe y dejar pasar la solución de KR (contenedor 1) entre 8-10 minutos (aproximadamente entre 75-100 ml), tiempo durante el cual el hígado se lavará de cualquier resto sanguíneo. El hígado cambia de color desde un rojo oscuro hasta un café claro (Fig. 2D), el hígado debe estar uniformemente lavado sin rastros de sangre.
9. Cerrar el flujo del contenedor 1 y abrir el flujo del contenedor 2 (KR/Ca²⁺) y dejar pasar 25-50 ml de la solución por 2-3 minutos (Fig. 1).
10. Adicionar una solución de colagenasa (18 a 20 mg en 25ml, dependiendo de actividad) disuelta en KR/ Ca²⁺ y colocarla en el contenedor 2 (Tabla II).
11. Prender bomba peristáltica en sentido "reverso" y cerrar con una pinza el flujo hacia el desagüe y dejar recirculando la solución de colagenasa entre 20-30 min (Fig. 2).
12. Supervisar la apariencia y consistencia del hígado hasta observar la desintegración del mismo.
13. La perfusión se detiene y el hígado es retirado de la cánula y es colocado sobre una caja petri de plástico con un poco de Solución de KR/Ca²⁺, con ayuda de una punta de plástico, el hígado es disgregado gentilmente para liberar la suspensión celular (hepatocitos y células no parenquimatosas).
14. La suspensión celular es filtrada a través de una malla de nylon de 300-500 μm para remover agregados y fragmentos de tejido.

15. La suspensión celular de aproximadamente 50 ml, es centrifugada a 500 rpm por 2-3 min. Retirar el sobrenadante (enriquecido de células no parenquimatosas, hepatocitos dañados y debris subcelular) y resuspender suavemente por inversión el pellet celular con 50 ml de KR/Ca²⁺ este paso se repite 3 a 4 veces hasta que el sobrenadante quede claro, libre de células no parenquimatosas.

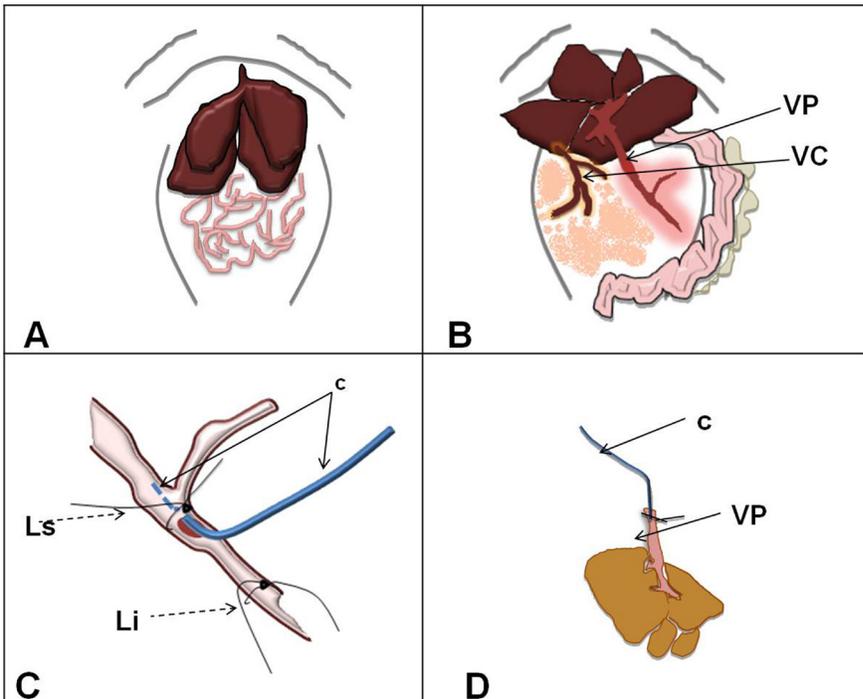


Figura 2. Procedimiento de canulación. **A)** Abrir cavidad a nivel abdominal. **B)** Mover órganos internos para visualizar vena cava (VC) y vena porta (VP). **C)** Detalle de vena porta con ligaduras inferior (Li), inserción de cánula (conectada a perfusor) y ligadura superior (Ls) con nudo para sujetar cánula (c) y vena. **D)** Hígado extraído de cavidad (Sosa-Garrocho M).

Consideraciones relevantes durante el aislamiento de células hepáticas

Los factores que en general son críticos para el aislamiento de las células hepáticas son: la calidad del hígado, el pH, lavado eficiente con amortiguador Krebs Ringer (KR), la concentración de colagenasa y tiempo de incubación, así como la oxigenación durante el proceso. Debido a que el hígado perfundido acidifica el medio de perfusión muy rápidamente, se requiere un sistema de amortiguación efectivo, como el sistema de CO_2 /bicarbonato, que se logra con un gaseo continuo de carbógeno (mezcla de 95% O_2 /5% CO_2) sobre el amortiguador suplementado con bicarbonato (KR). Otra posibilidad es usar un amortiguador suplementado con HEPES que mantiene a la enzima en su rango de actividad óptimo durante todo el procedimiento y en estas condiciones puede omitirse la oxigenación continua.

Las preparaciones de colagenasa varían comercialmente, por lo que es preciso probar concentración y tiempo de incubación entre lote y lote. Cuando la dispersión con colagenasa es insuficiente, los hepatocitos no se logran separar y forman dobletes o pequeños agregados de células que permanecen unidas por uniones estrechas (tight junction) (Sattler y col., 1978).

Los hepatocitos son muy sensibles al daño mecánico por lo que tienen que ser manipulados gentilmente en todas las etapas de su aislamiento. Los hepatocitos frescos en suspensión solo pueden ser utilizados para estudios cortos ya que sus funciones son aceptables solo por algunas horas (menos de 4hr), siendo crítica la incubación de las células, en particular el pH, la oxigenación y la composición del medio (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 1983). Algunos autores han reportado que los hepatocitos muestran algunas funciones desacopladas o muy disminuidas debido al daño membranal generado por la colagenasa (Ichiara y col., 1982). Por ejemplo, no responden adecuadamente a la inducción por hormonas debido a la pérdida de algunos receptores

membranales, lo cual es totalmente reparado cuando las células se cultivan en monocapa por un mínimo de 24 horas.

Con el procedimiento anterior se obtienen 3-5 ml de paquete celular que corresponden a $1-2 \times 10^8$ células aproximadamente. Es recomendable estimar la viabilidad con azul de Tripano al 0.4%, haciendo una preparación de 100 μ l de suspensión celular con un volumen igual (1:1) de azul de Tripano. La muestra es colocada en un hemocitómetro y se observa por microscopía óptica. Los parámetros importantes a considerar en la preparación son: la forma celular, que debe ser redondeada y sin prolongaciones tipo ampollas ("blebs"), el porcentaje de las células con núcleo sin teñir con respecto a células con núcleo teñido o muertas, este valor debe ser mayor al 75%. El número de células no parenquimatosas (células $< 10\mu$ m) con respecto a los hepatocitos (15-25 μ m) no debe pasar del 5%. Hay otros procedimientos para estimar la viabilidad de los hepatocitos como es la validación de su capacidad metabólica, midiendo la actividad de enzimas citosólicas, contenido de ATP o consumo de oxígeno.

Cultivo de Hepatocitos

Preparar material y soluciones referidas en Tabla III

El siguiente procedimiento se realiza en condiciones estériles, en campana de flujo laminar con nivel de seguridad tipo I.

Preparación de cajas Petri con colágena de cola de rata. En condiciones estériles, cubrir las cajas con 2 ml de la solución de colágena (1 mg/ml), recuperar y guardar el exceso de líquido para su reutilización. Esterilizar las cajas en la campana de flujo laminar por 30 min bajo luz UV, finalmente almacenar a 4°C en bolsa de polietileno cerrada.

1. El pellet enriquecido en células parenquimatosas es resuspendido en 40 ml de Solución de PBS suplementado con antibióticos.
2. Centrifugar a 500 rpm por 2min y aspirar para retirar sobrenadante.
3. Resuspender pellet en 25 ml de PBS y adicionar 25 ml de la solución de Percoll (Tabla III), invertir el tubo varias veces hasta que la suspensión sea homogénea.
4. Centrifugar a 800 rpm por 5 min.
5. Aspirar y descartar la capa superior (células no parenquimatosas, células muertas y residuos celulares) hasta retirar completamente el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet en 10-20 ml de Medio de Attachment (Tabla III) y mantener en condiciones estériles.
7. Contar las células. Tomar 80-100 μ l de la suspensión celular y un volumen igual de Azul de Tripano, mezclar y tomar una alícuota para llenar ambas cámaras del hemocitómetro. Esperar 3-5 min. y contar las células vivas. Usualmente la viabilidad después de la etapa de Percoll se incrementa hasta un 90-95%.
8. Calcular la dilución apropiada para el plaqueo en medio de "Attachment" usando las cajas previamente cubiertas con colágena.
9. Colocar las cajas en una incubadora a 37°C y en una atmósfera de CO₂ (5%). Dejar al menos 2h.

10. Cuando las células ya se han pegado (2h aproximadamente), reemplazar el medio de Attachment por medio de "Feeding" (Ver Tabla III) y regresar a incubadora.

Una preparación de hepatocitos en cultivo a las 24 horas puede observarse en la Fig. 2 de este Capítulo.

Procedimiento para el aislamiento y cultivo de células no parenquimatosas de hígado de rata

Aquí describimos un método modificado utilizando un gradiente discontinuo de centrifugación de Nycodenz basado en reportes previos (Friedman y Rolls, 1987; Knook y col., 1982; Weiskirchen y Gressner, 2005) que es reproducible y eficiente para el fraccionamiento de células no parenquimatosas (Fig. 3). El procedimiento involucra un bajo costo y se obtiene una pureza superior al 80% de los diferentes tipos celulares, se evita el uso de la centrifugación por elutriación, cuyo procedimiento es largo y requiere de un equipo costoso.

Para materiales, reactivos y equipo ver Tablas I y IV.

I. Preparar aparato de perfusión (Fig. 1)

Preparar 1L de Solución L15 y colocar 700 ml aproximadamente en el contenedor 1. A los 300 ml restantes de la solución de perfusión, colocarle solución de CaCl_2 (aproximadamente 800 μl) para tener una concentración final de 1.27 mM y mantener en un baño a 37°C, colocar un poco de esta solución (aproximadamente 25 ml) en el contenedor 2.

Colocar la cánula en la "Y" que une los contenedores 1 y 2. Purgar para eliminar burbujas en las mangueras provenientes de los mismos. Prender baño circulador.

II. Procedimiento de anestesia y perfusión

1. Anestesiarse una rata de 500 g de aproximadamente 6 meses de edad de acuerdo al procedimiento previamente descrito y continuar con pasos 1 a 5 (ver sección de aislamiento de hepatocitos).
2. El hígado es perfundido con solución L15 1X por 15 min. Cerrar manguera contenedor 1 y abrir manguera contenedor 2.
3. Continuar perfundiendo con solución L15 1X con Ca^{2+} (L15/ Ca^{2+}) por 10 min.
4. Colocar la mezcla de Pronasa al 0.225% en Solución L15/ Ca^{2+} en contenedor 2. Prender bomba peristáltica en sentido "reverso" y cerrar con una pinza el flujo hacia el desagüe y dejar recirculando la solución por 10 min.
5. Apagar bomba peristáltica, abrir la pinza del desagüe y drenar el contenedor 2 hasta un 80%, no totalmente, para evitar que ingresen burbujas al sistema.
6. Colocar la mezcla de colagenasa al 0.066% en Solución L15/ Ca^{2+} en contenedor 2, prender bomba peristáltica y cerrar con pinza el flujo hacia el desagüe. Digerir por 20-25 min.
7. El hígado es removido en una caja Petri sobre una Solución de L15/ Ca^{2+} suplementado con DNAsa a una concentración final de 0.008% y es triturado para formar una suspensión celular.
8. Filtrar la suspensión a través de una malla de nylon, presionando con una pipeta de plástico.

9. La suspensión celular es centrifugada a 700 rpm, 2 min a temperatura ambiente para remover los hepatocitos, eritrocitos y restos celulares que quedan en la pastilla. Las células no parenquimatosas se recuperan del sobrenadante.
10. La pastilla de células parenquimatosas y restos celulares son resuspendidos nuevamente en solución L151X/Ca²⁺/DNAsa y centrifugar nuevamente a 700 rpm/2 min) a temperatura ambiente.
11. Los sobrenadantes del paso 9 y 10 que contiene las células no parenquimatosas son centrifugados a 2500 rpm x 10 min a 10°C.
12. Se prepara el gradiente de Nicodenz a partir de un stock al 28.7%, diluyendo con GBSS(+NaCl) en dos diferentes concentraciones: 15.6% y 8.2% , se mantienen a 4°C.

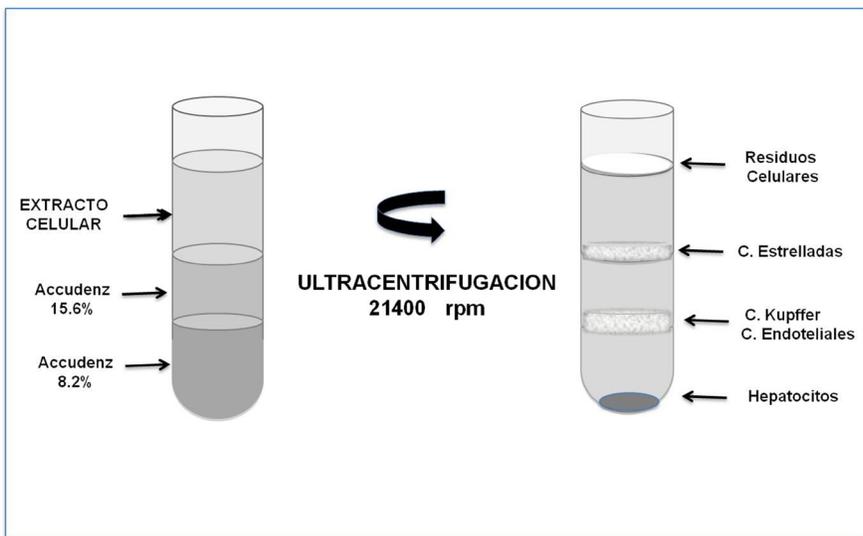


Figura 3. Preparación de gradiente y separación de poblaciones celulares hepáticas.

13. Se colocan en forma ascendente (Fig. 3) en tubos de ultracentrífuga (14 x 95 mm de polialómero) para el rotor SW40.
14. Los sobrenadantes del paso 11 son descartados, se recupera la capa blanquecina que se forma en la parte superior del pellet de eritrocitos y hepatocitos, enjuagando suavemente con 1-2 ml de GBSS(+NaCl) teniendo cuidado de no resuspender el pellet de hepatocitos para recuperar el remanente de la capa blanquecina de células no parenquimatosas.
15. Se junta la suspensión celular anterior en un solo tubo y se coloca en la parte superior de los tubos preparados previamente con los gradientes (Fig. 3).
16. Se equilibran apropiadamente los tubos y se colocan en el rotor SW40 para ser centrifugados a 21,400 rpm 45 min a 22°C.
17. Posterior a la centrifugación se observan 2 bandas principales, una inferior a la altura del gradiente de 15.6% compuesta de KC y SEC y una superior enriquecida en HSC (Fig. 3). En condiciones estériles en una campana de flujo laminar, se recuperan las 2 capas de manera independiente y se resuspenden en PBS estéril suplementado con antibióticos en un tubo de 50 ml estéril. Los tubos son centrifugados a 2500 rpm a temperatura ambiente.
18. Los sobrenadantes son aspirados y desechados y los pellets celulares resuspendidos y sembrados en cajas de 100 mm en las condiciones de cultivo apropiadas para cada tipo celular (ver sección de cultivo de HSC, KC y SEC, más adelante).
19. Las células se incuban a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ por 2h, las placas se lavan con medio fresco para remover células no adherentes.

Cultivo de células endoteliales sinusoidales (SEC) y células de Kupffer (KC)

Medio de Crecimiento KC: RPMI sin suero fetal bovino.

Medio de Crecimiento SEC: RPMI + Glutamina + 10% de suero fetal bovino.

1. Una vez lavadas las células con solución de PBS suplementada con antibióticos (punto 17), resuspender las células con medio de cultivo RPMI (en ausencia de suero), dejar por 1 h, tiempo en el cual se adhieren al plástico las células de Kupffer.
2. Las células no adheridas (SEC), se retiran y se siembran sobre cajas preparadas previamente con algún sustrato como colágena de cola de rata o fibronectina y se cambia el medio después de 20 h.

Una preparación de células endoteliales en cultivo a las 24 horas puede observarse en la Figura 4 de la sección teórica de este capítulo.

Cultivo de células estrelladas (HSC)

Medio de Crecimiento HSC: DMEM + 10% FBS

Una vez lavadas las células con solución de PBS suplementada con antibióticos (punto 17), resuspender las células con medio de cultivo y sembrar sobre cajas de plástico. Esperar 2hr a que las células se adhieran y cambiar el medio por medio fresco. Una preparación de células estrelladas en cultivo a las 24 horas puede observarse en la Figura 3 de la sección teórica de este capítulo.

TABLA I

MATERIAL Y EQUIPO REQUERIDO PARA EL AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS Y CÉLULAS NO PARENQUIMATOSAS

MATERIALES

- Rata macho adulta Wistar de 200-250g
- *Rata macho adulta Wistar de 500g
- Material de cirugía
- Jeringa con aguja 25G x 5/8"
- Cánula de polietileno (PE205), diámetro interno de 1.57 mm y diámetro externo de 2.08 mm
- Malla de nylon con poro de 300-500 μm
- *Malla de nylon con poro de 1mm
- Caja Petri (de poliestireno) para cultivo celular
- Tubos de centrifuga de 50 ml
- *Material para aislar células no parenquimatosas

EQUIPO

- Perfusor conectado a baño de agua ajustado a 37°C
- Bomba peristáltica ajustada con una velocidad de flujo de 20-40ml/min.
- Centrifuga convencional con rotor basculante de 90°
- Sistema de oxigenación para burbujear carbógeno (O₂ 95%/CO₂ 5%)

TABLA II

SOLUCIONES REQUERIDAS PARA EL AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS*

Anestesia: Xilacina/Ketamina	40-80 /5-10 mg/Kg de peso
NaHCO ₃ mantener a 4°C	Solución al 6%
CaCl ₂ guardar a 4°C	Solución al 7.85%
Solución de Krebs-Ringer (KR) Preparar fresca	NaCl 120mM, MgSO ₄ 1.2mM, KCl 4.75 mM, KH ₂ PO ₄ 1.2 mM, NaHCO ₃ 24mM aprox. (13 a 18 ml de Sol. al 6%, para ajustar el pH a 7.34-7.4)
Solución de Krebs-Ringer/ Calcio (KR/Ca ²⁺) Preparar fresca	Solución de KR (300ml) + CaCl ₂ concentración final 1.27 mM (800µl de Sol. al 7.85%)
Colagenasa tipo II ó IV. Preparar fresca	0.05- 0.08 %, según actividad, en sol. de KR/Ca ²⁺
Azul de Tripano. Guardar a temperatura ambiente	Solución al 0.4% en KR/Ca ²⁺

* En todos los casos usar reactivos grado cultivo celular.

TABLA III**SOLUCIONES REQUERIDAS PARA EL CULTIVO DE HEPATOCITOS**

HBSS estéril Almacenar a 4°C	Hanks Balanced Salt Solution sin Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /Rojo Fenol
HEPES Estéril Almacenar a 4°C	1M
Solución de Percoll Preparar en condiciones estériles Almacenar a 4°C	Percoll180 ml HBSS.....18 ml HEPES.....2 ml
Colágena Tipo 1 (cola de rata) Preparar en condiciones estériles Almacenar a 4°C	1 mg/ml en Acido acético 0.02M
Antibióticos: Penicilina /Estreptomicina 100X Gentamicina Fungizona	100 U/ml 100 U/ml 0.25µg/ml
Colagenasa Tipo II ó IV	12-20 mg según actividad en 50 ml
Solución de PBS Esterilizar por filtración Almacenar a 4°C	Dulbecco`s phosphate buffered Saline Sin Cloruro de Calcio Sin Cloruro de Magnesio

TABLA III
SOLUCIONES REQUERIDAS PARA EL CULTIVO DE HEPATOCITOS

Medio "Attachment"	
Esterilizar por filtración	DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)..... 1 L
Complementar con antibióticos	BSA (Bovine Serum Albumin)..... 200 mg
Almacenar a 4°C	HEPES 1M..... 3 ml
	Piruvato de sodio 100mM..... 10 ml
	NaH ₂ CO ₃ 510 mg
	Galactosa..... 1 mg/ml
	Prolina..... 30 µg/ml
	ITS 100X (Insulin-transferrin-sodium-selenite)..... 10 ml
	Glutamina 200 mM..... 20 ml
	FBS (Fetal Bovine Serum)..... 10%
Medio "Feeding"	Igual que Medio Attachment
Esterilizar por filtración	Sin suero fetal bovino
Complementar con antibióticos	
Almacenar a 4°C	

TABLA IV
SOLUCIONES PARA EL AISLAMIENTO
DE CÉLULAS NO PARENQUIMATOSAS

<p>L15 10X</p> <p>Esterilizar en autoclave Mantener a temperatura ambiente</p>	<p>NaCl..... 80.0 g Na₂HPO₄..... 1.9 g KCl..... 4.0 g KH₂PO₄..... 0.6 g</p> <p>1L H₂O dd Ajustar pH 6.7</p>
<p>L15 1X</p> <p>Preparar fresco</p>	<p>L15 10X..... 100 ml HEPES 2.38 g H₂O dd para 1L..... Ajustar pH a 7.4</p>
<p>GBSS (-NaCl) 10X</p> <p>Esterilizar en autoclave Guardar a 4°C</p>	<p>KCl..... 3.7g NaHCO₃..... 2.27 g KH₂PO₄..... 0.3g Na₂HPO₄..... 1.2 g D-Glucosa..... 10.0 g 1L H₂O dd, pH 7.4</p>
<p>GBSS (+NaCl) 10X</p> <p>Esterilizar en autoclave Guardar a 4°C</p>	<p>GBSS (-NaCl) NaCl..... 80.0 g 1L H₂O dd, pH 7.4</p>
<p>CaCl₂ 10X</p> <p>Esterilizar en autoclave Guardar a 4°C</p>	<p>CaCl₂ (anhidro)..... 1.7 g 1L H₂O dd</p>
<p>MgCl₂ 10X</p> <p>Esterilizar en autoclave Guardar a 4°C</p>	<p>MgCl₂ (anhidro)..... 0.98 g MgSO₄ (anhidro)..... 0.34 g MgSO₄ · 7H₂O..... 0.70 g 1L H₂O dd</p>

TABLA IV SOLUCIONES PARA EL AISLAMIENTO DE CÉLULAS NO PARENQUIMATOSAS

GBSS(+NaCl/-NaCl) 1X	GBSS 10X (+) o (-) NaCl..... 10 ml CaCl ₂ 10X..... 10 ml MgCl ₂ 10X..... 10 ml H ₂ O dd..... 70 ml
Colagenasa tipo II ó IV	0.066%
Pronasa (Proteasa de <i>Streptomyces griseus</i>)	0.225% en L15 1X con CaCl ₂
DNAsa I grado II (de páncreas de bovino)	10 mg/ml en H ₂ O dd
Accudenz A.G. (Accurate chemical)	Solución stock 28.7% (w/v) en GBSS (-NaCl) 1X Diluir a 15.6% y 8.2% con GBSS (+NaCl) 1X
Medio RPMI 1640 DMEM Glutamina Suero fetal bovino	Esterilizar por filtración y complementar con antibióticos y suero fetal bovino

Referencias

- Friedman SL, Rolls FJ. (1987). Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with stractan. *Anal Biochem* **161**:207-218.
- Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. (1983). Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* **53-54** (1-2):35-56.
- Ichihara A, Nakamura T, Tanaka K. (1982). Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Mol Cell Biochem* **43**:145-160.
- Knook DL, Seffelaar AM, De Leeuw AM. (1982). Fat-storing cells of the rat liver. *Exp Cell Res* **139**:468-471.
- Weiskirchen R, Gressner AM. (2005). Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med* **117**:99-113.

CAPÍTULO 02

Fibrosis hepática y carcinoma hepatocelular

Blanca Alicia Delgado Coello
Marcela Sosa Garrocho



La activación celular y su relación con la génesis de la fibrosis hepática

El hígado es un órgano de extrema complejidad no solo por su estructura, sino por las numerosas funciones que realiza. La matriz extracelular (ME) es una complicada red de proteínas (colágena, fibronectina y laminina) y azúcares (proteoglicanos) que proporciona soporte para el órgano al tiempo que regula eventos de adhesión, migración, diferenciación, proliferación y supervivencia. Es por ello que cambios drásticos en esta matriz, alteran la homeostasis y la fisiología normal del tejido hepático.

En términos generales la fibrosis se caracteriza por la acumulación exagerada y desorganizada de ME, especialmente colágena, que eventualmente sustituye al parénquima hepático y se convierte en tejido fibrótico cicatrizal. Se calcula que en estados avanzados de la fibrosis la ME aumenta seis veces su contenido de proteínas respecto al contenido normal (Bataller y Brenner, 2005). La fibrosis es un evento de “reparación de herida” (wound healing) que ocurre en respuesta a estímulos sostenidos de distintos tipos y concomitante a un proceso inflamatorio permanente. En presencia de daño agudo se produce una reacción inflamatoria, una necrosis hepática auto-limitada y la síntesis de ME necesaria solo para reconstituir el tejido, por lo que si el estímulo es retirado, el proceso aún puede ser reversible. Si la necrosis hepática es crónica, tiene lugar la fibrosis que en etapas avanzadas forma conexiones entre varios espacios portales llamados puentes o septos fibrosos, que es una etapa previa a la formación de nódulos de regeneración y de alteraciones severas de la vascularización y al establecimiento propiamente de la cirrosis hepática que difícilmente puede ser revertida y eventualmente desencadena una falla hepática (Domínguez y col., 2009) (Fig. 1). Gran parte del interés médico en la fibrosis radica en que un porcentaje elevado (~ 90%) de los hepatocarcinomas surgen en pacientes con hígados cirróticos, siendo éste el principal factor de riesgo.

A nivel celular el tejido hepático se caracteriza por ser quiescente, sin embargo, cuando el hígado es expuesto a ciertos estímulos, las células que lo forman sufren cambios relevantes en su fenotipo o activación celular y pueden replicarse. Por ejemplo, los hepatocitos al activarse pierden sus microvellosidades y las células endoteliales sinusoidales (SEC, por sus siglas en inglés, *sinusoidal endothelial cells*) pierden sus fenestraciones, los cambios observados en las HSC se describen a detalle a continuación. Es importante destacar que cuando el proceso de activación se mantiene de manera crónica y se perpetúa, promueve la fibrosis hepática.

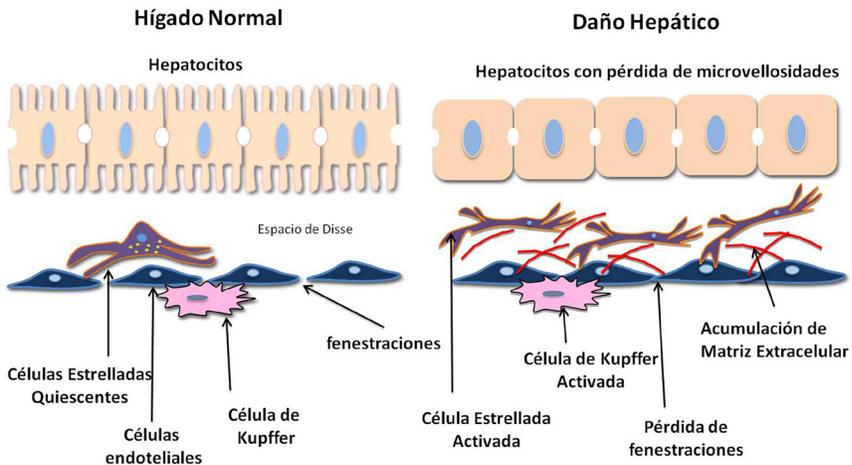


Figura 1. Vista comparativa del sinusoide hepático en el hígado normal y en condiciones de daño. Se observan los cambios en los distintos tipos celulares de un sinusoide hepático después de su activación que desencadena un proceso fibrótico (Sosa-Garrocho M).

La producción de ME obedece principalmente a la activación de las células estrelladas hepáticas (HSC, por sus siglas en inglés, *hepatic stellate cells*), que responden de forma parácrina a señales provenientes de otros tipos celulares. En su estado quiescente las HSC muestran

una forma típicamente estrellada, son el principal reservorio de ácido retinoico (vitamina A) visible en forma de gotas en su citoplasma, expresan desmina, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), y producen básicamente colágena de tipo IV. Una vez que se dispara la activación, las células se trans-diferencian mostrando un fenotipo más parecido a un miofibroblasto, se depletan de vitamina A, muestran actividad pro-inflamatoria y una actividad contráctil (por lo tanto pueden migrar al sitio donde se origina la lesión). También disminuye la expresión de marcadores neurales y sobregulan los marcadores mesenquimales como colágenas tipo I, III y IV, actina de músculo liso α (α -smooth muscle actin, α -SMA), fibronectina, inhibidores de metaloproteasas (TIMP-1 y TIMP-2) y son capaces de proliferar. Investigaciones recientes señalan el papel regulador que la autofagia parece desempeñar en la fibrosis hepática (Mallat y col., 2014). La autofagia en general es responsable de la degradación de componentes celulares en el lisosoma, y en el caso del hígado, este proceso interviene de manera importante en su homeostasis. Existe evidencia que señala que la autofagia podría regular la activación de HSC al digerir sus gotas de retinol como parece evidenciar la abundancia de vacuolas autofágicas. Sin embargo, otros experimentos donde se inhibe farmacológicamente la autofagia o por interferencia de genes que la regulan, demuestran que las gotas de retinol desaparecen.

La activación se lleva a cabo en tres etapas principales: la etapa de iniciación o pro-inflamatoria, la fase de perpetuación y la fase de resolución (Kocabayaglou y Friedman, 2013). La iniciación ocurre en respuesta a señales provenientes de células endoteliales, plaquetas y hepatocitos. En particular, los hepatocitos sufren apoptosis y/o necro-apoptosis, el estrés oxidativo produce radicales en la célula que estimulan a su vez la activación de las HSC. Esta etapa se caracteriza por cambios en la composición de la ME y la producción de niveles bajos de oxígeno que promueven la expresión de pro-colágena tipo I. Alternativamente, la iniciación puede darse por apoptosis en hepatocitos que origina respuestas profibrogénicas evidentes por el aumento de los mensajeros codificantes de α -SMA, TGF- β 1 y colágena α -1. Se ha identificado la

sobre-expresión de α -SMA y la sub-expresión de PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors), como marcadores de la activación de las HSC (Ramadori y col., 1990; Miyahara y col., 2000). Las células de Kupffer también intervienen en la etapa de iniciación al activarse englobando cuerpos apoptóticos de los hepatocitos y produciendo citocinas pro-inflamatorias como son TGF- β y TNF- α , además de especies reactivas de oxígeno que promueven la activación de las HSC.

Durante la etapa de perpetuación, se establecen los cambios del fenotipo de las HSC ya descritos y la ME normal forma tejido cicatrizal y el hígado se torna fibrótico. La etapa de resolución como su nombre lo indica, resuelve el destino final del tejido hepático, ya sea hacia el retorno a un estado quiescente por eliminación de la causa de la enfermedad o estímulo (en modelos experimentales), o hacia la apoptosis de las HSC activadas (Kocabayaglou y Friedman, 2013). El balance entre las HSC quiescentes y las activadas permite al tejido hepático una respuesta de cicatrización adecuada. El desequilibrio dado por la predominancia de HSC activadas, sin importar la causa, también es evidente en la forma de un desbalance entre las enzimas que degradan la ME (metaloproteasas: colagenasas, gelatinasas, estromalinas y matrilisinas) y las que inhiben a éstas llamados inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPS, tissue inhibitors of metalloproteinases). Aquí, el predominio de estas últimas permite la acumulación de sus componentes en el tejido hepático (Fig. 2). Actualmente no se conocen a profundidad las funciones en condiciones normales y en enfermedad tanto de las MMP como de las TIMPS, lo cual es imperativo para el diseño de posibles terapias (Duarte y col., 2015).

La complejidad de la fibrosis hepática aumenta si se considera que además de las HSC, hay otras células que contribuyen con la producción de componentes de ME como son fibroblastos endógenos y fibroblastos portales o señales extra-hepáticas pro-fibrogénicas provenientes del intestino, músculo, tejido adiposo y de alteraciones vasculares sistémicas (Lee y col., 2015).

Causas principales de la fibrosis hepática y modelos experimentales para su estudio

La fibrosis hepática puede producirse por la inflamación crónica en respuesta a estímulos que pueden ser de origen congénito o hereditario. Entre estos últimos se incluyen distintos trastornos como son la galactosemia, la tirosinemia y la enfermedad de Wilson, entre otras.

Entre las infecciones virales que desencadenan fibrosis, cirrosis y frecuentemente cáncer, destacan las hepatitis de tipo B y C. Algunas enfermedades autoinmunes como las cirrosis biliar primaria y la cirrosis biliar primaria esclerosante provocan lesiones de los ductos biliares que degeneran en fibrosis y daño hepático crónico.

Asimismo, el consumo de distintos hepatotóxicos que pueden ser fármacos, toxinas, drogas o alcohol provocan a largo plazo daños irreversibles al hígado. Entre las causas más comunes de la fibrosis/cirrosis hepática se encuentra la provocada por el consumo de alcohol que rebasa las capacidades del hígado para metabolizarlo, mediante la alcohol deshidrogenasa. También es frecuente la enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD-, por non alcoholic fatty liver disease) que progresa eventualmente, dada la acumulación de grasa y la presencia de inflamación crónica, en esteato-hepatitis no alcohólica (o NASH, non alcoholic steatohepatitis). Entre los factores de riesgo se asocian la obesidad, diabetes y la hipercolesterolemia.

Si bien las patologías conocidas en el humano no son idénticas en otras especies, ni existen modelos que lo reproduzcan de manera exacta, los modelos de fibrosis hepática en animales permiten estudiar aspectos puntuales. Los modelos conocidos usan principalmente especies murinas que a pesar de las limitantes, han permitido estudiar la evolución de la activación de las HSC y modelos fisiológicos de fibrosis, cirrosis y hepatocarcinomas (Tabla 1). Se recomienda una excelente revisión de estos modelos y consideraciones éticas relevantes publicada

por Liedtke y colaboradores (Liedtke y col., 2013). En este capítulo describimos brevemente los modelos disponibles hoy en día, con énfasis en aquellos en que las autoras tenemos experiencia.

Entre los modelos quirúrgicos para inducir colestasis obstructiva se practica la ligadura del ducto biliar total que requiere de un período de 21-28 días para mostrar síntomas de fibrosis, o la ligadura parcial también es factible.

Los ratones transgénicos y knockout (KO) que se usan para el estudio de colestasis y fibrosis autoinmunes se diseñan modificando específicamente genes que regulan diversas funciones hepáticas (revisado por Liedtke y col., 2013).

Otros modelos para inducir fibrosis hepática requieren de la administración intraperitoneal (i.p.) u oral de compuestos como la tioacetamida (TAA) en dosis de 150-200 mg/kg de peso. Al término de 6 semanas la TAA produce necrosis centrolobular, pero no se conoce aún su mecanismo de acción. Otros modelos utilizan dimetilnitrosamina (DMN) que administrada por vía i.p. (10mg/kg de peso 2 veces/semana) produce fibrosis en 4 semanas, o dietilnitrosamina (DEN, 0.05g/ kg de peso por semana) que en 12 semanas induce cirrosis y en 16 semanas desarrolla cáncer. Ambos compuestos actúan de manera similar al bioactivarse mediante el citocromo P450 y alquilación del ADN generando aductos de ADN.

INFECCIÓN POR VIRUS / ALCOHOL / NAFLD / DROGAS

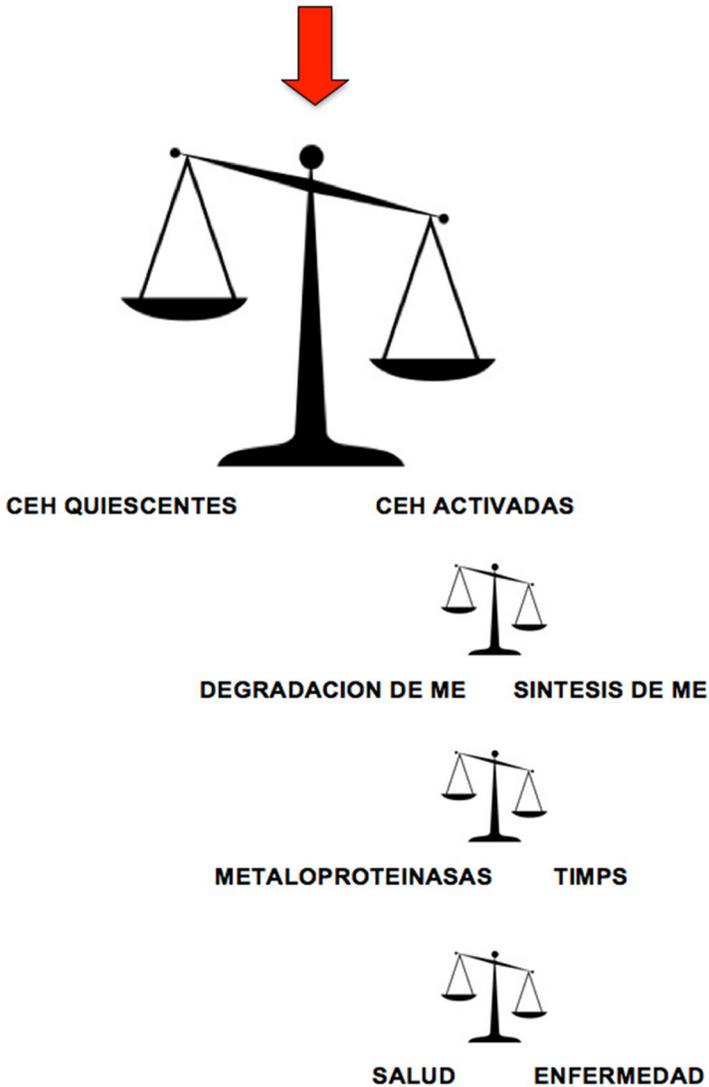


Figura 2. El proceso de activación celular de las células estrelladas hepáticas a consecuencia de distintos estímulos, desencadena desequilibrios en serie que permiten la acumulación excesiva de matriz extracelular que en casos crónicos degenera en cirrosis hepática.

TABLA 1
MODELOS EXPERIMENTALES DESARROLLADOS PARA EL
ESTUDIO DE DISTINTAS PATOLOGÍAS QUE INVOLUCRAN
PROCESOS FIBRÓTICOS HEPÁTICOS

MODELOS	PATOLOGÍA INDUCIDA
Ligadura del ducto biliar	Colestasis obstructiva
Ratones transgénicos y KO	Colestasis
Inmunización de animales	Lesión de ductos biliares
Modelos con hepatotóxicos (CCI4, TAA y DMN)	Inflamación y fibrogénesis
Modelos con dietas altas en grasas, dieta deficiente en colina y modelos genéticamente obesos (ob/ob)	NASH
Modelos con alto consumo de alcohol	Enfermedad hepática inducida por alcohol
Modelos con dieta deficiente en metionina y colina	Esteatosis e inflamación

Un trabajo aborda el modelo con DEN administrado de manera aguda usando una dosis única mayor (200 mg/kg de peso) y analizando a los animales después de 6-24 h (Aparicio-Bautista y col., 2013). Mediante este modelo se pudo demostrar que el DEN promueve estrés oxidativo y necrosis desde las 6 h posteriores a la administración lo que podría influir sobre eventos importantes en el inicio de la hepato-carcinogénesis.

El modelo de intoxicación con CCl_4 en roedores es de los más populares por ser el que más se aproxima por su evolución morfológica y pato-fisiológica, a la cirrosis que experimentan los seres humanos. El modelo estándar incluye un esquema de dosificación (0.4g/kg de peso) de 3 veces/semana por un período de 10 semanas. Una modificación del modelo, requiere de la ingesta de fenobarbital (0.5g/L) por 2 semanas, seguido de la ingesta prolongada de CCl_4 (0.2ml/kg) 2 veces por semana, por 14 semanas o hasta por 26-28 semanas (más cuatro semanas para desintoxicación en ambos casos) para producir una cirrosis compensada y descompensada (irreversible), respectivamente (Nishikawa y col., 2015). En la cirrosis descompensada existe encefalopatía hepática y producción de líquido de ascitis. A nivel de factores de transcripción, se ha definido que HNF1 α , HNF4 α , FOXA2, C/EBP α y PPAR α se encuentran sub-regulados. En el trabajo reportado por Nishikawa y col., se demostró que la "re-expresión" forzada de HNF4 α (el factor más sub-expresado) mediante adenovirus, permite detectar niveles mayores de los transcritos de HNF1 α , C/EBP α y PPAR α a las 48 h. Además los hepatocitos reprogramados son capaces de revertir la falla hepática sin que exista regeneración dependiente de células madre o nuevos hepatocitos.

Otros modelos son aquellos en que se induce daño al metabolismo hepático y el establecimiento del hígado graso que incluye la administración de dietas altas en grasas o el uso de ratones modificados genéticamente. Las esteatosis hepáticas son resultado de lo que se conoce como síndrome metabólico que se caracteriza por la presencia de obesidad central (tipo manzana), resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa y dislipidemia. Las dietas ricas en calorías inducen estrés metabólico e inflamación en células de grasa blanca que

liberan a la circulación gran cantidad de ácidos grasos de cadena larga, al tiempo que la producción de citocinas pro-inflamatorias promueven la resistencia a insulina. Es muy importante destacar que la obesidad y los trastornos asociados tienen sus efectos no sólo en las personas que los padecen sino directamente en su descendencia, por lo que el análisis de estos patrones podría ser en sí mismo un modelo de estudio con alcances tanto retro como prospectivos. En esta influencia trans-generacional participan factores genéticos y epigenéticos -ambos heredables- que ya han sido observados en humanos, ratas, cerdos y otras especies (revisado por Waterland, 2014). Recientemente se ha descrito un modelo en la mosca *Drosophila melanogaster* con interesantes paralelismos con lo observado en humanos (Öst y col., 2014).

En la actualidad persisten dificultades metodológicas para estimar el grado de fibrosis en los pacientes. Dichos métodos pueden ser no invasivos como el uso de ultrasonido o elastografías por resonancia magnética; o invasivos y con mayor riesgo como son las biopsias. Un enfoque reciente busca que el conocimiento básico de la enfermedad se traduzca en tratamientos para los pacientes y se basa en modelos computacionales desarrollados por grupos multidisciplinarios. El resultado de este enfoque es el modelo de fibrosis hepática basado en agentes (LFABM por sus siglas en Inglés: Liver Fibrosis Agent-Based Model) desarrollado *in silico*. Los agentes son cada uno de los tipos celulares y sus productos considerados en la simulación y que en conjunto reproducen de forma muy aproximada las características macroscópicas, histopatológicas y mecánicas que se observan en el modelo de CCl_4 (Dutta-Moscato y col., 2014). En dicho modelo virtual se recrea una monocapa bidimensional de hepatocitos formando un lobulillo conteniendo la proporción correspondiente de células de Kupffer y HSC. Sobre este modelo se simulan no solo las condiciones generales del efecto tóxico del CCl_4 sino los efectos medidos cuantitativamente de las citocinas producidas por las células de Kupffer. El modelo permite realizar estimaciones cuantitativas de la pérdida de elasticidad típica de un tejido fibrótico y el efecto de terapias anti-fibróticas potenciales. Los autores sugieren que este tipo de modelo deberá mejorarse en el futuro

considerando la calibración adecuada entre los cursos temporales de la simulación y los observados en la clínica.

Modelo de activación de células estrelladas hepáticas *in vitro*

En este modelo, las células estrelladas son aisladas y cultivadas en cajas de plástico en presencia de suero (Capítulo 1) y se ha demostrado que inducen su activación o trans-diferenciación hacia un fenotipo contráctil tipo miofibroblasto, que reproducen cambios muy similares a los observados en un hígado *in vivo* después de algún daño de manera reproducible (Friedman, 1994). Es decir, las células incrementan la producción y secreción de ME, pierden retinol intracelular y proliferan (Fig. 3). Este modelo *in vitro* ha permitido analizar el mecanismo de activación de las HSC a nivel de expresión génica y proteica además de facilitar la comprensión de su papel en el contexto de un hígado sano o con algún grado de fibrosis. Por ejemplo, con células en cultivo se ha determinado la expresión diferencial de marcadores específicos en HSC quiescentes y activadas y también este modelo ha sido utilizado como una herramienta valiosa para la prueba de drogas anti-fibróticas potenciales y se ha confirmado la aparición de una nueva población “inactivada” de HSC, tipo miofibroblasto diferente de la quiescente, también con marcadores específicos (Liu y col., 2013). Algunos autores argumentan que este modelo de activación no refleja adecuadamente la reprogramación genética que estas células sufren en un proceso fibrótico normal. Ello puede atribuirse a factores en el microambiente muchos de ellos secretados por otras células hepáticas como células de Kupffer, así como la heterogeneidad entre las HSC y las diferentes poblaciones de miofibroblastos que residen en el hígado (Gressner y Gao, 2014).

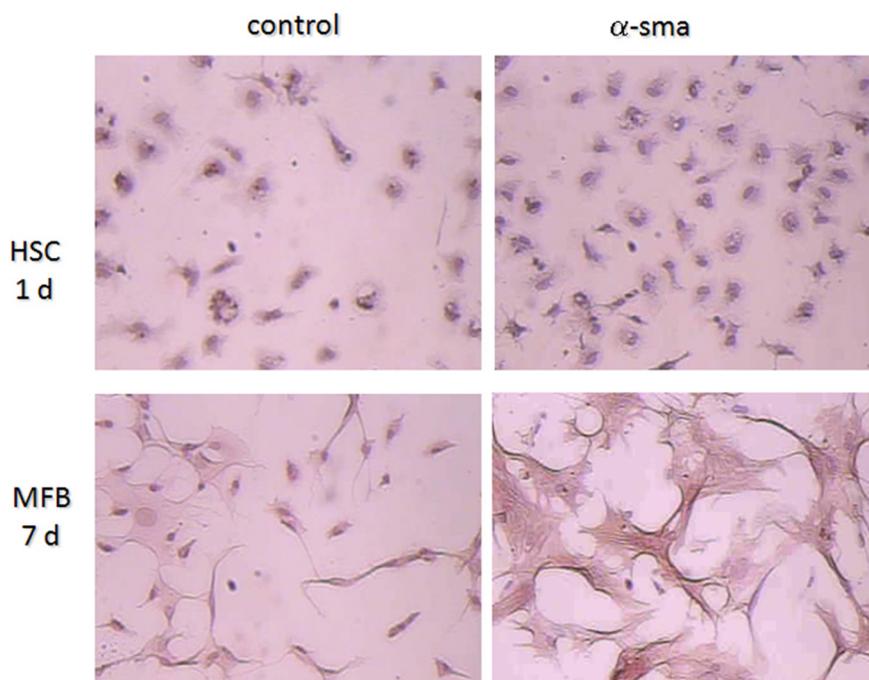


Figura 3. Células estrelladas hepáticas cultivadas por 1 y 7 días. Se observa el cambio en el fenotipo de las células activadas (7 días, miofibroblastos –MFB-) en comparación con las células quiescentes (1 día) donde las características fibrogénicas son evidentes por el incremento en la expresión de α -sma (α - actina de músculo liso). (Con permiso del Dr. M.A. Briones-Orta).

Modelos de hepatocarcinomas

De las causas conocidas de hepatocarcinomas en el humano destacan las hepatitis producidas por los virus B y C. Aproximadamente 30% de los enfermos que portan de manera crónica el virus tipo C, que son alrededor de 170 millones, evolucionan en cirrosis, y de éstos, el 20% desarrolla cáncer hepático (MacArthur y col., 2012). Un dato contundente es que considerando a los pacientes que padecen hepatitis B o C, cerca del 80% presentan cirrosis y hepatocarcinomas. Otras causas asociadas al desarrollo de cáncer se relacionan con cirrosis alcohólica

y NASH, entre otras. A pesar de estar necesariamente relacionados fibrosis-cáncer hepático, no se conocen los mecanismos implicados ni es claro si la fibrosis promueve los hepatocarcinomas o si más bien es un subproducto del daño e inflamación crónicos (Zhang y Friedman, 2012). La activación de las células estrelladas genera cambios drásticos en cantidad y calidad de la ME dando lugar a un ambiente con abundantes factores de crecimiento, citocinas que promueven angiogénesis, pero también un entorno propicio para la perpetuación de hepatocitos pre-neoplásicos y de las mismas células estrelladas en su forma activada (Zhang y Friedman, 2012).

Con este panorama, es prioritario contar con modelos que permitan estudiar las interacciones entre distintos tipos de células hepáticas y su entorno así como analizar separadamente la fibrosis y la inflamación para entender mejor la patogénesis de los hepatocarcinomas. Sin embargo, existen ciertas barreras biológicas que no permiten la infección adecuada con el virus de las especies murinas de laboratorio más usadas y requieren de estrategias experimentales complicadas (Ouyang y col., 2001; Wu y col., 2001; Wu y col., 2005). Ante esta limitante, han surgido modelos en chimpancés que permiten estudiar el proceso de infección pero no su progreso pues esta especie no desarrolla cirrosis y cáncer como lo hace el humano. Por supuesto que la investigación en monos presenta desventajas en cuanto al costo elevado de la investigación y cuestiones éticas que han prohibido su uso. Un modelo alternativo para estudio de las hepatitis B y C es la musaraña arborícola que si bien se infecta y transmite la enfermedad, no mantiene niveles de viremia a largo plazo (Amako y col., 2010).

Entre los modelos disponibles para la inducción de cáncer hepático está el uso a largo plazo de TAA, aunque el más popular es el tratamiento con DEN que desarrolla hepatocarcinomas parecidos a los que se presentan en humano y que tienen mal pronóstico (Liedtke y col., 2013). En general estos modelos tienen gran utilidad para identificar y estudiar posibles blancos para contrarrestar la enfermedad.

Otros modelos los cuales son inducidos con hepatotóxicos pueden ser trasplantables, como el hepatoma de Morris, el de Yoshida, el de Novikoff, entre otros. Un hepatoma trasplantable que hemos trabajado y que se utiliza para investigación básica se produjo inicialmente en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley tratadas con 3'-metil-4-dimetilaminoazobenceno (3'-Me-DAB) al 0.06% adicionado a la dieta por 12 semanas. El 3'-Me-DAB se considera un carcinógeno indirecto porque dentro del organismo es modificado por enzimas que lo metabolizan y entonces actúa en sus blancos dentro de la célula dando lugar a colangiocarcinomas y hepatocarcinomas. El tumor primario fue llamado originalmente 30D y posteriormente al inocularse también en hembras, se llamó genéricamente AS-30D (Smith y col., 1970). La ventaja de este modelo consiste en que contando con un concentrado de células del tumor (3×10^6 células) preservado en medio DMEM, puede inocularse vía i.p. en ratas y en el lapso de 7-14 días obtener un volumen adecuado de líquido ascítico para estudios experimentales (Delgado-Coello y col., 2003). El hepatoma AS-30D también puede trasplantarse directamente en el hígado, por supuesto que por ser un método invasivo requiere de anestesia y el animal debe ser laparotomizado. Bajo estas circunstancias, se desarrolla un tumor sólido que se vasculariza de manera temprana (Thompson y col., 2013). Existen muchos más modelos inducidos con distintos agentes carcinógenos que son revisados por Wu y col., 2009.

Tratamientos novedosos contra la fibrosis hepática

Teóricamente, la eliminación del agente causal resultaría en la disminución o alivio de la fibrosis hepática, la cirrosis puede revertirse en ciertos casos. Sin embargo, la complejidad de estos padecimientos dificulta el uso de una terapia estándar o efectiva para cualquier paciente. El uso de los modelos experimentales ya descritos permiten entender el proceso de activación de las células del tejido hepático y además mostrar la utilidad de distintos fármacos en casos de daño crónico (revisado por Domínguez y col., 2013).

En principio, distintas estrategias se enfocan en atacar puntos clave del proceso de fibrosis, es decir la inhibición de la apoptosis de hepatocitos, control de la inflamación hepática, y/o promoción de la apoptosis de células fibrogénicas o la reversión de HSC activadas al fenotipo quiescente. Brevemente, los tratamientos incluyen drogas antifibróticas, terapias basadas en células que pueden ser hepatocitos, células madre embrionarias o células pluripotenciales inducidas a partir de fibroblastos embrionarios o adultos, células madres mesenquimales, entre otras (Berardis y col., 2015). Las alternativas para dar solución a casos severos han sido el trasplante de hepatocitos y el método más invasivo y más efectivo, el trasplante ortotópico de hígado, aquel donde el hígado proviene de un donador cadavérico.

En este capítulo es de nuestro interés hacer énfasis en enfoques novedosos y en las consideraciones necesarias para aplicar posibles terapias. Estos tópicos se han revisado recientemente en un artículo que recomendamos para ampliar el conocimiento sobre los avances y desafíos actuales (Lee y col., 2015). Entre las terapias que usan células, destaca el potencial de las células madre mesenquimales que de acuerdo a la Sociedad Internacional para la Terapia Celular, son de forma parecida a fibroblastos que pueden adherirse en cajas de cultivo, poseen un patrón específico de expresión de factores celulares (CD105, CD73, CD90) y una ausencia de otros. Estas células pueden auto-renovarse y diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos bajo ciertas condiciones (Berardis y col., 2015).

Otras estrategias terapéuticas se basan en el bloqueo o sub-expresión de genes relevantes para la cirrosis, también algunos tratamientos se enfocan en lograr llevar genes terapéuticos al órgano enfermo, así como en evitar el rechazo de injertos y mejorar la capacidad regenerativa del hígado (Salazar-Montes y col., 2015). Destacan por su mayor eficiencia, cercana al 100%, los procesos que involucran vectores virales, en especial los adenovirus, para liberar de manera controlada genes en determinadas células (proceso llamado transducción). Para revertir la cirrosis se han probado un antisentido de TGF- β 1 o versiones

truncas del receptor de éste, varias colagenasas, mutantes capaces de inactivar a TIMP-1 que se sobre-expresa en hígados cirróticos. Algunos grupos han intentado la liberación de combinaciones de genes para revertir la fibrosis inducida por CCl₄ o DMN.

En la actualidad se utilizan distintas estrategias enfocadas a controlar factores de riesgo relacionados en estas patologías. Por nuestra parte, hemos diseñado una vacuna de administración nasal (HB-ATV-8) utilizando como inmunógeno un fragmento del extremo carboxilo de la proteína CETP (cholesteryl ester transfer protein) que participa en el intercambio de ésteres de colesterol de HDL a VLDL y LDL por triglicéridos (Mas-Oliva y col., 2013, patente en trámite). Esta vacuna se encuentra en fases de estudio preclínicas en conejos y cerdos alimentados con dietas ricas en colesterol y parece ofrecer buenos resultados en términos no sólo de la prevención de la enfermedad aterosclerótica, sino de controlar los daños asociados como es el hígado graso (García-González y col., 2015). A nivel macroscópico, los hígados de conejos tratados con dieta alta en colesterol muestran un aspecto blanquecino que correlaciona con la infiltración de colágena entre el tejido que se aprecia en tinciones tricrómicas de Masson, lo cual sugiere que los conejos bajo estas condiciones desarrollan fibrosis hepática (Fig. 4). Ambos efectos se ven disminuidos en conejos tratados con la vacuna HB-ATV-8.

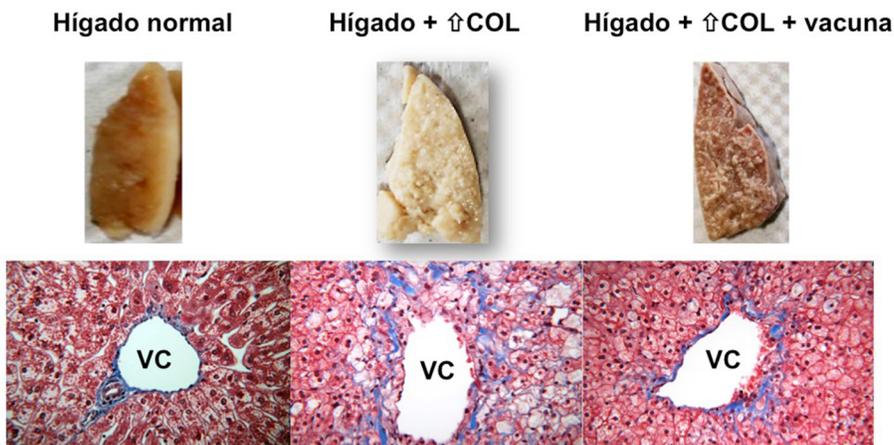


Figura 4. Imágenes macro y microscópicas representativas de hígados obtenidos de conejos alimentados con una dieta normal, una dieta alta en colesterol y una dieta alta en colesterol más aplicación intranasal de vacuna HB-ATV-8. Nótese el aspecto lechoso de los hígados tratados con alto colesterol y la infiltración de colágena en torno a la vena central (VC) en cortes teñidos con tricrómica de Masson, ambas características se observan en menor grado en los hígados de conejos tratados con alto colesterol y vacuna HB-ATV-8.

En vista de la urgencia de controlar las patologías de hígado graso, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó en enero de 2015 en forma prioritaria (“fast track”) las pruebas de fase 2 y 3 (éstas requieren de 100-300 personas y 1000-3000 personas, respectivamente) de concepto en clínica para dos fármacos. Para fase 2, el fármaco Cenicriviroc que podría aplicarse contra la fibrosis hepática donde bloquea al receptor CCR2 reduciendo la inflamación, y contra el VIH bloqueando al co-receptor CCR5 en los inmunocitos. Se están evaluando las posibles consecuencias de bloquear el CCR2 en pacientes con VIH. Para fase 3, la FDA aprobó el ácido obeticólico, un análogo de ácidos biliares que es agonista de FXR (receptor farnesoide X, que junto con los receptores tipo PPAR y LXR participan en la regulación de la inflamación y otros procesos desde el núcleo celular) y que podría ser auxiliar para tratamiento de NASH y de la colangitis primaria esclerosante.

Debido a que la morbilidad y mortalidad asociadas a la fibrosis y cirrosis hepática son de gran impacto, es comprensible que se intenten todas las estrategias posibles para su control y reversión donde el conocimiento de los procesos básicos que alteran la fisiología hepática es fundamental y por ello son también objeto de profundo estudio.

Agradecimientos

Se agradecen las sugerencias a este trabajo por el Dr. Rolando Hernández Muñoz. Al Dr. Marco Antonio Briones Orta del Institute of Hepatology, Foundation for Liver Research London, UK. por permitirnos el uso de imágenes del modelo de activación de HSC. A Javier Gallegos por su ayuda en la localización de referencias.

Referencias

- Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, et al. (2010). Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangerie*. *J Virol* **84**:303-311.
- Aparicio-Bautista DI, Pérez-Carreón JI, Gutiérrez-Nájera N, Reyes-Grajeda JP, Arellanes-Rebolledo J, et al. (2013). Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim Biophys Acta* **1834**:2428-2538.
- Bataller R, Brenner DA. (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest* **115**:209-218.
- Berardis S, Dwisthi Sattwika P, Najimi M, Sokal EM. (2015). Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: Current situation and future prospects. *World J Gastroenterol* **21**:742-758.

- Delgado-Coello B, Santiago-García J, Zarain-Herzberg A, Mas-Oliva J. (2003). Plasma membrane Ca²⁺-ATPase mRNA expression in murine hepatocarcinoma and regenerating liver cells. *Mol Cell Biochem* **247**:177-184.
- Domínguez M, Colmenero J, Bataller R. (2009). Tratamiento de la fibrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol* **32**:627-632.
- Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. (2015). Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biology*. **44-46**:147-156.
- Dutta-Moscato J, Solovyev A, Mi Q, Nishikawa T, Soto-Gutiérrez A, et al. (2014). A multiscale agent-based in silico model of liver fibrosis progression. *Front Bioeng Biotechnol* **2**:18.
- Friedman SL, Yamasaki G, Wong L. (1994). Modulation of transforming growth factor β receptors of rat lipocytes during the hepatic wound healing response. *J Biol Chem* **269**:10551-10558.
- García-González V, Delgado-Coello B, Pérez-Torres A, Mas-Oliva J. (2015). Reality of a vaccine in the prevention and treatment of atherosclerosis. *Arch Med Res* **46**:427-437.
- Gressner OA, Gao C. (2014). Monitoring fibrogenic progression in the liver. *Clin Chim Acta* **433**:111-122.
- Hui AY, Friedman SL. (2003). Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med* **5**:1-23.
- Kocabayaglou P, Friedman SL (2013). Cellular basis of hepatic fibrosis and its role in inflammation and cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* **5**:217-230.
- Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. (2015). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* **64**:830-841.

- Liedtke C, Luedde T, Sauerburuch T, Scholten D, Streetz K, et al., (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* **6**:19.
- Liu X, Brenner DA, Kisseleva T. (2013). Reversibility of liver fibrosis and inactivation of fibrogenic myofibroblasts. *Curr Pathobiol Rep* **1**:209-214.
- MacArthur KL, WuCH, Wu GY. (2012). Animal models for the study of hepatitis C virus infection and replication. *World J Gastroenterol* **18**:2909-2913.
- Mallat A, Lodder J, Teixeira-Clerc F, Moreau R, Codgno P, Lotersztajn S. (2014). Autophagy: a multifaceted partner in liver fibrosis. *Biomed Res Int* **2014**:869390.
- Mas Oliva J, Delgado Coello BA, García González V, Pérez Torres A. Patente: "Vacuna de Aplicación Nasal Contra el Desarrollo de la Enfermedad Aterosclerótica y el Hígado Graso". Registro IMPI: MX/a/2012/007682.
- Mas Oliva J, Delgado Coello BA, García González V, Pérez Torres A. Nasal vaccine against development of atherosclerosis disease and fatty liver. Patente otorgada en E.U.A: USP 9,539,312. 10 de enero de 2017.
- Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, et al. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* **275**:35715-35722.
- Nishikawa T, Bell A. Brooks JM, Setoyama K, Melis M, et al. (2015). Resetting the transcription factor network reverses terminal chronic hepatic failure. *J Clin Invest.* **125**:1533-1544.

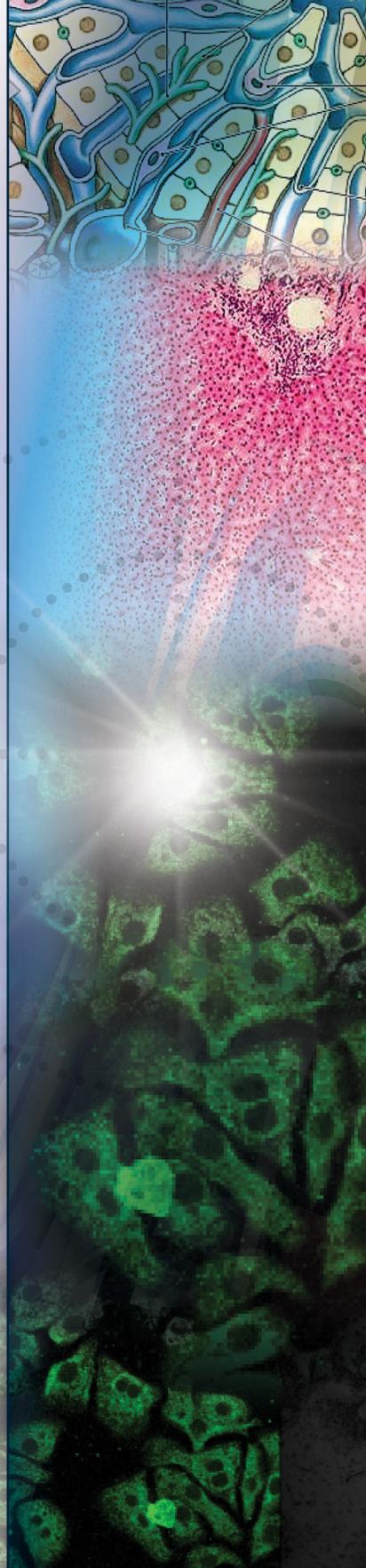
- Öst A, Lempradl A, Casas E, Weigert, Tiko T, et al. (2014). Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity. *Cell* **159**:1352-1364.
- Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY. (2001). Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* **7**:324-330.
- Salazar-Montes AM, Hernández-Ortega LD, Lucano-Landeros MS, Armendariz-Borunda J. (2015). New gene therapy strategies for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* **21**:3813-3825.
- Thompson SM, Callstrom MR, Knudsen B, Anderson JL, Butters KA, et al., (2013). AS30D model of hepatocellular carcinoma: tumorigenicity and preliminary characterization by imaging, histopathology, and immunohistochemistry. *Cardiovasc Intervent Radiol* **36**:198-203.
- Waterland RA. (2014). Epigenetic mechanisms affecting regulation of energy balance: many questions, few answers. *Annu Rev Nutr* **34**:337-355.
- Wu CH, Ouyang EC, Walton CM, Wu GY. (2001). Human hepatocytes transplanted into genetically immunocompetent rats are susceptible to infection by hepatitis B virus in situ. *J Viral Hepat* **8**:111-119.
- Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. (2005). A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* **128**:1416-1423.
- Wu L, Tang ZY, Li Y. (2009). Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**:969-981.

Zhang DY, Friedman SL. (2012). Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **56**:769-775.

CAPÍTULO 03

La hepatectomía parcial como modelo de estudio de la regeneración hepática

Blanca Alicia Delgado Coello



Modelos quirúrgicos

El fenómeno de regeneración hepática ha sido evocado desde los antiguos griegos en el relato mítico que cuenta que Prometeo fue castigado por los dioses cuando se atrevió a regalar el fuego a los hombres. El castigo consistió en mantenerlo inmóvil en el Monte Cáucaso y ser picoteado diariamente por un ave de rapiña. Otro mito griego menos popular, es el del gigante Tityus que fue castigado por su intento de violación hacia Leto -madre de Apolo-, Zeus lo condenó a permanecer en Hades, antiguo reino de los muertos donde dos buitres comerían su hígado cada luna nueva (Tiniakos y col., 2010). En ambos mitos se considera implícitamente la capacidad regenerativa del tejido hepático por lo cual el castigo sería eterno. Los intentos formales de estudiar el fenómeno y sus bases anatómicas y fisiológicas datan de fines del siglo XIX (revisado por Felekouras y col., 2010).

En condiciones normales de cada 20,000 células del hígado solo una experimenta mitosis (Brues y Marble, 1937), sin embargo, si el tejido hepático es desafiado por estímulos químicos o físicos es inducido a proliferar. Este fenómeno es común a todos los mamíferos e involucra a todos los tipos celulares del hígado, es decir, células parenquimatosas o hepatocitos que representan 80% del tejido hepático y el 20% restante representado por células no parenquimatosas (células de Kupffer, células endoteliales, linfocitos, células biliares y células estrelladas o de Ito).

En sentido estricto, el hígado no se regenera sino que recupera la masa original ajustándose a una estricta relación de 2.5-3% de masa hígado respecto al peso corporal. Este fenómeno se denomina hiperplasia compensatoria. En el período inmediato al estímulo, el hígado intenta recuperar masa mediante hipertrofia, esto es, aumentando su volumen; posteriormente incrementa su masa aumentando el número de células. La regeneración hepática es un proceso reversible y multifactorial que es influido por factores genéticos, epigenéticos, nutricionales, la edad y ritmos circadianos.

Los modelos experimentales para el estudio de la regeneración hepática son de tipo quirúrgico que incluyen a la hepatectomía parcial y la ligadura de la rama portal, y los de tipo farmacológico, que involucran el uso de agentes hepatotóxicos (revisado por Mao y col. 2014).

El modelo quirúrgico más ampliamente usado para estudiar el fenómeno de regeneración hepática en rata es el descrito por Higgins y Anderson en 1931, la hepatectomía parcial al 70% (HP) que es el que se trata en el presente capítulo. Una hepatectomía parcial de este tipo consiste en retirar 2/3 de la masa hepática (lóbulos medio e izquierdo), la recuperación total del tejido tiene una duración aproximada de 5-7 días en ratas. La ventaja principal del modelo de HP respecto al procedimiento de ligadura de la vena porta, radica en que la ablación del tejido no involucra procesos de necrosis masiva ni de inflamación aguda debido a que el hígado remanente se mantiene relativamente intacto. Además, el proceso de recuperación de la masa hepática puede seguirse temporalmente con el tiempo cero representado por el momento de la cirugía en que los hepatocitos entran de manera sincrónica a la etapa G₁ del ciclo celular (Michalopoulos, 2010). Las hepatectomías parciales que involucran menor o mayor proporción al 70% no muestran la misma capacidad de recuperación de masa y por ello son menos populares como modelo. La hipertrofia de hasta 1.5 veces que se sabe ocurre después de una hepatectomía, se ha estudiado recientemente y se ha demostrado que si se escinde solo el lóbulo hepático medio (hepatectomía del 30%), los hepatocitos no se dividen y la hipertrofia explica por sí misma el incremento de tamaño del hígado (Miyaoaka y Miyajima, 2013). En la HP al 70% se sugiere que la hipertrofia representa un paso preparativo y necesario para la etapa proliferativa que logre compensar una pérdida mayor de tejido hepático (Miyaoaka y Miyajima, 2013).

Las hepatectomías subtotales ($\geq 90\%$) comprometen seriamente la vida de los organismos debido a fallas hepáticas graves como la encefalopatía o coagulopatía. Los organismos más utilizados para investigación de la regeneración hepática con fines clínicos por su semejanza con la fisiología humana son el perro, el cerdo y el borrego

(Palmes y Spiegel, 2004). En la Tabla 1, se enlistan una serie de reportes clásicos que representaron grandes avances en el conocimiento del modelo de regeneración hepática.

Durante la evolución de las metodologías para estudiar el fenómeno de regeneración hepática, tempranamente quedó clara la intervención de factores presentes en la sangre (factores humorales) como demostraron Nancy Bucher y colaboradores en pares o tríadas de ratas compartiendo la circulación sanguínea mediante parabiosis (Fig. 1).



Figura 1. Nancy Bucher (nacida en 1913) usó ratas en parabiosis para estudiar la intervención de factores humorales en la RH.

TABLA 1
RESUMEN DE CONTRIBUCIONES RELEVANTES PARA EL
CONOCIMIENTO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

CONTRIBUCIÓN	AUTORES
Demostración de que animales con ablación del 75% del tejido hepático pueden sobrevivir	Varios autores, fines del siglo XIX.
Primera hepatectomía exitosa documentada en humano	Langenbuch, 1887*.
Descripción del modelo de RH al 70% en rata	Higgins y Anderson, 1931.
Análisis de la mitosis en el modelo de RH al 70%	Brues y Marble, 1937.
Evidencia de la participación de factores humorales durante la RH en ratas parabióticas	Christensen y Jacobsen, 1949; Bucher y col., 1951.
Descripción de células ovales equivalentes a las progenitoras, en el canal de Hering (ductos biliares)	Farber, 1956.
Descripción de la sinfonía portal	Whitfield, década de los 70's.
Papel de mitógenos en RH producidos en y fuera del hígado	Michalopoulos y col.
Papel del TNF-a en la RH, incluyendo ratones KO	Mead y Fausto, 1989.
Generación de ratones KO [®] retardo en la regeneración, no la cancela	Transición 80's-90's.
Análisis genómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico, epigenómico, etc.	90's - siglo XXI.

RH, regeneración hepática, KO, animales knock-out.

* Citado en Felekouras y col., 2010.

Posterior a una HP se desencadenan numerosos cambios a nivel de transcripción de genes que posteriormente se traducen entre otros, en cambios de niveles de proteínas y hormonas en plasma y en expresión de proteínas de membrana necesarias para enfrentar la contingencia. En el plasma ocurre lo que en la década de los 70's se llamó "sinfonía portal" que involucra elevaciones y descensos súbitos de hormonas y factores de crecimiento (Fig. 2, Tabla 2). Resalta que en las primeras 2h posteriores a la cirugía para prevenir la hipoglucemia, ocurre un descenso notable en los niveles de insulina y un incremento paralelo de glucagon. A nivel celular, es evidente a las 12h (en ratas) o a las 24h (en ratones) posteriores a una hepatectomía, un fenómeno transitorio llamado esteatosis, dado por la aparición de gotas de triglicéridos y ésteres de colesterol relacionados con el metabolismo de lípidos utilizados como fuente de energía. Un estudio donde el fenómeno de regeneración hepática se analizó hasta 7 días posteriores a la HP en ratón, describe cuatro picos de proliferación de los cuales tres muestran acumulación de grasa y son regulados por ritmos circadianos (Zou y col., 2012). A nivel macroscópico esta acumulación de lípidos es evidente por la palidez del tejido hepático a las 24h de efectuada la hepatectomía. Es importante destacar que diversos lípidos, incluido el colesterol, tienen una intervención activa e importante en el proceso de regeneración hepática (Delgado-Coello y col., 2011).

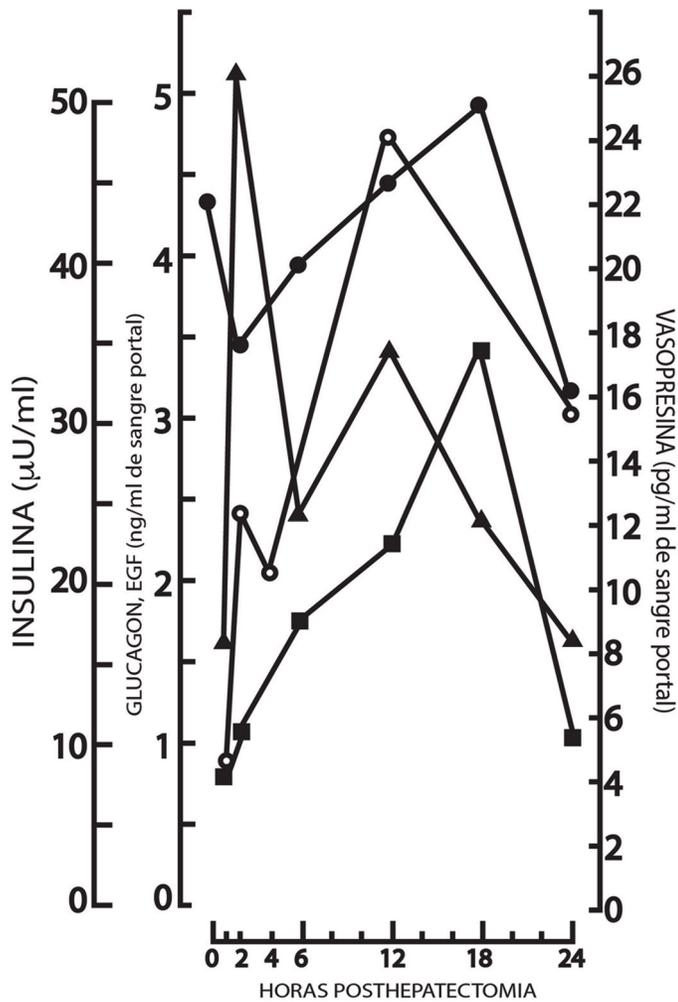


Figura 2. Sinfonía portal que muestra cambios en factores plasmáticos aparentes después de una hepatectomía al 70%. ● Insulina, ○ glucagon, ▲ vasopresina, ■ EGF. (Modificada de Whitfield, 1990).

A nivel bioquímico, ocurre un transporte más eficiente de glucosa hacia el citosol y la insulina permanece más tiempo acoplada a sus receptores y éstos aumentan también en número. Para que se den estos cambios, se involucran un aumento en el gradiente de sodio en la membrana, y el consiguiente aumento en el transporte de aminoácidos hacia el interior celular. El aumento en el gradiente de sodio se da parcialmente por una estimulación en la actividad de la ATPasa sodio-potasio que normalmente se encarga de sacar sodio en intercambio por potasio. Los iones sodio son fundamentales para transportadores especializados en llevar aminoácidos neutros a la célula (transportadores ASCT2) y un transportador de glutamina dependiente de sodio (SN2). Para que ocurran estas movilizaciones de receptores, canales o enzimas en la membrana plasmática, se requieren cambios de fluidez de la misma. Se ha documentado que a tan solo 3h de una hepatectomía parcial, la fluidez de la membrana aumenta debido a que la proporción colesterol/fosfolípidos disminuye (Yoshida y col., 1993).

TABLA 2**MEDICIONES DE FACTORES REALIZADAS EN SANGRE PORTAL DE RATA Y RATÓN A DIFERENTES TIEMPOS POST-HEPATECTOMÍA**

	Tiempos posteriores a hepatectomía parcial al 70%							
	0h	2h	6h	12h	18h	24h	48h	72h
Glucosa (mg/dl)		78	80	80	105	105		
Insulina (μU/ml)	44.0	35	41	44	50	31		
Glucagon (ng/ml)	0.85	2.5	2.1	4.8	4.3	3.4		
Vasopresina (pg/ml)	8.0	25	14	19	16	9		
Somatostatina (pg/ml)		62.5	65	43.8	61	61		
EGF (ng/ml)	0.75	1.2	1.9	2.5	3.5	1.4		
HGF	1X			5X		2X	2X	1X
Triglicéridos* (mg/dl)	50					25		20
Colesterol* (mg/dl)	70					55		60

Datos de glucosa, insulina, glucagon, vasopresina, somatostatina y EGF (factor de crecimiento epidermal) obtenidos en ratas por Cornell, 1985. Datos de HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) descritos por Mendieta-Condado y col., 2009 (incrementos sobre el control). *Datos obtenidos en ratón (Lo Sasso y col., 2010).

Fases de la regeneración hepática

La regeneración hepática ocurre en tres fases principales: fase cebadora o iniciadora; fase de proliferación y fase de inhibición o terminación, cada una señalizada por distintos factores (Tabla 3). Es importante destacar que los modelos en los que se bloquea la señalización mediada por determinados genes (animales knockout o transgénicos) han demostrado que existe redundancia en distintas vías, tal que el resultado observado es que la regeneración no se bloquea sino que muestra una tendencia a retrasarse (Fausto y col., 1995; Taub, 2004). Por lo tanto, estos modelos han permitido interpretar la función de genes específicos y demostrar que el proceso no depende de uno en particular. Lo anterior parece ser un mecanismo protector evolutivamente conservado con que cuenta el hígado, para el cual no se cuenta con un reemplazo funcional si es dañado.

En general, aquellos factores que intervienen en la fase iniciadora (0 a 8 horas posteriores a la HP) son citocinas promotoras de crecimiento (o pro-inflamatorias), principalmente TNF- α e IL-6 (factor de necrosis tumoral- α e interleucina-6, respectivamente). La producción de tales citocinas está asociada al sistema inmune donde participan los lipopolisacáridos (LPS) y los receptores tipo Toll 2 y 4 (Toll-like receptors o TLR; Campbell y col., 2006). TNF- α e IL-6 tienen como misión aumentar la susceptibilidad de los hepatocitos, vía los correspondientes receptores y factores transcripcionales (éstos detectables desde los 30 minutos post-hepatectomía), a los factores de crecimiento a los cuales son normalmente refractarios o bien vía la activación de genes tempranos. Aproximadamente un 40% de la activación de estos genes dependen de la expresión de IL-6 (Li y col., 2001). Durante la fase iniciadora, se produce una degradación de la matriz extracelular que facilita la movilización de factores y rearrreglos necesarios para preparar al tejido para la proliferación.

TABLA 3**FACTORES PROMOTORES E INHIBIDORES DE LAS FASE DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA***

FASE	FACTOR	BLANCO → EFECTO
Iniciación (G ₀ → G ₁)	TNF-α	TNFR → ↑ STAT3, NF-κB → ↑ activación de genes → ↑ susceptibilidad de hepatocitos a factores de crecimiento
	IL-6	↑ síntesis de STAT3 y ERK1/2 y ↑ susceptibilidad de hepatocitos a HGF
	LT-β	↑ NF-κB en células ovasles → ↑ susceptibilidad de cél. ovasles a factores de crecimiento
	NO	↑ procaspasa S-nitrosilante → ↓ TNF-α, actividad apoptótica través de caspasa 3
	IFN-γ	Afecta a través de TNF-α y LPS
Proliferación (G ₁ → S → G ₂ → M)	HGF	MetR → ↑ síntesis de ADN y proteínas → MITOSIS
	EGF y TGF-α	EGFR → ↑ síntesis de ADN y proteínas → MITOSIS
	TNF, IL-6, VEGF, FGF1/2, ác. biliares [¶]	→ MITOSIS
	HSS	Autofosforilación y reserva de EGFR
	NE/insulina/SOM/Glucagon	↑ Exposición de hepatocitos a factores de crecimiento
Inhibición (M → G ₀)	TGF-β Activinas	Contrarrestan efectos de TGF-α → ↓ síntesis de ADN

* Modificada de Pahlavan y col., 2006. [¶] Considerados mitógenos auxiliares.

TNF-α, factor de necrosis tumoral; IL, interleucina 6; LT-β, linfotóxina β; NO, óxido nítrico; IFN-γ, interferon γ; HGF, factor de crecimiento hepático; EGF, factor de crecimiento epidermal; TGF, factor de crecimiento transformante; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial; FGF, factor de crecimiento fibroblástico; HSS, substancia estimuladora hepática; NE, norepinefrina; SOM, somatostatina; TGF-β, factor de crecimiento transformante-β; TNFR, receptor de TNF-α; STAT3, señal transductora y activadora de transcripción 3; NF-κB, factor nuclear κB; ERK1/2, señal extracelular relacionada a cinasas 1/2; LPS, lipopolisacárido; EGFR, receptor de EGF.

En la fase de proliferación (12 a 24 horas posteriores a la HP), distintos factores de crecimiento promueven la síntesis de ADN y proteínas que conllevan a la mitosis. En la fase de inhibición (a partir de las 48 horas posteriores a la HP), las citocinas inhibitorias como el TGF- β (factor de crecimiento transformante- β) y activinas promueven la disminución de la síntesis de ADN y arrestan de nuevo a las células hepáticas.

La interconexión entre las redes de citocinas, factores de crecimiento y metabólicas durante la regeneración hepática es revisada de manera excelente por Fausto y colaboradores (Fausto y col, 2006). Asimismo, el lector es referido a la revisión por Kurinna y Barton de los factores de transcripción que participan en la regeneración hepática (Kurinna y Barton, 2011).

Las células no parenquimatosas desempeñan un papel fundamental cuando se activan por el estímulo quirúrgico y cambian su fenotipo. Por un lado, las células de Kupffer producen TNF- α e IL-6 que tienen su efecto en los receptores de los hepatocitos y por otra parte, las células estrelladas se depletan de vitamina A, sintetizan colágenas tipo I y III (en estado quiescente sintetizan principalmente colágena tipo IV) y producen TGF- β necesario para la inhibición de la proliferación. Es decir, que posterior a la degradación de la matriz extracelular del tejido hepático mediada por metaloproteinasas (a cargo de TNF), los hepatocitos son los primeros en sintetizar ADN y proliferar, con un máximo a las 24 horas. Para ello, con respecto a la unidad funcional llamada lobulillo hepático, la proliferación sigue una secuencia bien conocida, es decir, primero proliferan los hepatocitos periportales que conforman la zona 1 y después en dirección de la vena central, se distinguen una segunda y tercera zonas de proliferación (Taub, 2004; Wu y col., 2011). Esta zonación podría estar relacionada con gradientes en el mismo sentido observados para el flujo sanguíneo y para enzimas del metabolismo. Los hepatocitos de la zona 1 realizan funciones de gluconeogénesis, síntesis de urea y β -oxidación de ácidos grasos; los de la zona 3 realizan glucólisis, y participan en lipogénesis (Stanger, 2015).

Después de sufrir mitosis los hepatocitos, tiene lugar la síntesis de ADN y división a las 48 horas de las células biliares, células de Kupffer y estrelladas y finalmente las células endoteliales hacia las 96 horas.

La fase de inhibición o terminación es la menos conocida, pero es claro que para que concluya la recuperación de la masa y arquitectura hepática se sintetiza nuevamente matriz extracelular (Mohammed y Khokha, 2005) y la funcionalidad del hígado se recupera totalmente.

En los modelos quirúrgicos y tratamientos agudos con CCl_4 , se ha demostrado puntualmente mediante experimentos de trazamiento *in situ*, que la regeneración depende mayoritariamente de los hepatocitos maduros pre-existentes (Malato y col., 2011). Cuando el tejido hepático presenta daño severo y los hepatocitos remanentes no pueden llevar a cabo la regeneración, ésta depende de células madre intrahepáticas adultas (o células madre hepáticas facultativas) conocidas como células ovals por la forma de su núcleo (Farber, 1956). Las células ovals coexisten con células progenitoras tipo hepatocitos en el canal de Hering, ambas pueden diferenciarse en colangiocitos (células epiteliales de ductos biliares) y hepatocitos. Sin embargo, algunas evidencias señalan que las células ovals no dan lugar a hepatocitos (éstos provienen de otros hepatocitos), ni participan de manera importante en la recuperación de la masa hepática (Yanger y col., 2014), pero es probable que participen en la recuperación de los canalículos biliares y la polaridad del hígado. Las células ovals han sido estudiadas principalmente en roedores aunque se han encontrado células similares en humanos con distintas patologías (Tanaka y col., 2011). Actualmente se tiene mayor conocimiento sobre la caracterización de las células ovals, su origen y su dependencia de factores provistos por el nicho de células madre (Itoh y Miyajima, 2014). Un trabajo reciente postula la existencia de hepatocitos híbridos localizados en la región periportal que expresan genes de hepatocitos y de ductos biliares y que tienen una activa participación en la recuperación de masa hepática en procesos de daño crónico moderados (Font-Burgada y col., 2015). En conjunto, esta evidencia sugiere que la plasticidad de los hepatocitos, cuyas propiedades de bipotencialidad les permiten

autorenovarse o generar células ovas similares a las células de ductos biliares (duct-like oval cells) que a su vez pueden revertir su fenotipo al de hepatocitos, es considerada la fuente principal de reparación en el hígado dañado (Koop y col., 2016). Por otra parte, aunque las células de ductos biliares muestran capacidad clonogénica *in vitro*, esta propiedad no se reproduce *in vivo*.

Un recurso más para la recuperación del tejido hepático cuando las fuentes intrahepáticas se ven rebasadas, proviene de células madre extrahepáticas de médula ósea que son transportadas por la vasculatura portal (Navarro-Alvarez y col., 2010; Liu, y col., 2016). Existe evidencia que sugiere que dichas células, las cuales aumentan en número y se movilizan después de una HP, juegan un papel preponderante en la reparación del tejido a través de la producción de HGF (Wang y col., 2012). Actualmente aún no se conoce el origen de algunos tipos de células madre/progenitoras, su proceso de diferenciación (hacia células parenquimatosas o no parenquimatosas), cómo y cuándo se activan las células madre intra y extrahepáticas y la señalización (cross-talk) entre los distintos tipos de células madre (Liu, y col., 2016).

A pesar de que las etapas de la regeneración hepática se conocen bastante bien, todavía no es muy claro qué procesos fisiológicos desencadenan los primeros eventos, una posibilidad es que la demanda de energía después de una HP, dispara una señal temprana de estrés o por factores hemodinámicos alterados. Tampoco se comprende totalmente cómo el tejido hepático hace uso de su "hepatostato" como lo han llamado algunos, para decidir en qué momento el tejido alcanza su masa ideal, detiene su proliferación y termina la reconstrucción vascular del órgano.

Es importante destacar aspectos insuficientemente explorados que sin duda tienen influencia durante la regeneración hepática; uno de ellos es si la poliploidía (4N a 32N) observada con frecuencia en los hepatocitos podría significar alguna ventaja. Por ejemplo, en ratas y humanos adultos predominan los hepatocitos 4N alcanzando un 70% y

40%, respectivamente (revisado por Gentric y col., 2012). Algunos autores sugieren que existe una correlación entre la poliploidía y la expresión genética para contender con factores como hipoxia, daño al ADN, estrés oxidativo, así como para prolongar la sobrevivencia y aumentar su potencial proliferativo (Anatskaya y Vinogradov, 2007). Un estudio concluye que la poliploidía aparentemente no influye la diferenciación ni la regeneración hepática (Pandit y col., 2012). Sin embargo, los autores reconocen un papel de la poliploidía en el control del tamaño celular, lo cual en el caso de la regeneración no es un asunto menor. En ratones hepatectomizados al 30% el número de núcleos no cambia y la ploidía aumenta levemente, pero si la hepatectomía se realiza al 70% el número de núcleos disminuye y la ploidía aumenta (Miyaoaka y Miyajima, 2013).

Otro enfoque en voga es el papel de los microARNs o miARNs, ARNs pequeños no codificantes de 19-24 nucleótidos, que regulan a nivel transcripcional y post-transcripcional los genes de especies tanto vegetales como animales. Los miARNs regulan cerca de una tercera parte de los genes que conforman al genoma humano. Los microARNs desempeñan su función en distintos tejidos en salud y enfermedad, en distintas etapas de desarrollo y diferenciación, pero es su desregulación en condiciones patológicas lo que los hace objeto importante de estudio y su presencia en suero o plasma es valiosa para su uso potencial como marcador de enfermedades hepáticas (Gori y col., 2014). Durante el desarrollo del tejido hepático, los miARNs regulan promoviendo o inhibiendo la proliferación de los distintos tipos celulares. Respecto a la participación de los miARNs durante la regeneración hepática aún hay pocos reportes, sin embargo se han descrito cuáles promueven específicamente la proliferación (mir-21, miR-23b y miR221), y cuáles la inhiben (miR-26a, miR-33, miR-34a y miR-127) (revisado por Chen y Verfillue, 2014). Otro tipo de ARNs no codificantes son los piwi-interacting ARNs o piARNs (donde PIWI (P-element-induced wimpy testis) que fueron identificados primero en líneas germinales y recientemente en células somáticas. En el tejido hepático se han descrito dos de los tres genes codificantes para Piwi del genoma de rata, durante la regeneración hepática algunos de estos piARNs muestran cambios entre las 24-48 h

posteriores a HP en coincidencia con el tiempo en que se detiene la replicación del ADN (Rizzo y col., 2014).

A manera de conclusión, es importante enfatizar la utilidad práctica que puede darse al conocimiento adquirido sobre el fenómeno de regeneración hepática. En la investigación básica destaca el uso de modelos hepatectomizados como un control útil en estudios donde la proliferación celular es estrictamente regulada en comparación con células neoplásicas cuyo crecimiento ocurre de manera descontrolada. Los fundamentos básicos de la regeneración hepática también son aplicables en la clínica en los casos de trasplantes de hígado donde en el mejor de los casos se cuenta con una sección de hígado proveniente de donadores cadavéricos o vivos, el cual una vez trasplantado debe regenerarse. Sin embargo, una complicación frecuente es el síndrome conocido como “small-for-size-syndrome” que consiste en la incapacidad del órgano para regenerarse en el organismo receptor llevando a acidosis, complicaciones renales y pulmonares, y eventualmente a la muerte. Cuantitativamente se ha calculado que si la relación de peso del injerto/receptor es $< 1\%$ o el volumen del hígado es $< 30\%$ del volumen promedio, puede ser un factor de riesgo para la ocurrencia del síndrome (Tetsuya, y col., 1999). Adicionalmente, el conocimiento básico de la regeneración hepática se relaciona con la aplicación de terapias e ingeniería de tejidos que son tratadas en el capítulo 5 y que son importantes como alternativas dada la alta incidencia de desórdenes hepáticos a nivel mundial.

Agradecimientos

Se agradecen las sugerencias a este trabajo por la Dra. Marina Macías Silva. A Beatriz Hernández Téllez por la preparación de tinciones de hepatocitos que se muestran en la portada del capítulo. A Jorge Bravo Martínez por la elaboración de figuras para este capítulo y a Javier Gallegos por su ayuda en la localización de referencias.

Referencias

Anatskaya OV, Vinogradov AE. (2007). Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. *Genomics* **89**:70-80.

Alison MR, Islam S, Lim S. (2009). Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* **217**:282-298.

Brues AM, Marble BB. (1937). An analysis of mitosis in liver restoration. *J Exp Med* **65**:15-27.

Bucher NLR, Scott J, Aub JC. (1951). Regeneration of the liver in parabiotic rats. *Cancer Res* **11**:457-465.

Campbell JS, Riehle KJ, Brooling KF. (2006). Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J Immunol* **176**:2522-2528.

Chen Y, Verfaillie CM. (2014). MicroRNAs: the fine modulators of liver development and function. *Liver Int* **34**:976-990.

Cornell RP. (1985). Gut-derive endotoxin elicits hepatotropic factor secretion for liver regeneration. *Am J Physiol* **249**:R551- R562.

- Delgado-Coello B, Briones-Orta MA, Macías-Silva M, Mas-Oliva J (2011). Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver Int* **31**:1271-1284.
- Farber E. (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* **16**:142-148.
- Fausto N, Laird AD, Webber EM. (1995). Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB J* **9**:1527-1536.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2006). Liver regeneration. *Hepatology* **43**:S45-S53.
- Felekouras ES, Kaparelos DC, Papalampros E. (2010). The history of liver surgery, hepatectomy and haemostasis. *Hellenic J Surg* **82**:280-296.
- Font-Burgada J, Shalapour S, Ramaswamy S, Hsueh B, Rossell D, et al. (2015). Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer. *Cell* **162**:766-779.
- Gentric G, Desdouets C, Celton-Morizur S. (2012). Hepatocytes polyploidization and cell cycle in liver pathophysiology. *Int J Hepatol* **2012**:282430.
- Gori M, Arciello M, Balsano C. (2014). MicroRNAs in nonalcoholic fatty liver disease: novel biomarkers and prognostic tools during the transition from steatosis to hepatocarcinoma. *Biomed Res Int* **2014**:741465.
- Hata S, Namae M, Nishina H. (2007). Liver development and regeneration: From laboratory study to clinical therapy. *Develop Growth Differ.* **49**:163-170.

- Higgins GM, Anderson RM. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**:186-202.
- Itoh T, Miyajima A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* **59**:1617-1626.
- Khan AZ, Mudan SS. (2007). Liver regeneration: mechanisms, mysteries and more. *ANZ J Surg* **77**:9-14.
- Kopp JI, Grompe M, Sander M. (2016). Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. *Nature Biol* **18**:238-245.
- Kurinna S, Barton MC. (2011). Cascades of transcription regulation during liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol* **43**:189-197.
- Li W, Liang X, Leu JI, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. (2001). Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* **33**:1377-1386.
- Liu, WH, Ren LN, Wang T, Navarro-Alvarez N, Tang LJ. (2016). The involving roles of intrahepatic and extrahepatic stem/progenitor cells (SPCs) to liver regeneration. *Int J Biol Sci* **12**:954-963.
- Lo Sasso G, Celli N, Caboni M, Murzilli S, Salvatore L, et al. (2010). Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology* **51**:1334-1344.
- Malato Y, Naqvi S, Schürmann N, Ng R, Wang B, et al. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J Clin Invest* **121**:4850-4860.

- Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. (2014). Liver regeneration. *Transl Res* **163**:352-362.
- Mead JE, Fausto N. (1989). Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:1558-1562.
- Mendieta-Condado E, Pichardo-Olvera M, Sánchez-Sevilla L, Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R. (2009). Adenosine administration accelerates progression of the cell cycle during rat liver regeneration induced by one-third hepatectomy. *J Pharmacol Exp Ther* **331**:122-132.
- Michalopoulos GK. (1990). Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* **4**:176-187.
- Michalopoulos GK. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* **176**:2-13.
- Miyaoka Y, Miyajima A. (2013). To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div* **8**:8.
- Mohammed FF, Khokha R. (2005). Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* **15**:555-563.
- Palmes D, Spiegel HU. (2004). Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* **25**:1601-1611.
- Pahlavan PS, Feldmann RE Jr, Zavos C, Kounturas J. (2006). Prometheus's challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration. *J Surg Res* **134**:238-251.
- Pandit SK, Westendorp B, Nantasanti S, van Liere E, Tooten PC, et al. (2012). E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **14**:1181-1191.

- Racanelli V, Rehermann B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**:S54-S62.
- Rizzo F, Hashim A, Marchese G, Ravo M, Tarallo R, et al. (2014). Time regulation of P-element-induced wimpy testis-interacting RNA expression during rat liver regeneration. *Hepatology* **160**:798-806.
- Roszell JA, Fredi JL, Irving CC. (1978). The development of polyploidy in two classes of rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta* **519**:306-316.
- Santoni-Rugiu E, Jelnes P, Thorgeirsson S, Bisgaard HC. (2005). Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS* **113**:876-902.
- Stanger BZ (2015). Cellular homeostasis and repair in mammalian liver. *Annu Rev Physiol* **77**:179-200.
- Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N, Miyajima A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem* **149**:231-239.
- Taub R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature Rev* **5**:836-847.
- Tetsuya K, Mureo K, Kenji U, Yukihiro I, Shinji U, et al. (1999). Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation* **67**:321-327.
- Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. (2010). Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *J Hepatol* **53**:357-361.
- Whitfield JF, (1990). *Calcium, Cell cycles, and Cancer*. CRC Press, Inc. Florida, USA. p. 27.

Wang L, Wang X, Wang L, Chiu JD, van de Ven G, et al. (2012). Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. *Gastroenterology* **143**:1555-1563.e2.

Wu Y, Guo F, Liu J, Xiao X, Huang I, He D. (2011). Triple labeling with three thymidine analogs reveals a well-orchestrated regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatol Res* **41**:1230-1239.

Yanger K, Knigin D, Zong Y, Maggs L, Gu G, et al. (2014). Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cel Stem Cell* **15**:340-349.

Yoshida M, Tanaka J, Tamura J, Fujita K, Kasamatsu T, et al. (1993). Altered fluidity of liver membranes following partial hepatectomy in rats. *J Surg Res* **55**:390-396.

Zou Y, Bao Q, Kumar S, Hu M, Wang G-Y, Dai G. (2012). Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induce liver regeneration. *PLOS ONE* **7**:e30675.

Foto de Nancy L.R. Bucher tomada del sitio: <http://www.bumc.bu.edu/busm-pathology/busm-faculty-profiles/nancy-lr-bucher-md/>

Recomendaciones Experimentales

Recomendaciones prácticas para la realización de hepatectomías parciales (HP) al 70%

1. Los organismos de estudio deben tratarse de acuerdo a los Códigos de ética vigentes.
2. Debido a que la regeneración hepática se rige por ritmos circadianos, se recomienda realizar las HP en un rango de horas estandarizado.
3. El material utilizado para realizar la cirugía debe estar limpio y remojarse en solución de Benzal.
4. Colocar un campo quirúrgico limpio y proceder a anestésiar a la rata con éter etílico o si se quieren evitar los efectos hepatotóxicos de éste, puede usarse una mezcla de ketamina/ xylazina (40-80 mg/Kg de peso y 5-10 mg/Kg de peso, respectivamente) administrada por vía intramuscular.
5. Se recomienda rasurar la zona, limpiar con benzal y realizar laparotomía ventral, procurando hacer la menor incisión posible (3 cm, aproximadamente).
6. Localizar los dos lóbulos mayores, el lóbulo medio y el lóbulo izquierdo que representan aproximadamente el 38% y el 30% del peso del hígado, respectivamente. Pasar por debajo de ambos lóbulos el hilo para ligar cuidadosamente el pedículo vascular que comprende aportes de las venas portal y hepática. Cada lóbulo posee un pedículo que contiene una tríada portal.
7. Cortar los dos lóbulos en bloque a 1 ó 2 mm distal a la ligadura.

8. Limpiar con gasas, verificar que no haya sangrado en la cavidad peritoneal.
9. Suturar peritoneo y músculo primero y después suturar la piel. Limpiar la herida con benzal.
10. Preparar un grupo de animales control (sham-operated) únicamente realizar la laparotomía, manipular el hígado y suturar igualmente en dos capas.
11. Mantener a los animales en observación y de ser necesario utilizar lámpara para regular temperatura y promover la recuperación.

Referencias

Higgins GM, Anderson RM. (1931). Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **12**:186-202.

Martins PNA, Nehaus P. (2007). Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int* **27**:384-392.

Palmes D, Spiegel HU. (2004). Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* **25**:1601-1611.

CAPÍTULO 04

Papel de las balsas lipídicas membranales en el hepatocito

Blanca Alicia Delgado Coello



Consideraciones acerca de cómo se dispone el colesterol en las membranas

La estructura básica de las membranas biológicas es conocida desde hace algún tiempo y el modelo propuesto por Singer y Nicolson en 1972 ha evolucionado con la consideración de la presencia de microdominios dinámicos hasta llegar a la concepción del modelo de balsas lipídicas propuesto hacia 1997 (Simons e Ikonen, 1997). El propio Nicolson discute recientemente su modelo en términos de lo que aún es válido e incorporando conceptos desconocidos en su época tales como las balsas lipídicas y la estructura del citoesqueleto que regula movimientos de ciertas proteínas de la membrana (Nicolson, 2014; Fig. 1).

Inicialmente se propuso que la función de las balsas lipídicas sería la de servir de plataformas para el transporte de algunas membranas o para cumplir funciones de relevo de señales intracelulares. Antes de analizar específicamente estos dominios, es muy importante introducir al colesterol como componente de las membranas celulares.

La distribución del colesterol en la célula eucarionte muestra un gradiente natural (de menor a mayor proporción) desde las membranas del retículo endoplásmico donde se sintetiza, hacia la membrana plasmática (Tabla 1). Las membranas del retículo endoplásmico muestran una relación molar colesterol/fosfolípidos de 0.15 en tanto que en la membrana plasmática de mamíferos, la proporción es cercana a 1.0 (van Meer y col., 2008). El contenido de colesterol es asimismo bajo en mitocondria, aumenta en Golgi aún dentro del cual existe un gradiente (de menor a mayor en los apilamientos cis, medio y trans) y la concentración máxima en la membrana plasmática que representa el 90% del total. La composición de las membranas correlaciona con el grosor de las mismas, su fluidez, y lo más importante, con su función. Es claro que las membranas de los organelos de la ruta de síntesis hacia su tráfico a la membrana plasmática requieren de una flexibilidad o fluidez diferenciada para la formación de vesículas y fusión de las mismas.

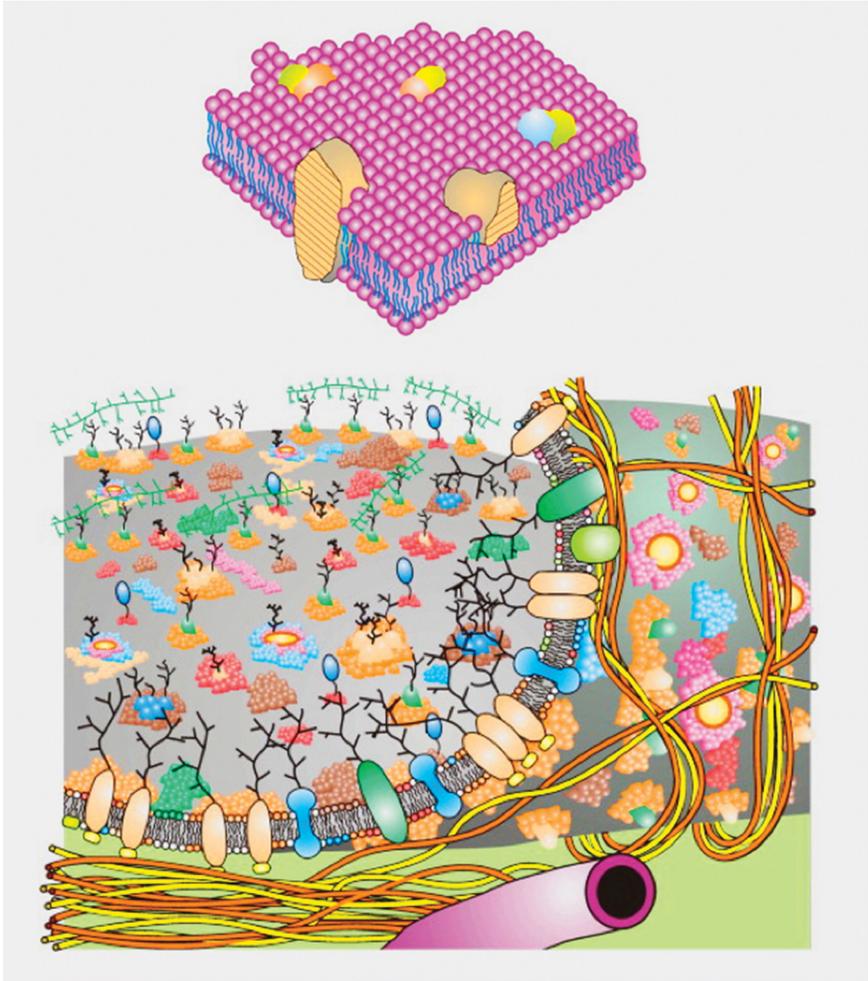


Figura 1. Evolución del modelo del mosaico fluido de la membrana. Arriba: Modelo original propuesto en 1972 por Singer y Nicolson. Abajo: Modelo actualizado donde se muestran los dominios de membrana y estructuras del citoesqueleto o extracelulares asociadas a la propia membrana. El modelo destaca mecanismos que restringen la difusión lateral como el propio citoesqueleto, dominios lipídicos, complejos de glicoproteínas integrales de membrana y asociación polisacárido-glicoproteína. (Tomado de Nicolson, 2014).

El papel que desempeña el colesterol en el contexto de las membranas de las células eucariontes y como parte fundamental en sus adaptaciones evolutivas, se ha abordado previamente por nosotros (Mas-Oliva y Delgado-Coello, 2007). Asimismo, distintos grupos han reportado la importancia del ambiente lipídico en la regulación de proteínas de membrana. Por ejemplo, nuestro grupo describió la dependencia de la concentración de colesterol sobre la ATPasa $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ de sarcolema cardíaco (Ortega y Mas-Oliva, 1984; Ortega y Mas-Oliva 1986) y la termoestabilidad que se aprecia en la enzima en presencia de membranas enriquecidas con colesterol (Santiago-García y col., 2000). Es interesante que de alguna forma al variar los contenidos de colesterol membranales de manera artificial, se estaban alterando seguramente dominios tipo balsa lipídica por entonces desconocidos como tales.

TABLA 1

PROPORCIÓN MOLAR COLESTEROL/FOSFOLÍPIDOS Y CORRELACIÓN CON EL ESPESOR DE DISTINTAS MEMBRANAS DE LA CÉLULA

	COL/FL*	COL/FL**	Espesor**
RE	0.15		37.5 Å
Mitocondria	0.1		
Golgi	0.2		39.5 Å
Endosomas	0.5		
MP	1.0	BL 0.42 (0.37) AP 0.52 (0.64)	BL 35.6 Å AP 42.5 Å

* COL/FL: Colesterol/Fosfolípidos. RE: Reticulo endoplásmico; MP: Membrana plasmática. En membranas de mamífero (Van Meer y col., 2008).

** Parámetros determinados en hepatocitos de rata. BL: basolateral; AP: apical o canalicular (Mittra y col., 2004); en paréntesis se muestran los datos de COL/FL reportados por Mazzone y col., 2006.

La consideración del arreglo tridimensional del colesterol embebido en la membrana plasmática sea parte de balsas lipídicas o no, es fundamental. Para comprender la disposición del colesterol en las membranas biológicas debe considerarse que el carácter anfipático de la molécula es determinado por un extremo polar dado por el grupo OH y otro no polar representado por el anillo tetracíclico y la cadena de acilo. La molécula de colesterol en su conformación más favorable energéticamente mide cerca de 20 Å (igual a 2 nm) y podría atravesar una lámina de la bicapa lipídica, considerando que la bicapa mide alrededor de 3 nm. La sección del anillo del colesterol que no posee sustituciones es llamada cara α o lisa, favorable para interacciones tipo van der Waals con las cadenas de acilo de los fosfolípidos. La cara que posee los grupos metilo es la cara β o rugosa que pareciera protruir y que es relevante en interacciones con proteínas de membrana (Chaudhuri y Chattopadhyay, 2011). En membranas con bajo contenido de colesterol se ha encontrado evidencia de que las moléculas de colesterol forman dímeros cola-cola que atraviesan la bicapa. Si el contenido de colesterol se incrementa artificialmente, coexisten zonas con dímeros de colesterol de aproximadamente 34 Å con zonas engrosadas de más de 50 Å en células de músculo liso vascular (Tulenko y col., 1998).

Ahora sabemos que el colesterol tiene más que un papel solo estructural y de modulación de la fluidez y del espesor de la membrana. Por tanto, el origen de la noción de la existencia de dominios específicos en las membranas tales como las balsas lipídicas que ha sido controvertido, involucra un estudio interdisciplinario donde intervienen no solo la biología celular y la bioquímica sino también la biofísica y recientemente los enfoques de análisis de estructura por simulaciones dinámicas.

Cómo se organizan las balsas lipídicas en la membrana

La membrana plasmática del hepatocito está formada por secciones o dominios que se denominan de acuerdo a su ubicación, su composición también es variable, lo cual implica un problema metodológico al intentar purificar fracciones de membrana. La membrana que colinda con los sinusoides se llama sinusoidal, aquella que delimita la unión entre uno y otro hepatocito es la membrana basolateral donde también se encuentra específicamente la membrana canalicular (o apical) en los canaliculos biliares. La membrana canalicular se caracteriza por presentar el doble de contenido de colesterol respecto a los otros dominios que parece tener influencia en el grosor de la bicapa (Tabla 2), y muestra una alta actividad de 5'-nucleotidasa (Evans, 1977). Por otro lado, la membrana sinusoidal y basolateral muestran una alta actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ y de adenilato ciclasa estimulada por glucagon (Evans, 1977; Evans, 1980). Dentro de estas regiones de la membrana plasmática del hepatocito, principalmente en las membranas sinusoidales, pueden existir dominios tipo balsas lipídicas.

De acuerdo al concepto surgido en el Simposio Keystone del año 2006, las balsas lipídicas o balsas membranales son "dominios pequeños de 10-200 nm heterogéneos y dinámicos, ricos en esteroides y esfingolípidos que compartimentalizan procesos celulares". Más relevante aún es la gama de funciones que se atribuyen a las balsas lipídicas: transducción de señales, adhesión y migración celular, transmisión sináptica, organización del citoesqueleto, distribución de proteínas durante los procesos de exo y endocitosis, regulación de la oxidación y detoxificación de drogas, entre otras. Una función adicional que se ha demostrado, es su participación en la internalización de bacterias y virus patógenos (revisado por Riethmüller y col., 2006). Para lograr sus funciones las balsas lipídicas tienen la capacidad de reclutar proteínas importantes, o bien, de excluirlas. En cada balsa lipídica el número de proteínas es variable de acuerdo al caso particular y depende del grado de empaquetamiento por lo que se estima que pueden coexistir un promedio de 60 proteínas (Pralle y col., 2000).

Acerca de los esfingolípidos que coexisten con el colesterol en las balsas lipídicas es importante resaltar que sus propiedades intrínsecas y su alta temperatura de fusión (T_m) explican su tendencia a formar parte de dominios ordenados (Chiantia y London, 2013). La esfingomiélinina es uno de los lípidos de este grupo de mayor abundancia en las membranas de células eucariontes y que forma con el colesterol las balsas lipídicas hacia la lámina externa de la membrana plasmática. Las interacciones entre moléculas de esfingomiélinina y entre éstas y el colesterol estabilizan los dominios en la membrana.

Las proteínas asociadas a balsas lipídicas poseen alguna de las siguientes modificaciones lipídicas co- y post-traduccionales: un glucofosfatidilinositol (GPI) anclado, acilación de cisteínas (S-palmitoilación), adición de moléculas de esteroides en carboxilos terminales, isoprenilación en cisteínas o miristoilaciones del amino terminal (Levental y col., 2010, A). Una generalidad es que la adición de cadenas saturadas de 16 o más carbonos y la adición de esteroides son modificaciones que promueven la formación de balsas (Levental y col., 2010, A). Por lo tanto, las mutaciones en sitios de palmitoilación generan proteínas solubles, incapaces de asociarse a balsas lipídicas (Babuke y Tikkanen, 2007). En particular, las palmitoilaciones que llegan a estar presentes en un 35% de las proteínas asociadas a balsas en vesículas gigantes de membrana plasmática, dependen de una regulación enzimática dinámica (Levental y col., 2010, B).

Un grupo de proteínas asociadas a las balsas lipídicas que no contienen cruces transmembranales y que se usan en la práctica como marcadores balsa-específicos son las flotilinas. Originalmente estas proteínas fueron descritas en células glanglionares de retina de peces durante la regeneración axonal y por ello llamadas "reggies" (Schulte y col., 1997), e independientemente descritas en distintas células de ratón con el nombre de flotilinas por su capacidad de flotación en gradientes de sacarosa (Bickel y col., 1997). Hoy en día, se sabe que las flotilinas son ubicuas y conservadas evolutivamente pero sus funciones específicas aún son materia de estudio. Las flotilinas pertenecen a la familia SPFH

(stomatin/prohibitin/flotillin/ HflK/C) que comparten homologías en el extremo N-terminal y se asocian formando homo o heterotetrámeros mediante motivos repetidos del extremo C-terminal, lo que ha generado la idea de que estas proteínas funcionan como parte del andamiaje de las balsas lipídicas. Las flotilinas poseen modificaciones, por ejemplo, reggie 2 (o flotilina 1) posee una palmitoilación en tanto que reggie 1 (o flotilina 2) presenta además palmitoilaciones y miristoilaciones (Neumann-Giesen y col., 2004) que les confieren diferentes funciones. Dichas modificaciones deben regular la función de las flotilinas en tiempo y espacio y en relación directa con estímulos específicos como podría ser la señalización por insulina o bien, en procesos de endocitosis mediados por estos dominios de membrana (Babuke y Tikkanen, 2007). Algunas investigaciones señalan que las flotilinas pueden jugar un papel relevante en funciones de señalización en células T a través del reclutamiento de proteínas de membrana (revisado por Zhao y col., 2011). Destacan otras funciones de flotilina 1 en procesos de proliferación celular y reclutamiento de proteínas priónicas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas y para flotilina 2, en el proceso de progresión de tumores (Zhao y col., 2011).

Para explicar el funcionamiento de las balsas lipídicas se han sugerido dos posibilidades (Jin, y col., 2011):

- 1) El primer modelo parte de la consideración de que las balsas son pequeñas estructuras en las cuales se concentran proteínas, donde por sus características químicas, la esfingomielina tendría un papel fundamental. La función de la esfingomielina es anclar el colesterol a su molécula de ceramida de forma que permite la asociación lateral entre estos lípidos y por tanto, la conformación de microdominios. El colesterol funciona en este modelo como estabilizador ocupando huecos que se forman entre los esfingolípidos grandes y abundantes. La interacción entre colesterol y esfingomielina explica asimismo, la característica única de las balsas lipídicas dada por su transición hacia fases líquido-ordenadas o gel.

2) Hipótesis de la concha. El modelo alude a que las balsas se originan de conchas de lípidos (colesterol y esfingolípidos) pre-ensambladas a las que se unen proteínas específicas. Las interacciones proteína-proteína y proteína-lípido producen unidades funcionales dinámicas de mayor tamaño que son las balsas lipídicas, que pueden ser estabilizadas por oligomerización de las mismas proteínas.

Relevancia de las balsas lipídicas en el tejido hepático

Los dominios de membrana tipo balsa lipídica tienen relevancia no sólo en la fisiología normal de las células al intervenir activamente en la señalización celular, sino en procesos patológicos en distintos tejidos. Una revisión extensa del papel de estos dominios como mediadores de señales redox en distintos eventos fisiológicos es recomendada a los lectores (Jin, y col., 2011).

En el contexto del tejido hepático las balsas lipídicas tienen un papel preponderante en la amplia gama de funciones que realiza el hígado. Estos dominios están presentes en todos los tipos celulares que componen el hígado, es decir, en hepatocitos, en células no parenquimatosas e incluso en aquellas células no residentes que intervienen en procesos de inflamación y daño hepático (Dolganiuc, 2011). La evidencia experimental con base en un análisis subproteómico realizado en hígado de rata, muestra que de cerca de 200 proteínas identificadas, el 32% se asocian a balsas lipídicas (Bae y col., 2004). Destacan proteínas de membrana que convencionalmente se han usado como marcadores de estos dominios, entre ellas la 5'-nucleotidasa, o la ATPasa Na^+/K^+ . También se encuentran asociadas a estos dominios el receptor de asialoglucoproteínas, la ATP sintasa α y β , un componente del receptor de progesterona asociado a la membrana plasmática, el receptor olfatorio y el canal aniónico dependiente de voltaje tipo 1 (Bae y col., 2004). En hepatocitos de ratón se ha corroborado mediante análisis

cromatográfico que alrededor del 50% de las proteínas de membrana se asocian a balsas lipídicas (Atshaves y col., 2007). Asimismo, se ha descrito la existencia de proteínas como el receptor pepenador 1 de la clase B (SRB1, por scavenger receptor B1), de la proteína acarreadora de esteroides 2 (SCP-2), el transportador ABCA1, y la glicoproteína P (P-gp) asociadas a las balsas lipídicas (Atshaves y col., 2007). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la existencia de la ATPasa de calcio de membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en Inglés) en balsas lipídicas (Fig. 2), así como una estrecha dependencia de la actividad de la misma con el contenido de colesterol en la membrana (Delgado-Coello y col., publicación en prensa).

Se conocen proteínas en el hígado que sin estar necesariamente ubicadas dentro de la balsa lipídica, se relacionan con éstas al ser parte de vías de señalización en que participan receptores como el del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o c-Met), del factor de crecimiento epidermal o el de insulina, entre otros.

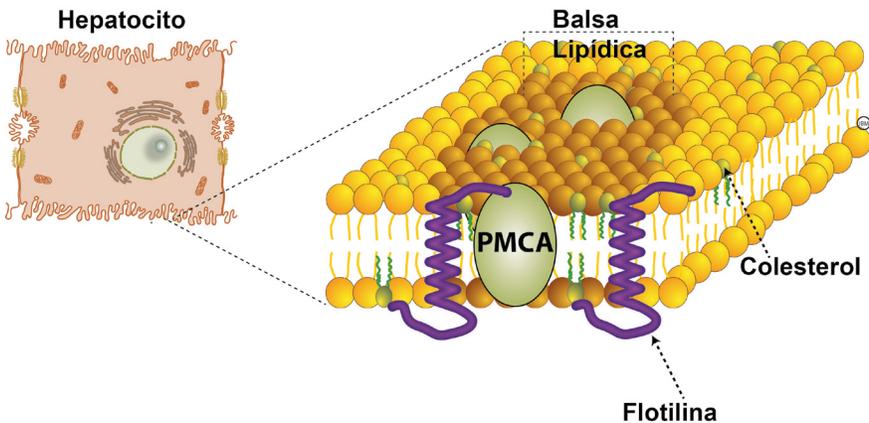


Figura 2. Esquema de la estructura de balsas lipídicas en el hepatocito que es delimitada por el alto contenido de colesterol y esfingolípidos y proteínas marcadoras como la flotilina que poseen modificaciones como palmitoilaciones y miristoilaciones que les permiten anclarse a la membrana, se muestra la coexistencia con la ATPasa de Ca^{2+} membrana plasmática (PMCA) demostrada por nuestro grupo.

Dentro del grupo de las balsas lipídicas se encuentran las caveolas que forman invaginaciones en la membrana, son ricas en colesterol y esfingomielina, aunque también contienen ceramidas, diacilglicerol, y fosfatidilinositol bifosfato. Como rasgo característico, las caveolas poseen proteínas que se interconectan llamadas caveolinas de las que se conocen tres isoformas y en un número de entre 16 y 18 monómeros forman parte de la caveola. Las caveolinas se usan como marcadores típicos de estos dominios. Las caveolas además contienen dinamina que participa en los mecanismos de internalización mediados por invaginaciones caveolares (Fielding y Fielding, 2000).

En el tejido hepático se reconocen dos fracciones correspondientes a dominios ricos en caveolinas; una soluble en Tritón X-100 aparentemente asociada constitutivamente al citoesqueleto y otra insoluble que se obtiene en las fracciones ligeras de un gradiente de densidad (Balbis y col., 2004). Las caveolas desempeñan funciones en el transporte mediado por endo o exocitosis, en el control de la homeostasis de colesterol y en la transducción de señales del metabolismo de lípidos. Una función específica de las caveolas en hígado se relaciona con la señalización de insulina donde interviene la cinasa del receptor a insulina (Balbis y col., 2004). Durante la regeneración hepática distintos trabajos sugieren un papel para las caveolas y la caveolina 1 principalmente, en la regulación de la proliferación celular y lipogénesis (Delgado-Coello y col., 2011).

Aspectos teóricos a considerar para el aislamiento de balsas lipídicas

Considerando que las balsas lipídicas representan dominios dinámicos en que los esfingolípidos y glucoesfingolípidos tienden a disponerse del lado exterior de la bicapa lipídica (exoplásmica) en tanto fosfolípidos y colesterol lo hacen hacia el lado interno de la membrana, se entiende que ocurre una especie de interdigitación entre los lípidos de

ambas capas. Dicha interconexión se estabiliza además por las proteínas que atraviesan la membrana, ambos procesos permiten entender la resistencia que por definición muestran estos dominios altamente empaquetados y con una estructura líquido-ordenada, al tratamiento con detergentes no iónicos. Experimentalmente, es necesario solubilizar las membranas con algún detergente y después separar las fracciones de baja densidad resistentes a este tratamiento (DRM, por sus siglas en Inglés) dentro de un gradiente de sacarosa por centrifugación a gran velocidad y duración para lograr el equilibrio de los distintos dominios membranales como se describe en las recomendaciones en la sección final de este capítulo (Fig. 3).

Históricamente ha habido escepticismo y debate entre distintos puntos de vista cuestionando la existencia real de estos dominios. Algunas razones de la controversia son entre otras: el carácter dinámico de las balsas lipídicas que pueden existir en el lapso de mili o nanosegundos; su tamaño de nanómetros a micrómetros, el cual representa un reto a los límites de detección de distintas tecnologías disponibles. Una razón más para diferir ha sido el hecho de que gran parte de los conceptos asociados a las membranas biológicas se han descrito con base en membranas modelo. Otras variables de interés son el uso de determinados detergentes no iónicos y la temperatura de aislamiento de las balsas lipídicas. Un trabajo que aborda la relevancia del uso de diferentes detergentes para aislar balsas lipídicas, se enfocó en el estudio de un transportador de serotonina que se asocia a este tipo de dominios (Magnani y col., 2004). El transportador es totalmente soluble en Tritón X-100 y en un detergente similar a éste, el Nonidet P-40, por lo que no se encontró en las fracciones ligeras después de centrifugación del gradiente; pero solo es un 40% soluble en Brij 58, en Tween-80 y en Tween-20 (Magnani y col., 2004). El análisis de la composición general de lípidos de membranas aisladas con Tritón X-100 o con Brij 58 mostró que el contenido de colesterol es similar pero el de fosfolípidos fue 10 veces mayor en el caso de las fracciones obtenidas con Brij 58 (Magnani y col., 2004). Ahora se sabe que el Tritón X-100 a través del ordenamiento de fase de los lípidos mientras se inserta en la bicapa logra el aislamiento

de los dominios insolubles a los cuales tiene tendencia a fusionar. Este detergente aparentemente solubiliza preferentemente lípidos de la capa externa de la bicapa, por el contrario a como actúan los detergentes Brij que presentan una cola hidrofóbica de mayor longitud que le permite atravesar la membrana (Morris y col., 2011).

A pesar de que los métodos más comunes para aislar balsas lipídicas involucran el uso de detergentes, es precisamente éste uno de los factores que se relacionan con la posibilidad de que las balsas lipídicas se obtengan de manera artefactual. Por ello se han propuesto métodos donde el uso de detergentes es sustituido por reactivos como el carbonato de sodio en combinación con gradientes de sacarosa (Song y col., 1996); o el uso de amortiguadores con calcio y magnesio sin EDTA (quelante de calcio) para la lisis celular y el uso de gradientes lineales de OptiPrep (Macdonald y Pike, 2005). El Optiprep es una solución de iodixanol que es osmóticamente inerte por lo cual no se afectan las membranas (Shah y Sehgal, 2007). Alternativamente, es factible después de realizar gradientes de sacarosa, incubar las fracciones correspondientes a membrana plasmática con anticuerpos específicos para marcadores de balsas lipídicas y mediante perlas magnéticas de proteína-A recuperar los dominios purificados (Shah y Sehgal, 2007).

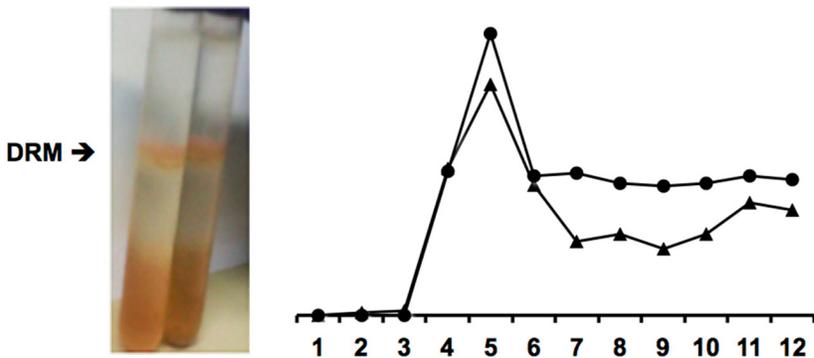


Figura 3. Membranas de hígado total resistentes a la solubilización con Tritón X-100. Izquierda: Gradiente discontinuo de sacarosa (40%-38%-5%) de membranas solubilizadas y ajustadas a una concentración final de sacarosa al 40% después de 18 horas de centrifugación. Derecha: Perfil típico de proteínas (●) y colesterol (▲) del gradiente donde se muestra el enriquecimiento de algunas fracciones correspondientes a las membranas resistentes a detergentes (DRM) o balsas lipídicas.

Por otra parte, una variable importante es la dificultad aparente para aislar las balsas lipídicas a la temperatura fisiológica que ha generado críticas pues típicamente estos dominios se obtienen por centrifugación a 4°C. Debemos tener en mente que a 37°C los lípidos adoptan una conformación desordenada y que ésta tiende a ordenarse mientras la temperatura disminuye. La composición del amortiguador usado tiene gran influencia en el proceso de aislamiento, pues en presencia de iones de Mg⁺, K⁺ y EGTA como quelante que regule la concentración de calcio, es posible la obtención de balsas lipídicas a 37°C en 30 horas (Chen y col., 2009). En un trabajo posterior se muestra un método mejorado donde a 37°C y en combinación con métodos de inmunopurificación, se logró el aislamiento en solo una hora de las balsas lipídicas sin necesidad de centrifugar la preparación y evitando la fusión de vesículas de membrana durante el proceso (Morris y col., 2011). Otra variante experimental utiliza el entrecruzamiento del 3,3'ditiobis (sulfosuccinimidilpropionato) – o DTSSP– con los grupos amino de las proteínas de membrana, con lo cual es posible encontrar en fracciones de los gradientes de densidad a proteínas marcadoras de balsas como podrían ser caveolina-1 y el receptor Fas (FasR) sin importar si su unión en el dominio lipídico es débil o fuerte. Los autores incluyen un paso de incubación a -80°C del solubilizado membranal durante toda la noche, que favorece que proteínas como FasR cuya interacción con la balsa lipídica es débil, presenten una alta afinidad y por lo tanto se retenga en la fracción enriquecida del gradiente (George y col., 2010).

Nuevos enfoques para el estudio de las balsas lipídicas

Uno de los principales temas de controversia en relación a la existencia de las balsas lipídicas es que debido a su carácter dinámico y sus dimensiones, es difícil visualizarlas y darles seguimiento en el tiempo (Sonnino y Prinetti, 2013). La microscopía confocal con la valiosa ayuda de sondas fluorescentes ha sido de gran utilidad, pero metodologías como la microscopía de fluorescencia por reflexión interna total (TIRFM

por sus siglas en Inglés) cuya ventaja radica en que se explora un área superficial cercana al fondo del plato donde se observan las células o su versión mejorada, la microscopía LG-TIRFM (lightguide TIRFM), permiten aumentar la resolución (Asanov y col., 2010). La microscopía LG-TIRFM usa como guía de luz el propio cubreobjetos y dado que la luz de excitación no interfiere con la de emisión se reduce la señal de fondo optimizando la observación a nivel muy cercano a la membrana plasmática de las células. Básicamente, la microscopía LG-TIRFM permite una resolución de 30-100 nm, esto significa hasta diez veces por encima del alcance de la microscopía confocal (Asanov y col., 2010).

Una metodología alternativa permite estudiar fluctuaciones en el colesterol de membrana en tiempo real y de manera no invasiva, con la ayuda de un analizador de células (RTCA, por real-time cell analyzing) basado en la detección de impedancia celular. La impedancia mide la resistencia eléctrica de la membrana de manera que este parámetro refleja propiedades físicas de la membrana como su composición, forma y localización. La medición de impedancia en células expuestas a reactivos que cambian la concentración de colesterol como el metil-beta ciclodextrina, permite analizar cambios de fluidez de la membrana (Spörl y col., 2010). Esta metodología requiere de otras herramientas tales como marcadores fluorescentes que ayudan a la localización del colesterol en la membrana.

La metodología basada en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) tiene el potencial para detectar dominios lipídicos en el orden de nanómetros y en combinación con la microscopía de imagen de fluorescencia (FLIM, por fluorescence lifetime imaging microscopy) que resuelve eventos que ocurren en nanosegundos, forman la técnica FLIM-FRET (Stöckl y col., 2010). Dicha técnica permite la detección de dominios lipídicos aislados o coexistentes en la membrana.

Otras técnicas para visualizar las balsas lipídicas se basan en el seguimiento por microscopía de fluoróforos (SFTM, single fluorophore tracking microscopy) o partículas únicas (SPFT, single particle

fluorophore tracking) que permiten el rastreo dinámico de la marca fluorescente unida a una molécula blanco (Lagerholm y col., 2005). El surgimiento de la llamada microscopía de depleción de emisión estimulada (STED, stimulated emission depletion) o “nanoscopía”, como su nombre lo indica permite el seguimiento de la difusión de moléculas únicas de una sonda fluorescente en nano-escala.

Acerca de metodologías novedosas no para visualizar estos dominios, sino para su caracterización química, recientemente hemos demostrado la utilidad de la espectrometría Raman en este contexto (Delgado-Coello y col., publicación en prensa). Dicha metodología tiene las ventajas de ser una poderosa técnica no invasiva, que requiere pequeños volúmenes de muestra y sin pre-tratamiento alguno.

En el futuro cercano, sin duda nuevas metodologías permitirán visualizar en tiempo real y disipar muchas de las dudas respecto a la existencia de las balsas lipídicas en las células.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Jaime Mas Oliva la revisión de este capítulo. A Jorge Bravo Martínez por la elaboración de dibujos originales de este capítulo.

Referencias

Asanov A, Zepeda A, Vaca L. (2010). A novel form of total internal fluorescent microscopy (LG-TIRFM) reveals different and independent lipid raft domains in living cells. *Biochim Biophys Acta* **1801**:147-155.

- Atshaves BP, McIntosh AL, Payne HR, Gallegos AM, Landrock K, et al. (2007). SCP-2/SCP-x gene ablation alters lipid raft domains in primary cultured mouse hepatocytes. *J Lipid Res* **48**:2193-2211.
- Babuke T, Tikkanen R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotilin proteins. *Eur JCell Biol* **86**:525-532.
- Bae TJ, Kim MS, Kim JW, Kim BW, Choo HJ, et al. (2004). Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics* **4**:3536-3548.
- Balbis A, Baquiran G, Mounier C, Posner BI. (2004). Effect of insulin in caveolin-enriched domains in rat liver. *J Biol Chem* **279**:39348-39357.
- Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* **272**:13793-13802.
- Chaudhuri A, Chattopadhyay A. (2011). Transbilayer organization of membrane cholesterol at low concentrations: implications in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1808**:19-25.
- Chen X, Jen A, Warley A, Lawrence MJ, Quinn PJ, Morris RJ. (2009). Isolation at physiological temperature of detergent-resistant membranes with properties expected of lipid rafts: the influence of buffer composition. *Biochem J* **417**:525-533.
- Chiantia S, London E. (2013). Sphingolipids and membrane domains: recent advances. *Handb Exp Pharmacol* **215**:33-55.
- Delgado-Coello B, Briones-Orta MA, Macías-Silva M, Mas-Oliva J. (2011). Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver Int* **31**:1271-1284.

- Delgado-Coello B, Montalvan-Sorrososa D, Cruz-Rangel A, Sosa-Garrocho M, Hernández-Téllez B, Macías-Silva M, Castillo R, Mas-Oliva J. Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy of lipid-rafts from hepatocyte plasma membranes. *J Raman Spectrosc.* En prensa.
- Dolganiuc A. (2011). Role of lipid rafts in liver health and disease. *World J Gastroenterol* **17**:2520-2535.
- Evans WH. (1977). Resolving biochemically the hepatocyte's multifunctional pericellular membrane. *Trends Biochem Sci* **2**:169-171.
- Evans WH. (1980). A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta* **604**:27-64.
- George KS, Wu Q, Wu S. (2010). Effects of freezing and protein cross-linker on isolating membrane raft-associated proteins. *Biotechniques* **49**:837-838.
- Jin S, Zhou F, Kairai F, Li P-L. (2011). Lipid rafts redox signalling: molecular mechanisms in health and disease. *Antioxid Redox Signal* **15**:1043-1083.
- Klymchenko AS, Kreder R. (2014). Fluorescent probes for lipid rafts: from model membranes to living cells. *Chem Biol* **21**:97-113.
- Lagerholm BC, Weinreb GE, Jacobson K, Thompson NL. (2005). Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem* **56**:309-336.
- Levental I, Michael G, Simons, K. (2010, A). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* **49**:6305-6316.

- Levental I, Lingwood D, Grzybek M, et al. (2010, B). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:22050-22054.
- Macdonald JL, Pike LJ. (2005). A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res* **46**:1061-1067.
- Mas-Oliva J, Delgado-Coello B. (2007). Protein stability and the evolution of the cell membrane. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. **146**:207-213.
- Mitra K, Ubarretxena-Belandia I, Taguchi T, Warren G, Engelman DM. (2004). Modulation of the bilayer of exocytotic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* **101**:4083-4088.
- Morris RJ, Jen A, Warley A. (2011). Isolation of nano-meso scale detergent resistant membrane that has properties expected of lipid 'rafts'. *J Neurochem* **116**:671-677.
- Neumann-Giesen C, Falkenbach B, Beicht P, Claasen S, Lüers G, et al. (2004). Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of mirystoilation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. *Biochem J* **378**:509-518.
- Nicolson GL. (2014). The fluid-mosaic model of membrane structure: still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta* **1838**:1451-1466.
- Ortega A, Mas-Oliva J. (1984). Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca²⁺Mg²⁺)-ATPase from cardiac muscle. *Biochim Biophys Acta* **773**:231:236.

- Ortega A, Mas-Oliva J. (1986). Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulates calcium pump of cardiac sarcolemma. *Biochem Biophys Res Commun* **139**:868-874.
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Hörber JK. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**:997-1008.
- Riethmüller J, Riehle A, Grassmé H, Gulbins E. (2006). Membrane rafts in host-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta* **1758**:2139-2147.
- Santiago-García, Delgado-Coello B, Mas-Oliva J. (2000). Thermal analysis of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase. *Mol Cell Biochem* **209**:105-112.
- Schulte T, Paschke KA, Laessing U, Lottspeich F, Stuermer CA. (1997). Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development* **124**:577-587.
- Shah MB, Sehgal PB. Chapter 3: Nondetergent isolation of rafts. En: *Methods in Molecular Biology. Lipid rafts*. McIntosh TJ (ed). Humana Press, Inc. USA. 2007, pp 21-28.
- Simons K, Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
- Song KS, Li S, Okamoto T, Li S, Chafel M, et al. (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. *J Biol Chem* **271**:9690-9697.
- Sonnino S, Prinetti A. (2013). Membrane domains and the “lipid raft” concept. *Curr Med Chem* **20**:4-21

- Spörl F, Wunderskirchner M, Ullrich O, Bömke G, Breitenbach U, et al. (2010). Real-time monitoring of membrane cholesterol reveals new insights into epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* **130**:1268-1278.
- Stockl MT, Herrmann A. (2010). Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1798**:1444-1456.
- Tulenko TN, Chen M, Mason PE, Mason RP. (1998). Physical effects of cholesterol on arterial smooth muscle membranes: evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherogenesis. *J Lipid Res* **39**:947-956.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:112-124.
- Zhao F, Zhang J, Li L, He Y-L. (2011). Research advances on flotillins. *Virology* **438**:479.

Recomendaciones Experimentales

Recomendaciones para el uso adecuado de ultracentrífugas

1. Verificar el tipo de ultracentrífuga en la calcomanía adherida al equipo ("A" a "T", para las centrífugas Beckman) y si es compatible con el rotor que se usará.
2. Existen centrífugas de baja velocidad (Sorvall) cuyo rotores cierran en sentido contrario a las manecillas del reloj. Además estos rotores cuentan con un seguro adicional que debe cerrarse siempre en el mismo sentido.
3. Equilibrar los tubos perfectamente, pesando en balanza. No olvidar pesar con las camisas correspondientes y considerar que la densidad de los tubos sea similar.
4. Revisar que los tubos que se usen aunque sean adecuados para el rotor, permitan usar la velocidad requerida, los hay de distintos materiales y resistencias.
5. Seguir las recomendaciones en relación al volumen mínimo y máximo que pueden contener los tubos.
6. Revisar que los tapas de los tubos tengan SIEMPRE el empaque correspondiente, NO improvisar con otros materiales.
7. Mantener permanentemente la lubricación de empaques de los rotores, pues de lo contrario se tornan quebradizos y pueden ocasionar algún accidente. No usar los rotores al límite de su velocidad.

8. Reemplazar los discos (speed-disk) cuando sea requerido, verificar que es el adecuado para el rotor.
9. Mantener la limpieza de los rotores y cámaras de las centrifugas pues así se evita la contaminación biológica y el deterioro de los mismos.

Referencias

Manual de centrifugas Beckman.

Procedimiento para aislar balsas lipídicas de hepatocitos de rata

1. Usar ratas macho de aproximadamente 200 g, anestesiar y sacrificar usando cloroformo.
2. Rápidamente proceder a canular el hígado y realizar una perfusión del órgano para exanguinar lo mejor posible a través de la vena porta. Para ello usar una solución Krebs-Ringer (NaCl 120 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM y NaHCO₃ 24 mM), previamente gaseada con O₂/CO₂ (95%/5%) y mantenida 37°C. Observar cómo se aclara el tejido rápidamente mientras perfunde la solución.
3. Cortar hígado con tijeras en frío y en presencia de Tris 10 mM/ sacarosa 0.32 M más inhibidores de proteasas (ver Tabla I).

4. Homogenizar en Ultraturrax usando 10 ml de Tris 10 mM/ sacarosa 0.32M por gramo de tejido agregando inhibidores de proteasas (ver Tabla I), centrifugar a 1,000 x g/10 min y descartar la pastilla. En el rotor SS-34 considerando $r_{\max} = 4.25'' = 107.95 \text{ mm}$, equivale a 2,876 rpm/10 min. 0.3027g Tris)+ 27.38g (sacarosa)/250 ml.
5. Centrifugar sobrenadante a 31,000 x g/30 min. En rotor 70Ti ($r_{\max} = 91.9 \text{ mm}$) equivale a 17,354 rpm.
6. Resuspender pastilla en 3 ml de Tris 10 mM e incubar 25 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar nuevamente a 31,000 x g/30 min. Recuperar pastilla en Tris 10 mM (1.5 ml/g de peso húmedo) con homogenización suave. Guardar a -70°C para aislamiento posterior de balsas.
8. Centrifugar a 31,000 x g/10 min. Solubilizar pastillas en 3 ml de buffer TKM + Tritón 1% en agitación suave a 4°C/1 hr. Centrifugar a 10,000 rpm/10' y recuperar sobrenadante.
9. Ajustar membranas a una densidad de 40% con sacarosa con ayuda de un refractómetro. Dependiendo del volumen obtenido, colocar 500 μl + 6 ml de sacarosa al 38% + 4.5 ml de sacarosa al 5% ó 4 ml de homogenado en el fondo del tubo para rotor SW40 + 4 ml de sacarosa al 38% + 4 ml de sacarosa al 5%.
10. Centrifugar a 135,000 x g/18h = 27,550 rpm para rotor SW40.
11. Colectar fracciones de 1 ml de arriba hacia abajo, resuspender pastilla en PBS frío y congelar muestras (ver Fig. 3 de este capítulo).

12. Se recomienda hacer el análisis de las fracciones (mediciones de lípidos, proteínas, ensayos tipo Western blot, etc.) lo más pronto posible pues si se guardan por tiempo prolongado, las muestras tienden a degradarse.

TABLA 1

CONCENTRACIONES DE INHIBIDORES DE PROTEASAS PARA AISLAMIENTO DE BALSAS LIPIDICAS

Inhibidor de proteasas	[stock]	[final] (Roche)
E-64 (irreversible) Cys proteasas	3 mg/ml (agua/EtOH 1:1)	0.5-10 µg/ml, usar 5µg/ml (1:300)
Leupeptina (irreversible) Ser/Cys proteasas	0.5mg/ml (agua)	0.5 µg/ml (1:1000)
Aprotinina (reversible) Ser proteasas	0.5 mg/ml (agua)	0.06- 2.0 µg/ml (1:250)
Antipaina (reversible) > sp que Leupeptina	3mg/ml (agua)	50 µg/ml (1:60)
Papaina, tripsina, catepsinas A/B		
Pepstatina (reversible) Asp proteasas	0.5 mg/3ml (MetOH) 166.66 µg/ml	0.7 µg/ml (1:238)

Referencias

Balbis A, Baquiran G, Mounier C, et al. (2004). Effect of insulin in caveolin-enriched domains in rat liver. *J Biol Chem* **279**:39348-39357.

Gebreselassie D, Bowen WD. (2004). Sigma-2 receptors are specifically localized to lipid rafts in rat liver membranes. *Eur J Pharmacol* **493**:19-28.

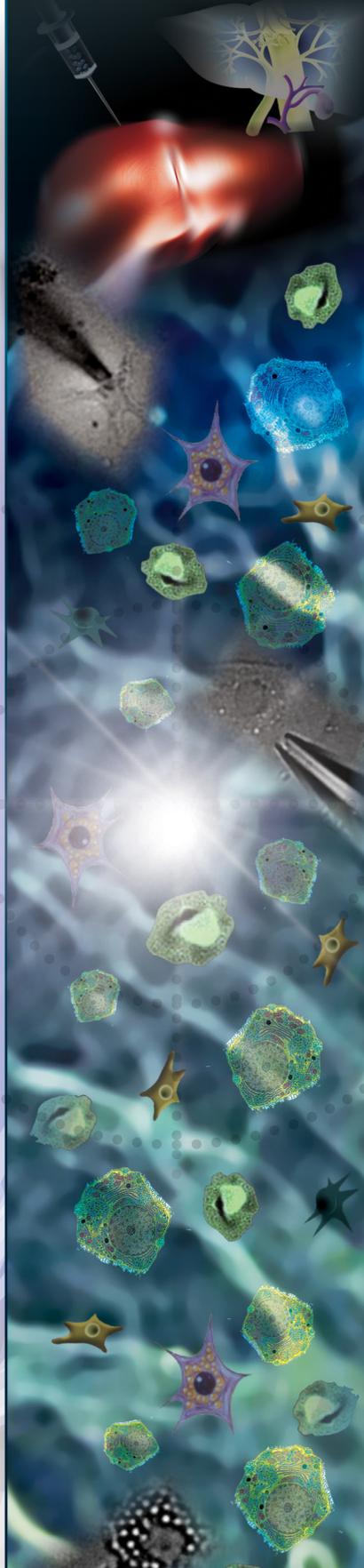


CAPÍTULO 05

Ingeniería de tejidos

Blanca Alicia Delgado Coello

INICIO / CONTENIDO



Los inicios de la ingeniería de tejidos

En el ambiente clínico, una problemática generalizada es la carencia de un número suficiente de donadores de órganos y la creciente demanda de pacientes que lo requieren. En los Estados Unidos, la lista de espera por un trasplante de hígado es de aproximadamente 15,000 pacientes (Organ Procurement and Transplantation Network). En nuestro país, de acuerdo a datos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y del Servicio de Trasplantes del Hospital General de México, cada año 300 y 1000 pacientes, respectivamente, requieren de un trasplante hepático. Las patologías más frecuentes en adultos asociadas a la necesidad imperiosa de un trasplante de hígado son la cirrosis/hepatitis C, colestasis hepática, cirrosis alcohólica y hepatocarcinomas. En México, la Fundación Nacional para la Salud Hepática (FubdHepa) reporta estas patologías además de la insuficiencia hepática, como las más frecuentes que demandan de un trasplante. En niños, un 60% las patologías más graves que requieren de un trasplante se asocian con colestasis y atresia de vías biliares, seguidas de hepatitis agudas con un 15% y enfermedades metabólicas con alrededor del 10% de los casos y con menos frecuencia el síndrome de Alagille (Varela-Fascinetto y col., 2005; Mazariegos y col., 2014). Aunque menos frecuentes, las enfermedades innatas del metabolismo son relevantes por sus graves implicaciones fisiológicas (Mazariegos y col., 2014).

El primer trasplante de hígado realizado en humano en 1963 por el médico Thomas Starzl no resultó exitoso, pero sentó las bases para en 1967 lograr finalmente la sobrevivencia de los pacientes trasplantados. En la actualidad, una alternativa que no es exenta de riesgos para el donador y el receptor del órgano, es el trasplante de hígado de donadores vivos iniciado a fines de los ochentas. En México el primer trasplante exitoso de este tipo se llevó a cabo en el año 2001 y en 2014 se logró un trasplante dominó (aquel que de un donador cadavérico se trasplanta a dos receptores). El procedimiento de trasplante involucra estrictos requisitos de selección tanto para el donador como el receptor

así como aspectos éticos a resolver. Las alternativas que surgen desde la perspectiva de la investigación básica y eventualmente aplicada, es el trasplante de hepatocitos y la ingeniería de tejidos cuyo objetivo es la reconstrucción *in vitro* de tejidos útiles para trasplante. La ingeniería de tejidos tuvo sus inicios entre las décadas 50's y 60's, cuando se enfocó básicamente en el estudio de tejidos relativamente sencillos como piel, hueso y tejido epitelial de arterias, con amplia aplicación en el caso de pacientes con quemaduras graves, entre otras.

Como ya se ha revisado, el tejido hepático reviste gran complejidad debido que es un órgano tridimensional con vasculatura abundante y formado por varios tipos celulares interdependientes, ello explica que la ingeniería de tejidos para este órgano es más reciente. Las bondades del hígado como un órgano capaz de cambiar su estado quiescente a uno proliferativo bajo ciertos estímulos (Capítulo 3) y por tanto, de recuperar su masa original (hiperplasia compensatoria) es de interés en el contexto de la ingeniería de tejidos. En este capítulo revisaremos brevemente algunos aspectos interesantes de este fascinante enfoque y su evolución en el caso particular del tejido hepático que a su vez recapitula gran parte de las técnicas revisadas en los capítulos previos (Fig. 1).

En el tejido hepático la matriz extracelular (MEC) es fundamental tanto para su funcionamiento como para su organización, lo cual complica el trabajo con hepatocitos obtenidos de cualquier modelo animal (cultivos primarios). Tales retos se han resuelto colocando en las placas de cultivo una capa de colágena tipo I que funciona como sustrato. Otros retos son la tendencia de los hepatocitos a desdiferenciarse y la dificultad para replicarse *in vitro* por lo que deben usarse mitógenos llamados completos como el factor de crecimiento epidermal -EGF- y factores como el dimetil sulfato de sodio para la inducción de enzimas relevantes en el metabolismo xenobiótico. La gran diversidad de factores que afectan los cultivos primarios de hepatocitos, las estrategias disponibles para evitar su desdiferenciación sea por adición de factores que promueven la diferenciación o a través de la

modulación de mecanismos epigenéticos, es revisada ampliamente en el volumen editado por Vinken y Rogiers (Vinken y Rogiers, 2015).

Algunos marcadores que deben analizarse para comprobar la funcionalidad de los hepatocitos *in vitro* son la producción y liberación al medio de albúmina, antitripsina α -1, transferrina, urea, captura de lipoproteínas, entre otros. Como alternativa para estudios de investigación básica es común el uso de células tumorales establecidas para cultivo como las líneas HepG2 y HepaRG (humanas) sin embargo, por su origen el comportamiento de estas células es distinto y por lo tanto, no equiparable al de hepatocitos normales. Hoy en día se cuenta con la línea C9 obtenida de rata, que conserva el fenotipo de hepatocitos que representa una opción para realizar estudios que requieren de transfección de las células.

Sistemas disponibles de soporte hepático

Después de varias décadas de investigación se ha logrado el diseño de dispositivos auxiliares o extracorpóreos de tipo artificial y bioartificial, cuyo objetivo es remplazar de manera temporal las funciones hepáticas de pacientes con fallas hepáticas agudas o en etapas críticas terminales que se encuentran en espera de un trasplante.

Los sistemas de soporte hepático artificial sólo son capaces de realizar funciones de detoxificación, es decir, remueven sustancias dañinas para el hígado y otros órganos como bilirrubina, ácidos biliares y toxinas (por ejemplo por ingesta de hongos que dañan al hígado). Dentro de estos dispositivos los más comunes son el MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System) que a través de dos circuitos, uno que filtra la sangre del paciente y otro que usa albúmina como molécula aceptora de toxinas que se unen a ella, puede remover moléculas hidrosolubles y liposolubles; y el sistema Prometeo (Plasma Separation Adsorption and Dialysis System) que funciona de manera análoga a las

diálisis para tratamiento de pacientes con daño renal (Struecker y col., 2014; Lee y col., 2015). Otros dispositivos de esta categoría son el SPAD (Single-pass albumin dialysis), el Hepa-Wash y el SEPET (Selective Plasma Filtration Therapy).

Por otra parte, los dispositivos bioartificiales incorporan biorreactores donde se mantienen hepatocitos viables y por lo tanto, estos sistemas realizan las funciones de detoxificación y las funciones metabólicas básicas del hígado (Struecker y col., 2014; Lee y col., 2015). El HepatAssist™, es uno de los dispositivos patentados más usado, utiliza hepatocitos de cerdo preservados en congelación en un cartucho de diálisis modificado donde pasa el plasma ultrafiltrado mediante carbón activado como adsorbente y un oxigenador. El dispositivo ELAD® emplea células de la línea de C3A (hepatoblastoma), otros sistemas aún en evaluación son el AMC-BAL (Academic Medisch Centrum Bioartificial Liver) y el MELS (Modular Extracorporeal Liver Support). Algunas limitantes de los sistemas bioartificiales son la carencia de cantidades suficientes de células humanas activas y capaces de proliferar, la biocompatibilidad de hepatocitos de otras especies con el humano, y una limitante técnica que consiste en bajas velocidades de perfusión en comparación con la perfusión *in vivo*. A continuación se describen las alternativas para subsanar estas deficiencias las cuales se enfocan en el trasplante de hepatocitos y distintas técnicas de ingeniería de tejidos.

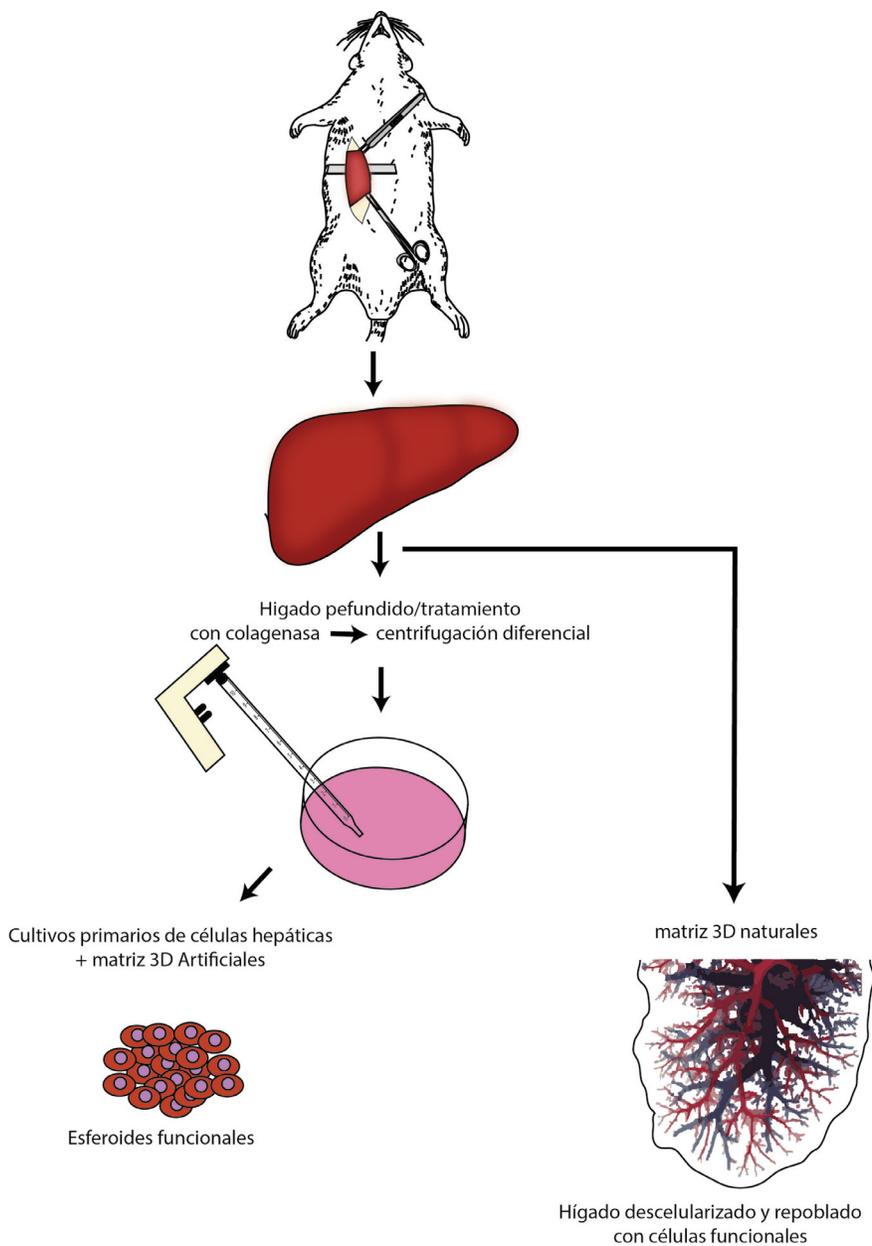


Figura 1. La ingeniería de tejidos involucra varias metodologías básicas para generar estructuras tridimensionales biocompatibles con aplicaciones en el campo de la medicina contribuyendo al trasplante de hígado de donadores vivos.

El trasplante de hepatocitos y la búsqueda del mejor andamio para crecimiento de células

La ingeniería de tejidos propiamente dicha, considera los siguientes componentes: 1) Células del tejido a desarrollar; 2) Células interactivas, por ejemplo, fibroblastos de la dermis en piel o células de músculo liso en vasos sanguíneos; 3) Un andamio biodegradable que soporte a la estructura como pueden ser los ácidos poliglicólico y poliláctico y fosfato de calcio; 4) El sustrato como la colágena para tejidos suaves o como material para recubrir el andamio con objeto de aumentar la adhesión celular y 5) El estrés mecánico al que se ven sometidos los distintos tipos de tejido. En esta sección se resume un panorama de la evolución de las técnicas pioneras para dar lugar a los enfoques más vanguardistas de la ingeniería de tejidos.

A fines de los años setentas, una vez relativamente resuelto el problema de cultivar hepatocitos primarios, surgió una opción terapéutica para resolver el daño y algunos errores innatos del metabolismo hepático: el trasplante de hepatocitos. Este método es menos invasivo y menos costoso que un trasplante de hígado, aunque no es recomendado en casos de daño hepático agudo. La vía óptima para trasplante de hepatocitos es el propio hígado a través de la vena porta si su arquitectura no está alterada; o en su defecto pueden trasplantarse preferentemente a través del bazo, o por vía intraperitoneal (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 2010). La cantidad estimada de hepatocitos a trasplantar para prevenir encefalopatía hepática es de 1-2% de la masa hepática en rata, y de 1-5% (equivalente a $1.8-8.8 \times 10^9$ hepatocitos) en el hombre ó $1-2 \times 10^8$ hepatocitos por kilogramo (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 2010; Soltys y col., 2010). Algunas de las limitantes en el empleo de esta metodología son que los hepatocitos al obtenerse de pequeños fragmentos de hígado sobrantes de trasplantes realizados en niños, son escasos. Los hepatocitos pueden extraerse de donadores cadavéricos pero no existe garantía de su utilidad, especialmente en caso de antecedentes de complicaciones biliares y/o vasculares, además del corto período *post mortem* que precede a la lisis del órgano. Alternativamente aunque con menor eficiencia, los

hepatocitos a trasplantar pueden criopreservarse y encapsularse en perlas acarreadoras (bioencapsulación) que incluyen factores, sustratos o incluso otros tipos celulares con el objeto de mantener el fenotipo y viabilidad de los hepatocitos. Además de hepatocitos primarios, también pueden trasplantarse bajo ciertas circunstancias, hepatocitos inmortalizados o reversiblemente inmortalizados.

Desde inicios de la década de los ochenta la posibilidad de usar células troncales pluripotenciales obtenidas de células troncales obtenidas de embriones, se vislumbró como una alternativa factible para aumentar la disponibilidad de células para trasplante. Las cuestiones éticas involucradas en dicha metodología dado que implica la destrucción de embriones, fueron motivación para buscar fuentes alternas. De esta manera se desarrolló la producción de células troncales pluripotenciales inducidas (iPSCs, por sus siglas en inglés) a partir de distintos linajes celulares.

En el hígado se han descrito las células ovas que representan las células troncales intrahepáticas y que al parecer tendrían relevancia en procesos de regeneración hepática en donde el daño compromete a los mismos hepatocitos. Existen también fuentes extrahepáticas de células troncales de las que el hígado puede hacer uso en casos extremos o que pueden inducirse a diferenciarse a hepatocitos para trasplante, por ejemplo, células troncales hematopoyéticas, mesenquimales y de médula ósea. Sin embargo, hoy en día todavía no es claro qué tipo de células troncales sean las idóneas para fines clínicos, actualmente se tienen buenas perspectivas en la diferenciación a partir de células troncales embrionarias de humano a hepatocitos en medios libres de suero (Vinken y Rogiers, 2015). Un hallazgo interesante es que a partir de iPSCs de humano diferenciadas de manera directa a células endodérmicas hepáticas se encontró que estas células en cultivo tienden a agregarse en racimos tridimensionales a las 48 h y en 6 días adquieren el aspecto de un brote hepático vascularizado y realizan algunas funciones hepáticas básicas, lo cual es una base prometedora para aplicación en medicina regenerativa (Takebe y col., 2013).

Retomando algunos de las dificultades técnicas en los primeros intentos para aislar las células hepáticas, inicialmente se logró el cultivo de hepatocitos por más de dos días (tiempo promedio máximo en que sobreviven sin factores de crecimiento añadidos) en dos dimensiones. Esta restricción modifica la formación de estructuras tipo canalículo y la expresión de transportadores localizados en estos sitios. Para contrarrestar los problemas asociados a la necesidad de una arquitectura tridimensional, se intentó usar rebanadas de tejido hepático, pero similar a los cultivos primarios, por períodos de 1 ó 2 días. Otra posibilidad consistió en cultivar una monocapa de hepatocitos dentro de dos capas de matriz extracelular (colágena I o extractos comerciales conocidos como Matrigel y Biomatrix), en una configuración llamada de emparedado (sandwich) que preserva la polaridad y función de los hepatocitos con la presencia de canalículos y uniones estrechas entre ellos. La técnica del emparedado se convirtió entonces en el primer candidato para producir tejido para trasplante celular.

Los esfuerzos por producir tejido hepático funcional se han centrado en producir andamios biodegradables y biocompatibles que sirvan de soporte para sembrar células de distintos tipos propias del hígado, que eventualmente puedan ser trasplantadas, al menos como una opción temporal que permita la sobrevivencia mientras se tiene disponibilidad de un hígado para trasplante (Tabla 1). Originalmente, se han usado matrices de poliuretano biodegradable con las que se ha logrado obtener estructuras esféricas (esferoides) en los que es posible cultivar hepatocitos funcionales de rata o de humano por distintos tiempos (Ijima y col., 1998). Un material con ventajas sobre matrices comerciales como el Matrigel son los hidrogeles, que son matrices flexibles con una alta capacidad para contener más de 99% (peso/volumen) de agua. Los hidrogeles están compuestos de nanofibras formadas por pequeños péptidos pequeños, proteínas filamentosas y otros polímeros en los que es posible sembrar hepatocitos y obtener esferoides (Navarro-Alvarez y col., 2006; Tsang y col., 2007). Los dispositivos de microfluídica también proporcionan un ambiente tridimensional por ser contruidos de arreglos de microcanales y micropilares con espacios

en el orden de 20 μm . Esta técnica permite inmovilizar las células que se siembran y mediante un flujo de polielectrolitos (colágena y mezclas de metacrilatos) que se agregan por coacervación, reproducir una matriz extracelular (Toh y col., 2007).

En la búsqueda de materiales adecuados como andamio se han utilizado fibras de origen natural como algunos polímeros obtenidos de algas pardas (Glicklis y col., 2000), la fibroína de seda que se obtiene del gusano de la seda (Gotoh y col., 2011) o el ácido poli-L-láctico (Török y col., 2011). La fibroína de seda es un material resistente y biocompatible que permite cultivos celulares en dos dimensiones y más aún, en tres dimensiones, lo cual en el caso de cultivo de hepatocitos es de gran importancia (Gotoh y col., 2011). En primera instancia, las fibras de seda pueden disolverse en soluciones con alta concentración de sales con las que se obtienen películas, fibras, geles o esponjas. La fibroína de seda puede prepararse de manera que se obtienen conjugados por la combinación de residuos de β -galactosa que favorecen la interacción de la matriz con los receptores de hepatocitos que se adhieren de manera específica y forman esferoides que imitan la estructura del tejido hepático. En particular, los esferoides de fibroína de seda funcionan mejor con líneas celulares establecidas como la del hepatocarcinoma humano de células FLC-4 (FLC, por funcional liver cells) dando lugar a estructuras espongiiformes que aseguran una mejor difusión de nutrientes en torno y dentro de las células y muestran varios de los parámetros indicativos de la funcionalidad de éstas (Gotoh y col., 2011). Los esfuerzos posteriores se han dirigido a reproducir sistemas tridimensionales más complejos que imitan la MEC del hígado y donde se cultivan hepatocitos o co-cultivos incluyendo células no parenquimatosas o células madre (Revisar, Ananthanarayanan y col., 2010).

TABLA 1**EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS Y MATERIALES USADOS COMO ANDAMIOS PARA EL CULTIVO DE DIFERENTES CÉLULAS HEPÁTICAS Y OTRAS LÍNEAS CELULARES CON EL OBJETO DE SER USADOS POTENCIALMENTE PARA TRASPLANTE**

ANDAMIO	CÉLULAS SEMBRADAS	REFERENCIA
Biomatrix	Hepatocitos de rata	Rojkind y col., 1980.
Hidrogel de nanofibras	Hepatocitos de cerdo	Navarro-Alvarez y col., 2006.
Hidrogel de poli-etilenglicol	Hepatocitos	Tsang y col., 2007.
Canales microfluidos	Hepatocitos primarios y HepG2	Toh y col., 2007.
Esponjas de poliuretano → esferoides	Hepatocitos de rata	Ijima y col., 1998.
Acido poli-l-láctico	Hepatocitos humanos	Török y col., 2011.
Copolímeros (poli-ácido láctico/ácido glicólico)	Hepatocitos de rata	Hasirci y col., 2001.
Esponjas de algas (100-150 um)	Hepatocitos de rata	Glicklis y col., 2000.
Esponjas de lactosa/fibroína de seda → esferoides (3D)	Hepatocarcinoma humano FLC-4	Gotoh y col., 2011.
Bionanocompositos con fagos fd	HepG2	Montalvan-Sorrosa y col., (comunicación personal).
Hígado descelularizado de ratas isquémicas y sanas	Hepatocitos de rata/ ratón	Uygun y col., 2010; Soto-Gutiérrez y col., 2011

CONTINUACIÓN TABLA 1

EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS Y MATERIALES USADOS COMO ANDAMIOS PARA EL CULTIVO DE DIFERENTES CÉLULAS HEPÁTICAS Y OTRAS LÍNEAS CELULARES CON EL OBJETO DE SER USADOS POTENCIALMENTE PARA TRASPLANTE

ANDAMIO	CÉLULAS SEMBRADAS	REFERENCIA
Hígado descelularizado de hurón y otras especies	MS1 (Endoteliales/ GFP) de ratón, hUVECs (células humanas), hFLCs (células humanas)	Baptista y col., 2011.
Discos descelularizados de hígado de cerdo	HepG2 (hepatoblastoma humano)	Lang y col., 2011.
Hígado descelularizado de cerdos	Hepatocitos de cerdo	Yagi y col., 2013.
Hígado descelularizado de borregos		Kajbafzadeh y col., 2013.
Hígado descelularizado completo o un lóbulo de humano	Células LX2 (Células estrelladas de humano), HepG2, Células Sk-Hep-1	Mazza y col., 2015.

Desde un enfoque de ingeniería pura, se ha desarrollado la metodología para la biofabricación de órganos que requiere de separadores de células, biorreactores para propagación de células madre, diferenciadores de células, biofabricadores de esferoides (que garantiza una producción a gran escala), encapsuladores de esferoides, bioimpresoras robóticas y biorreactores de perfusión. En términos generales, esta metodología llamada bioimpresión se enfoca en la construcción automatizada paso a paso de bloques de esferoides auto-ensamblables que generen tejidos tridimensionales y órganos funcionales (Mironov y col., 2011).

Los sistemas tridimensionales óptimos reproducen las propiedades intrínsecas de la MEC, *i.e.* integridad mecánica y proporcionan espacio para la difusión de nutrientes y metabolitos hacia y desde las células. Los canales de microfluídica representan microambientes tridimensionales que reproducen estructuras similares a los sinusoides y que permiten el cultivo de distintos tipos celulares. Otros andamios incorporan moléculas señalizadoras que permiten una mejor adherencia, proliferación y diferenciación de las células principalmente a través de interacciones no covalentes de proteínas de fusión y factores de crecimiento que pueden modificarse dependiendo del tejido a expresar (Kobatake y col., 2011). En este contexto, enfocado al desarrollo de matrices experimentales, se ha demostrado que el autoensamblaje de glicoconjugados pequeños formados por adenina, aminoácidos (Phe-Arg-Gly-Asp) y sacáridos como la glucosamina, puede sustituir en cierta medida la necesidad de sintetizar glicanos complejos (Du y col., 2014). Tales glicoconjugados se organizan en ensamblajes supramoleculares que contienen nanofibrillas y nanopartículas que promueven la proliferación de células madre embrionarias de ratón mediada por integrinas y el desarrollo de cigotos (Du y col., 2014).

Otro enfoque reciente aportado por la nanotecnología se basa en el uso de bloques complejos de construcción que se autoensamblan. Un ejemplo de dichos bloques son los virus filamentosos cuyo ADN no se integra en el hospedero lo cual representa una ventaja. Otra

ventaja es que la estructura de estos fagos permite realizar reacciones de bioconjugación, es decir, la envoltura proteica del virus puede modificarse por adición de diferentes biomoléculas, por ejemplo cisteínas, para acoplar nanopartículas de oro que son inocuas y obtener nanocables (Montalvan-Sorrososa y col., 2014). Los virus fd también pueden usarse para producir hidrogeles que sirvan como andamio para el crecimiento de células.

En general, los enfoques descritos podrían ser de gran utilidad para la producción de cultivos de hepatocitos o células madre tan importante en el campo de la ingeniería de tejidos.

La descelularización del hígado como una técnica prometedora para uso en trasplantes

Un ingenioso sistema de aplicación en la ingeniería de tejidos son los andamios de origen animal, propiamente la MEC, tomando ventaja de su capacidad de inducir respuestas remodeladoras en el tejido hospedero una vez que es trasplantado. El uso de matrices naturales o biomatrices se ha descrito para vejiga, arterias, esófago, piel, tráquea, corazón, y para estructuras del sistema nervioso central. Dicha metodología requiere de un escrupuloso procedimiento llamado descelularización el cual, elimina las células endógenas del tejido mediante perfusión con soluciones en presencia de detergentes, solventes, enzimas o agentes físicos en función de las propiedades del tejido como grosor, densidad y contenido de lípidos (Crapo y col., 2011). Se considera que un proceso de descelularización es adecuado si el contenido remanente de ADN de doble cadena es < 50 ng/mg de peso seco; los fragmentos de ADN son < 200 pb y si no se detectan núcleos celulares por tinciones específicas con DAPI y hematoxilina/eosina (Crapo y col., 2011).

La descelularización de órganos complejos como el hígado se ha logrado usando mezclas de Tritón X-100 que solubilizan lípidos e

hidróxido de amonio o dodecil sulfato de sodio (SDS) en concentraciones crecientes 0.01-1.0% que contribuye a eliminar el ADN. Estas mezclas se perfunden a través de la vena porta durante 72 h en ratas (Uygun y col., 2010) o por 1, 2, 3 y 24 h para ratón, hurón, rata y cerdo, respectivamente (Baptista y col., 2011) y posteriormente se lava para retirar el detergente. Al término de la perfusión, el tejido hepático adquiere un aspecto translúcido por la eliminación de células pero mantiene la estructura vascular prácticamente intacta.

Una vez libre de células, la matriz debe esterilizarse por métodos combinados (por ejemplo, radiación gamma/exposición a óxido de etileno) y entonces se procede a sembrar el órgano con uno o más tipos celulares (recelularización), aún con células de otra especie (Uygun y col., 2010; Baptista y col., 2011). En este último caso, es deseable la eliminación de epítopes relacionados con la respuesta inmune aunque se sabe de una alta tolerancia debida a la conservación de moléculas de la MEC entre distintas especies. Otros esfuerzos para lograr la repoblación del hígado se han dirigido a partir de células madre embrionarias o de iPSCs, un enfoque prometedor que podría evitar el rechazo inmunológico observado en otros casos y cuestiones éticas en el caso del uso de células embrionarias. Algunas dificultades a resolver son el lograr una buena producción de células y evitar la formación de tumores a partir de iPSCs. Una metodología que intenta escalar la producción de células utiliza micro-acarreadores formados de partículas de 100-250 μm de celulosa, vidrio, plástico o poliéster donde pueden sembrarse células embrionarias de humano, diferenciarse a células tipo hepatocito y cultivarse en biorreactores (Park y col., 2014). Acerca de las células ideales para repoblar el hígado descelularizado, el líder del grupo pionero en el campo considera que el hepatocito es la célula básica y que pueden no sembrarse células de Kupffer y linfocitos hepáticos debido a que por ser parte del sistema inmune, una vez establecido el trasplante las células requeridas pueden migrar desde la médula ósea (Uygun y Yarmush, 2013). Sin embargo, recientemente se ha descrito una población de hepatocitos híbridos presente en la región periportal en hígados sanos, llamados así porque expresan genes propios de

hepatocitos como HNF4 α además de genes de células de ductos biliares tal como SOX9 (Font-Burgada y col., 2015). Los autores sugieren que los hepatocitos híbridos se encargan de recuperar la masa hepática durante eventos de daño crónico y que podrían tener potencial como alternativa para aplicación en terapias para tratamiento de enfermedades hepáticas si se logra su propagación adecuada en cultivo (Font-Burgada y col., 2015).

En uno de los trabajos probando la metodología de trasplante de hígado recelularizado en ratas, fue necesario realizar previamente una nefrectomía unilateral y se usaron la arteria y vena renales como puertos para generar flujo sanguíneo en el trasplante el cual se reestableció a los 5 minutos de liberar el pinzamiento de la arteria (Uygun y col., 2010). El órgano recelularizado y trasplantado se mantuvo en el animal hospedero por 8 horas o mediante perfusión *ex vivo* para su análisis. En ambos casos se mantuvo el fenotipo de los hepatocitos y se encontró una función hepática aceptable, aunque con indicios de daño por isquemia (Uygun y col., 2010). En un trabajo más reciente se usó tritón X-100/tripsina/EGTA, se descelularizó el tejido en 48 h y se emplearon diferentes metodologías para la resiembra del andamio hepático con el propósito de mejorar la viabilidad y función de los hepatocitos (Soto-Gutiérrez, y col., 2011). Los métodos fueron: inyección directa de los hepatocitos en los lóbulos del hígado; perfusión continua e infusión en pasos a intervalos de 10 a 15 minutos. La exclusión de detergentes agresivos como el SDS mejoró la preservación del hígado libre de células. Con el método por pasos se logró una eficiencia mayor al 90% debido a la preservación hasta de un 50% del contenido de factores de crecimiento de la matriz (el factor de crecimiento hepático -HGF- y el factor básico de crecimiento de fibroblastos -bFGF-), la preservación de la estructura biliar y vascular, de la cápsula de Glisson y por la presencia de fragmentos de ADN \leq 200 pb que indican una reacción inflamatoria mínima (Soto-Gutiérrez, y col., 2011).

La descelularización de hígados de especies pequeñas ha sido fundamental para la implementación de la técnica, pero la obtención de

matrices de especies mayores que nos aproximen al éxito en humano es prioritaria. Los hígados descelularizados de especies de mayor tamaño se han obtenido de cerdo con una conservación aceptable de la matriz y una eficiencia del injerto mayor del 70% al ser repoblado con hepatocitos (Yagi y col., 2013) y también de borrego (Kajbafzadeh y col., 2013). Recientemente se ha logrado la descelularización de hígado humano mediante perfusión por 14 días para el lóbulo izquierdo o por 6 semanas para el órgano completo (Mazza y col., 2015). En estas matrices se logró una conservación adecuada de su estructura, así como crecimiento de varios tipos celulares y su biocompatibilidad se comprobó implantando pequeños fragmentos en ratones inmuno-competentes (Mazza y col., 2015).

Distintos trabajos demuestran que la MEC y su interacción con ligandos extracelulares puede promover la activación de integrinas que a su vez reclutan proteínas tanto de señalización como adaptadoras (por ejemplo, paxilina, vinculina, entre otras). Este tipo de interacción puede tener implicaciones para lograr una diferenciación eficiente de células madre pluripotenciales y es objeto de estudio por diversos grupos. En el caso de la reprogramación a partir de células madre embrionarias o de células diferenciadas como fibroblastos a hepatocitos se ha logrado, aunque frecuentemente muestran fenotipos inmaduros (revisado por Handa y col., 2014).

Perspectivas

En la actualidad, el mayor desafío para lograr un órgano funcional que pueda trasplantarse es el lograr la repoblación adecuada de la matriz con los distintos tipos celulares propios del hígado que posibiliten la reconstrucción de la vasculatura y a largo plazo, una función adecuada. Los avances en xenotrasplantes, ingeniería de tejidos y el trasplante de células funcionales con seguridad ofrecerán soluciones que permitan sobrellevar la carencia de suficiente número de donadores. Sin duda,

el enfoque de andamios naturales descelularizados representa gran potencial para la obtención de tejido funcional hepático para trasplantes debido a que está basado en el mejor diseño conocido a la fecha, el provisto por la naturaleza.

Agradecimientos

Se agradece la lectura crítica de este capítulo a la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz investigadora de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Se agradece la contribución de Jorge Bravo-Martínez en la elaboración de esquemas originales para este capítulo y a Javier Gallegos por su ayuda en la localización de referencias especializadas.

Referencias

- Ananthanarayanan A, Narmada BC, Mo X, McMillian M, Yu H. (2011). Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering. *Trends Biotechnol* **29**:110-118.
- Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, et al. (2011). The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* **53**:604-617.
- Berthiaume F, Moghe PV, Toner M, Yarmush ML. (1996). Effect of extracellular matrix topology on cell structure, functions, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J* **10**:1471-1484.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**:3233-3243.

- Du X, Zhou J, Guvench O, Sangiorgi FO, Li X, Zhou N, Xu B. (2014). Supramolecular assemblies of a conjugate of nucleobase, amino acids, and saccharide act as agonists for proliferation of embryonic stem cells and development of zygotes. *Bioconjugate Chem* **25**:1031-1035.
- Font-Burgada J, Shalapour S, Ramaswamy S, Hsueh B, Rossell D, et al. (2015). Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer. *Cell* **162**:766-779.
- Glicklis R, Shapiro L, Agbaria R, Merchuk JC, Cohen S. (2000). Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* **67**:344-353.
- Gotoh Y, Ishizuka Y, Matsuura T, Niimi S. (2011). Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells culture in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules* **12**:1532-1539.
- Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Chapter 1: General review on in vitro hepatocyte models and their applications. En: *Hepatocytes, Methods in Molecular Biology*. Maurel P. (ed). Springer Science+ Business Media, LLC 2010.
- Handa K, Matsubara K, Fukumitsu K, Guzman-Lepe J, Watson A, Soto-Gutierrez A. (2014). Assembly of human organs from stem cells to study liver disease. *Am J Pathol* **184**:348-357.
- Harsici V, Berthiaume F, Bondre SP, Gresser JD, Trantolo DJ et al. (2001). Expression of liver-specific functions by rat hepatocytes seeded in treated poly(lactic-co-glycolic) acid biodegradable foams. *Tissue Eng* **7**:385-394.
- Ijima H, Mizumoto H, Matsushita T, Funatsu K. (1998). Formation of a spherical multicellular aggregate (spheroid) of animal cells in the

pores of polyurethane foam as a cell culture substratum and its application to a hybrid artificial liver. *J Biomater Sci Polym Ed* **9**:765-778.

Kajbafzadeh AM, Javan-Farazmand N, Monajemzadeh M, Baghayee A. (2013). Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue. *Tissue Eng C* **19**:642-651.

Kobatake E, Takahashi R, Mie M. (2011). Construction of a bFGF-tethered extracellular matrix using a coiled-coil helical interaction. *Bioconj Chem* **22**:2038-2042.

Lang R, Stern MM, Smith L, Liu Y, Bharadwaj S, et al. (2011). Three-dimensional culture of hepatocytes on porcine liver tissue-derived extracellular matrix. *Biomaterials* **32**:7042-7052.

Lee SY, Kim HJ, Choi D. (2015). Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation. *Int J Stem Cells* **8**:36-47.

Mazariegos G, Shneider B, Burton B, Fox IJ, Jadzic N, et al. (2014). Liver transplantation for pediatric metabolic disease. *Mol Genet Metab* **111**:418-427.

Mazza G, Rombouts K, Rennie Hall A, Urbani L, Vinh Luong T, et al. (2015). Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci Rep* **5**:13079.

Mohan N, Nair PD. (2005). Novel porous, polysaccharide scaffolds for tissue engineering applications. *Trends Biomater Artif Organs* **18**:219-224.

- Montalvan-Sorrososa D, González-Solís JL, Mas-Oliva J, Castillo R. (2014). Filamentous virus decoration with gold nanoparticles: global fingerprints of bionanocomposites acquired with SERS. *RSC Adv* **4**:57329-57336.
- Mironov A, Kasyanov V, Markwald RR. (2011). Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Curr Opin Biotechnol* **22**:1-7.
- Navarro-Alvarez N, Soto-Gutiérrez A, Rivas-Carrillo JD, Chen Y, Yamamoto T, et al. (2006). Self-assembling peptide nanofiber as a novel culture system for isolated porcine hepatocytes. *Cell Transplant* **15**:921-927.
- Park Y, Chen Y, Ordovas L, Verfaillie CM. (2014). Hepatic differentiation of human embryonic stem cells on microcarriers. *J Biotechnol* **174**:39-48.
- Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambone MA, Ponce P, Reid LM. (1980). Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol* **87**:255-263.
- Soltys K, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, et al. (2010). Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation. *J Hepatol* **53**:769-774.
- Soto-Gutiérrez A, Zhang L, Medberry C, Fukumitsu K, Faulk D, et al. (2011). A Whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C: Methods* **17**:677-686.
- Struecker B, Raschzok N, Sauer IM. (2014). Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**:166-176.

- Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**:481-484.
- Toh YC, Zhang C, Zhang J, Khong YM, Chang S, et al. (2007) A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab Chip* **7**:302-309.
- Török E, Lutgehetmann M, Bierwolf J, Melbeck S, Düllmann J, et al. (2011). Primary human hepatocytes on biodegradable poly(l-lactic acid) matrices: a promising model for improving transplantation efficiency with tissue engineering. *Liver Transpl* **17**:104-114.
- Uygun BE, Soto-Gutiérrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, et al. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* **16**:814-820.
- Uygun BE, Yarmush ML. (2013). Engineered liver for transplantation. *Curr Opin Biotechnol* **24**:893-899.
- Varela-Fascinetto G, Dávila-Pérez R, Hernández-Plata A, Castañeda-Martínez P, Fuentes-García V, et al. (2005). Trasplante hepático en niños. *Revista de Investigación Clínica* **57**:273-282.
- Vinken M, Rogiers V (eds). *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Humana Press. New York, USA., 2015. 406 pp.
- Yagi H, Fukumitsu K, Fukuda K, Kitago M, Shinoda M, et al. (2013). Human-scale whole-organ bioengineering for liver transplantation: a regenerative medicine approach. *Cell Transplant* **22**:231-242.
- Organ Procurement and Transplantation Network del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. <http://optn.transplant.hrsz.gov>, consultada 29 de septiembre de 2016.

CAPÍTULO 06

Regulación epigenética en el tejido hepático

Blanca Alicia Delgado Coello
Rocío Alcántara Hernández



Generalidades sobre epigenética

La expresión fenotípica de los genes es regida por factores genéticos, epigenéticos y ambientales que se interrelacionan. La epigenética estudia todos aquellos factores que sin estar codificados en el propio ADN, modulan la expresión de los genes a través de mecanismos que condicionan la conformación que adopta la cromatina, es decir el ADN ultracompacto en el núcleo en asociación con proteínas. En su conformación laxa (eucromatina) la cromatina permite que el ADN que envuelve a las histonas en el nucleosoma pueda ser leído. De lo contrario, si el ADN se encuentra en una cromatina compacta (heterocromatina), la información no puede ser transcrita. Los mecanismos epigenéticos se consideran estables y pueden transmitirse por mitosis y meiosis sin producir alteraciones del ADN o mutaciones. Las distintas modificaciones epigenéticas se clasifican en tres grandes grupos y se describen con mayor amplitud más adelante.

- I) Metilación del ADN. Involucra la metilación de manera reversible en el carbono 5' de la citosina de los dinucleótidos citosina-fosfato-guanina conocidas como islas CpG (regiones de 200 pares de bases a varios kilobases) comunes en regiones cercanas a los promotores. Se calcula que existen alrededor de 45,000 islas CpG en el genoma humano. Las metilaciones en CpG confieren un estado represor, es decir, la cromatina se compacta debido a la participación de proteínas que favorecen el reclutamiento de co-represores como desacetilasas de histonas y metilasas. La metilación del ADN es relevante en procesos del desarrollo como son la inactivación del cromosoma X o la recombinación y mantenimiento de la estabilidad genómica.

- II) Modificaciones postraduccionales de las histonas (o marcas epigenéticas). Recordemos brevemente al nucleosoma como la unidad repetida base de la cromatina, sustrato de distintos cambios epigenéticos. Cada nucleosoma consiste de un octámero

formado por dos proteínas básicas de cada una de las histonas canónicas o nucleosómicas: H2A, H2B, H3 y H4, que empaquetan un segmento de ADN de 145-147 pares de bases e interconectados mediante histonas de enlace o externas (H1 o H5) que compactan al nucleosoma. Cada octámero, llamado por algunos "cromatosoma", se conecta con otro mediante segmentos de ADN de aproximadamente 166 pares de bases. En algunas regiones de la cromatina los nucleosomas presentan sustituciones de algunas histonas por otras que no son canónicas, solo hay variantes para las tipo H2A y H3 y siete isoformas de H1. Las modificaciones postraduccionales afectan al amino terminal de las histonas, o en ocasiones sitios internos, específicamente en residuos de lisina, arginina, serina o treonina. Las modificaciones incluyen: metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones, ADP-ribosilaciones y glucosilaciones (revisado por Delgado-Coello, 2011). Pueden darse varias modificaciones simultáneas o algunas ser excluyentes entre sí que en conjunto forman un código de histonas que puede ser leído por la maquinaria transcripcional para silenciar o activar la transcripción de genes. En general, se ha observado que los genes en transcripción activa presentan núcleos de histonas con acetilaciones abundantes, y si están hipoacetiladas corresponden a regiones de cromatina silenciadas. Esto se debe principalmente a la carga negativa que la acetilación aporta a las histonas, haciendo que repela a la molécula de ADN también cargada negativamente. Cabe resaltar que la metilación de las histonas no se debe confundir con la metilación del ADN, y que la primera, al eliminar por exclusión la acetilación de las histonas, se relaciona generalmente con regiones silenciadas del ADN.

- III) Silenciamiento de genes mediados por ARNs no codificantes que incluye a los microARNs (miARN) con longitudes de 19 a 24 nucleótidos y los ARN largos no codificantes (lncARN) compuestos de más de 200 nucleótidos. Los cambios inducidos por estos ARNs pueden ser heredados, su acción está dada por la formación de

dímeros de miARNs y la región no traducida de mensajeros blanco (UTRs). En consecuencia, ocurre un silenciamiento traduccional por degradación del mensajero o por inhibición de la traducción.

Aberraciones epigenéticas frecuentes en enfermedades hepáticas

Partiendo de la clasificación anterior, a continuación se describen algunas modificaciones que se han detectado como parte de distintas patologías hepáticas. En el contexto de la fisiología hepática principalmente en condiciones patológicas, el conocimiento del papel de los mecanismos de regulación epigenéticos es aún incipiente. Sin embargo, es conocido que la regulación epigenética es fundamental para el buen desempeño de procesos de transcripción genética, diferenciación y protección contra genomas virales. Así, cuando la regulación epigenética ocurre de forma aberrante, se predispone el organismo a sufrir cambios genéticos y éstos pueden a su vez llevar a más alteraciones epigenéticas (Herceg y Paliwal, 2011).

Metilación del ADN

Los promotores que contienen numerosas regiones CpG generalmente se encuentran hipometilados y los que tienen menor contenido de islas CpG pueden estar metilados sin mayor impacto a nivel epigenético (revisado por Recillas y col., 2011).

Subyacente al buen “desempeño epigenético”, en la célula eucarionte existe un mecanismo de comunicación o “crosstalk” que regula de manera fina los estados abierto y cerrado de la cromatina, para mantener a la célula genómicamente estable y alejada de transformaciones oncogénicas. Aún se desconoce cómo ocurre esta interacción aunque seguramente el medio ambiente ejerce alguna influencia. En el hígado se conocen diversas patologías crónicas

donde la fibrosis invade al tejido que en grado moderado puede ser reversible, pero por distintas causas frecuentemente evoluciona hacia la cirrosis hepática que es irreversible, y a hepatocarcinomas (HCA) con mal pronóstico. Cabe destacar que los HCA están asociados a hepatitis producidas por los virus B y C, al alcoholismo, o incluso a procesos de acumulación de grasa, los cuales se consideran conductores de los cambios epigenéticos subsecuentes. En la fibrogénesis hepática es fundamental el papel de las células estrelladas y el proceso de transdiferenciación o activación que éstas sufren (Capítulo 2), precisamente mediado por un remodelaje epigenético por metilación del ADN. Por su papel central en la patogénesis de la fibrosis, las células estrelladas son un blanco para la acción de agentes terapéuticos (Mann, 2014).

Se ha caracterizado la presencia de un fenotipo metilador cuyo foco se propone ocurre en zonas distantes de las islas CpG y que avanza hasta alcanzar a estas últimas, generando un ADN hipermetilado (3-5 veces por encima de niveles normales) y transcripcionalmente silenciado (Issa, 2004). El origen del fenotipo metilador no es claro, una hipótesis propone la existencia de centros de metilación cuyas secuencias son afines a las ADN metiltransferasas que promueven la modificación y después su extensión en *cis*, lo cual genera lo que se conoce como “olas de metilación”. Es frecuente encontrar el fenotipo metilador en pacientes de mayor edad, posiblemente debido a que los sistemas que protegen a los genes de la metilación (por ejemplo, los “insulador”) son más vulnerables (Issa, 2004). Asimismo, son relevantes los factores ambientales que favorecen la metilación aberrante, como es la inflamación crónica subyacente. El fenotipo metilador es común a distintos tipos de cáncer, incluidos los de origen hepático. En el cáncer hepático, se han detectado frecuentemente hipometilaciones globales e hipermetilaciones de promotores que se relacionan con inestabilidades genómicas y con la inactivación de genes supresores de tumores. Se considera que las distintas marcas epigenéticas identificadas en diversos tipos de cáncer, representan un firma epigenética específica. Cuando el HCA se genera por la infección con el virus de la hepatitis B y C se

producen eventos genéticos como mutaciones por inserción, y eventos epigenéticos, básicamente por metilación de genes blanco mediada por ADN-metiltransferasas, metilación de genes de reparación del ADN y metilación de genes supresores de tumores. El propio genoma del virus B de la hepatitis se encuentra hipermetilado en tejidos cirróticos (pre malignos) y cancerosos lo cual sugiere una estrecha relación entre la hipermetilación del genoma viral con el proceso de malignidad.

Un tema de interés para la investigación en epigenética es la detección de posibles patrones de metilación de genes en diferentes patologías y estadios de las mismas. Ammerpohl y colaboradores observaron que en general los genes metilados de manera aberrante en el HCA, tienen relación con vías de señalización y procesos de desarrollo y diferenciación, destacando que los genes hipometilados en el HCA pertenecen al sistema inmune (Tabla 1). Por otra parte, aquellos genes alterados en hígados cirróticos y en el HCA se relacionan con vías del metabolismo (Ammerpohl y col., 2011). El análisis del patrón de metilación en diferentes etapas del desarrollo del HCA asociado a los virus B y C de la hepatitis en humanos sugiere que las metilaciones ocurren no sólo en etapas tempranas, sino en etapas intermedias y avanzadas de acuerdo a un patrón de genes distintos que se hipermetilan (Nishida y col., 2012). Dicho estudio muestra además que el tejido pasa de estados hipometilados en el hígado normal a estados de metilación moderados en estados cirróticos que son pre malignos. Por lo tanto, la cirrosis parece estar asociada con cambios epigenéticos que conllevan a la hepatocarcinogénesis. Se destaca que los genes hipermetilados (inactivos) especialmente en etapas tempranas del cáncer (aunque se mantienen hipermetilados durante todas las etapas) corresponden a los promotores de genes supresores de tumores (Nishida y Goel, 2011; Nishida y col., 2012, Tabla 1). De acuerdo a un estudio por Lee y colaboradores, los genes más hipermetilados en muestras de HCAs son: APC > GTP1 > RASSF1a > p16 > COX-2 > E-cadherina (Lee y col., 2010).

Sin embargo, las hipometilaciones del ADN también son relevantes en el contexto del cáncer hepático. En un estudio se

determinó que en hepatocitos primarios aislados de tejidos infectados por el virus de la hepatitis B, son 792 genes los que se hipermetilan y 533 genes muestran hipometilación global, respecto a los hepatocitos normales (Tao y col., 2011). Los genes hipermetilados participan en funciones de señalización de calcio, citotoxicidad mediada por células NK (natural killer), adhesión celular y apoptosis. En tanto que los genes hipometilados participan en comunicación celular y también en señalización de calcio (Tao y col., 2011). Otros trabajos muestran que en distintos hepatocarcinomas humanos destacan hipometilaciones de secuencias repetidas de ADN relacionadas con la fragilidad cromosómica y activación de retrotransposones y microARNs (Nishida y Goel, 2011).

Otra modificación epigenética en el HCA es la acetilación de genes importantes que pasan de un estado hiperacetilado a un hipoacetilado (inactivo) que eleva el potencial apoptótico del tejido canceroso (revisado en Herceg y col., 2011).

Modificaciones postraduccionales en histonas

La estructura cristalográfica del nucleosoma se determinó a fines de la década de los noventa y se encontró que el octámero consta de pares de los heterodímeros H3-H4 y H2A-H2B (Luger y col., 1997). Recientemente se han estudiado sus propiedades mecánicas con el objeto de entender la compactación de la cromatina usando técnicas como las pinzas ópticas y magnéticas (revisado por Bednar y Dimitrov, 2011). Cada octámero de histonas contiene hasta 60 sitios donde pueden ocurrir modificaciones epigenéticas, por lo que potencialmente el número de combinaciones puede ser elevado (Tabla 2). En la nomenclatura convencional para estas modificaciones, se incluye la histona modificada y el residuo donde tiene lugar la modificación sea lisina (K), arginina (R), serina (S) o treonina (T) (Fig. 1).

TABLA 1**PATRÓN DE AUMENTO O DISMINUCIÓN DE LA METILACIÓN DE ADN DE GENES SUPRESORES DE TUMORES SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES EN TRES CONDICIONES DE TEJIDO HEPÁTICO HUMANO**

GENE	HÍGADO NORMAL	HÍGADO CIRRÓTICO	HEPATOCARCINOMA
CDKN2A (p161NK4)*			↑↑*,** (HCA _t)
SOCS1*	↑↑*	↓*	↑↑*,** (HCA _t)
LOC55908	↓*	↑*	↑↑*
CELSR1	↓*	↑*	↑↑*
CRMP1	↓*	↑*	↑↑*
GNRH2	↓*	↑*	↑↑*
ALOX12	↓*	↑*	↑↑*
ANGPTL7	↓*	↑*	↑↑*
SPRR3	↑*	↓*	↓↓*
TNFSF15	↑*	↓*	↓↓*
RASSF2	↓**		↑↑** (HCA _a)
MINT1 Y MINT2*	↓**		↑↑** (HCA _a)
RPRM*	↓**		↑↑** (HCA _a)

GENE	HÍGADO NORMAL	HÍGADO CIRRÓTICO	HEPATOCARCINOMA
SFRP2*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
CDH1*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
DCC*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
APC*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
GSTP1*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
RASSF1*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
RUNX3*	↓**		↑↑ ** (HCAa)
PRDM2	↓**		↑↑ ** (HCAa)
HIC1*	↓**		↑↑ ** (HCAa)

* Datos reportados por Ammerpohl y col., 2012; ** Datos reportados por Nishida y col., 2012.

HCAa: hepatocarcinoma temprano; HCA: hepatocarcinoma avanzado; *CDKN2A*: inhibidor 2A dependiente de ciclinas; *SOCS1*: supresor de la señalización de citocinas; *LOC55908*: gene asociado a HCA; *CELSR1*: cadherina; *CRMP1*: proteína relacionada a la dihidropirimidinasa; *GNRH2*: hormona 2 liberadora de gonadotropina; *ALOX12*: lipooxigenasa tipo 12 del araquidonato; *ANGPTL7*: proteína 7 similar a la angiopoietina; *SPRR3*: proteína pequeña 3 rica en prolina; *TNFSF15*: miembro 15 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral; *RASSF2*: proteína 2 con dominio de asociación a Ras; *MINT1 Y MINT2*: proteínas 1 y 2 que interactúan con Munc18; *RPRM*: mediador del arresto en fase G2 dependiente de TP53; *SFRP2*: proteína 2 secretada en la apoptosis; *CDH1*: cadherina 1; *DCC*: receptor de netrina-1; *APC*: poli-adenomatosis-coli; *GSTP1*: S-Transferasa P1 del glutatión; *RASSF1*: miembro 1 de la familia con dominios *Ral/GDS/AF-6* de asociación a Ras; *RUNX3*: factor de transcripción 3 relacionado a Runt, *PRDM2*: proteína 2 que contiene dominio PR; *HIC1*: proteína hipermetilada 1 en cáncer.

TABLA 2**MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES FRECUENTES EN LAS HISTONAS DEL HÍGADO Y EFECTOS SOBRE GENES BLANCO***

MODIFICACIÓN	HISTONA/ENZIMAS	EFEECTO
Acetilación	H3/GNAT	Activación
	H4/MYST	Activación
	H3, H4/CBP/p300	Activación
Desacetilación	H3, H4/HDACs 1-11	Silenciamiento
Metilación	H3K4/Set1	Activación
	H3K36/Set2	Activación
	H3K79/DoT1L	Activación
	H3K27/EZH2	Silenciamiento
	H3K9/SUV39H1	Silenciamiento
	H3K20/SUV4-20H1	Silenciamiento
Fosforilación	H3S10/RSK2	Silenciamiento
	CpG metilada/DNMT1 DNMT3a-3b	Silenciamiento

* Modificada de Mandrekar, 2011.

GNAT y MYST: acetiltransferasas; CBP/p300: coactivador transcripcional; HDAC: desacetilasa; Set1, Set2, DoT1L, EZH2 y SUV: metiltransferasas; RSK: cinasa de la familia AGC.

Algunos estudios han permitido la identificación de distintas alteraciones epigenéticas causadas por el consumo del alcohol y la influencia de cambios en metabolitos como el zinc y la nicotinamida adenin dinucleótido (NAD⁺) (Mandrekar, 2011; Moghe y col., 2011). Una de las enfermedades de mayor impacto es la enfermedad hepática inducida por alcohol (o ALD por Alcoholic Liver Disease) en donde se afectan tanto células del parénquima hepático como células no parenquimatosas. En su conjunto, estas alteraciones contribuyen a la inducción de hígado graso, inflamación, apoptosis y/o necrosis que están asociadas a una expresión menor de una desacetilasa de histonas, la HDAC3 (Zeybel y col., 2013).

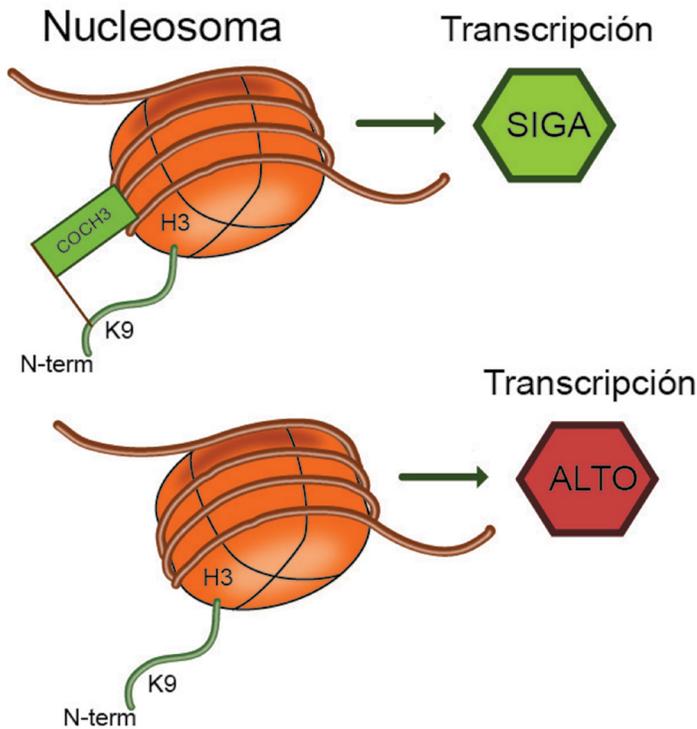


Figura 1. Representación de la acetilación y desacetilación de la lisina 9 (K9) del extremo amino terminal de la histona H3, cuyos efectos son la activación e inactivación de la transcripción, respectivamente.

Las patologías no asociadas al consumo de alcohol se agrupan en lo que se llama enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease) que incluye al hígado graso simple, la esteatohepatitis no alcohólica (NASH por sus siglas en Inglés) y a la cirrosis hepática que puede evolucionar hacia cáncer hepático. Estas patologías involucran factores genéticos y epigenéticos que afectan genes reguladores de los ritmos circadianos que modulan a su vez la expresión de cientos de genes del metabolismo hepático (Mann, 2014). Actualmente se conoce poco sobre las modificaciones específicas que ocurren en relación con NAFLD; por ejemplo, se ha reportado que los genes sobre-regulados en casos que involucran obesidad mórbida se relacionan con la señalización de la fibrosis hepática. Asimismo, los genes subregulados se relacionan con vías de estrés del retículo endoplásmico y rutas de ubiquitinación de proteínas (revisado por Li, 2012).

Papel de los ARNs no codificantes en patologías hepáticas

Los miARNs regulan la expresión generalmente a nivel postranscripcional al unirse a la región 3' no traducida (3'UTR) del ARN mensajero blanco al que desintegran o bloquean su traducción. En mamíferos se calcula que cerca de un 60% de los genes que codifican proteínas pueden ser blanco de miARNs; en humanos se conocen alrededor de 1500 miARNs. Los miARNs participan en la regulación de diversas vías celulares relacionadas con desarrollo y regeneración hepática. Por ejemplo, miR-122 participa en etapas del desarrollo y en la expresión anormal de miARNs presentes en enfermedades hepáticas como el HCA, hepatitis viral, fibrosis hepática y NAFLD. Otros microARNs como miR-34a y miR-146b se sobreexpresan en un 99 y 80%, respectivamente en pacientes con NASH (Li, 2012).

Aproximadamente la mitad de los miARNs conocidos se asocia con islas CpG por lo es posible que la hipermetilación de zonas CpG en algunos tipos de cáncer reprima la expresión de algunos miARNs. En el HCA se ha reportado que miR-26a, miR-101 y miR-122a entre otros, se subexpresan (revisado por Melo y col., 2011), en tanto que miR-let7c, miR-21, miR-146b y miR-92a aumentan su expresión. (Melo y col., 2011; Hercveg y Paliwal, 2011).

Un trabajo donde se analizó la expresión completa de los miARNs de muestras de HCA asociados a los virus B y C de la hepatitis, destaca que disminuye la expresión de miR-199a/b-3p cuya función aparentemente es la de suprimir la formación de tumores. En este caso se determinó que la expresión depende de modificaciones por metilación de histonas y no de la metilación del ADN (Hou, y col., 2011).

Otros mecanismos donde intervienen los miARNs pero sin cambios en su nivel de expresión están relacionados con la presencia de polimorfismos (SNP) en los sitios blanco de los miARNs que afectan su interacción. Alternativamente, eventos de edición alternativa pueden originar distintas secuencias no traducidas en 3'UTRs alterando los sitios de reconocimiento (Melo y col., 2011). Recientemente se ha descrito un tipo más de ARN no codificante; los piwi-interacting ARNs o piARNs (PIWI; del inglés P-element-induced wimpy testis) identificados primero en líneas germinales y posteriormente en células somáticas. En el tejido hepático de rata se han descrito dos de los tres genes codificantes para Piwi. Durante la regeneración hepática algunos de estos piARNs muestran cambios en la etapa en que se detiene la replicación del ADN (Rizzo y col., 2014).

Por otra parte, existen los llamados ARNs largos no codificantes (lncARNs) que son secuencias de 300 nucleótidos hasta 100 kb que se expresan con frecuencia en el genoma de mamíferos. La presencia de marcas epigenéticas asociadas con la transcripción son útiles en la

identificación de estas secuencias. ARNs largos, macroARN y ncARN largos intergénicos (lincARN) son sinónimos de los lncARNs (Gutschner y col., 2012).

Los lncARNs son genes transcritos de ARN que son poliadenilados y que se transcriben por acción de la ARN polimerasa II, participan en procesos que involucran activación y represión génica. A nivel post-transcripcional, los lncARNs también pueden modificar la expresión de sus genes blanco (Gutschner y col., 2012), mediante remodelación de la cromatina, por control y/o procesamiento transcripcional, o a través de la regulación de la localización, estabilidad y actividad de proteínas, así como mediante señalización intercelular (Takahashi y col., 2014).

Los lncARN intervienen en funciones como desarrollo, diferenciación, regeneración, metabolismo, entre otras, su desregulación se ha relacionado con distintos tipos de cáncer, por lo que pudieran considerarse marcadores biológicos. Por ejemplo el llamado HULC (highly upregulated in liver cancer) se sobreexpresa en tumores hepáticos primarios (Gutschner y col., 2012) o en pacientes con HCA por virus B de la hepatitis (Du y col., 2012). La lista de lncARN asociados a cáncer aún es breve, debido a que los miARNs han sido objeto de mayor estudio (Takahashi, y col., 2014).

Técnicas para el análisis de metilaciones del ADN

Debido a que las metilaciones son una de las modificaciones más frecuentes en el cáncer hepático, es fundamental contar con métodos que permitan una adecuada detección cuantitativa. Se recomienda al lector una revisión sobre los métodos enfocados al análisis epigenómico (Mensaert y col., 2014). Gran parte de estos métodos usan bisulfito de sodio para estabilizar la metilación de las citosinas al momento de aislar el ADN genómico para su secuenciación. Las desventajas del método

es que es útil sólo para secuencias cortas de ADN y que el proceso de tratamiento implica pérdida de material. El bisulfito de sodio modifica las citosinas no metiladas a uracilo y las metiladas permanecen sin cambios para su detección (Fig. 2). El proceso de modificación mediada por bisulfito de sodio implica tres reacciones: sulfonación de citosinas en el enlace 5, desaminación hidrolítica y desulfonación alcalina (Clark y col., 1994). Para llevar a cabo el procedimiento, el ADN previamente desnaturalizado se incuba con una mezcla de soluciones recién preparadas de hidroquinona y bisulfito de sodio (pH 5) a 50-55°C por 16 horas, tiempo en el que ocurren las tres reacciones mencionadas. El bisulfito debe eliminarse ya sea por diálisis o con columnas desaladoras, posteriormente se agrega una solución de NaOH, se neutraliza con acetato de amonio y se precipita el ADN con etanol y se reserva a -20°C. Finalmente, el análisis de metilación se realiza mediante reacciones de PCR con oligonucleótidos especialmente diseñados para muestras tratadas con bisulfito de sodio, es decir, para ADN que contiene citosinas “desaminadas” (las citosinas no metiladas pierden su amino y se convierten en uracilo). Los amplicones esperados se clonan en un vector adecuado y posteriormente son secuenciados. Cada timina que se detecte en la secuencia proviene de un uracilo (es decir, una citosina original no metilada) y cada metil-citosina se verá como una citosina.

I. Métodos en tubo cerrado.

Estas técnicas permiten llevar a cabo el tratamiento con bisulfito y la amplificación sin remover los amplicones obtenidos para el análisis posterior con tres variantes posibles (Candiloro y col., 2011):

- a) Disociación (melting) de alta resolución sensible a metilación. Método semicuantitativo que requiere oligonucleótidos independientes de la metilación para amplificar por PCR las secuencias metiladas (con mayor temperatura de disociación) y no metiladas que se distinguen claramente mediante la construcción de curvas de disociación. Este método se recomienda cuando se desconoce el grado de metilación presente.

- b) PCR metilación-específica (Methylight). Método basado en PCR específicas para metilación con sondas, donde las secuencias metiladas se detectan de manera cualitativa por electroforesis, o cuantitativa por técnicas de PCR en tiempo real.
- c) Disociación sensible posterior al análisis de metilación específica en tiempo real (SMART-MSP del inglés, sensitive melting after real time analysis-methylation specific PCR). Se trata de una adaptación cuantitativa del método anterior en el que se optimiza, posterior a la amplificación por PCR, de nueva generación se optimiza el análisis del control de calidad por disociación de alta resolución con ayuda de agentes intercalantes. Este método permite distinguir falsos positivos por la conversión ineficiente mediada por el tratamiento con bisulfito.

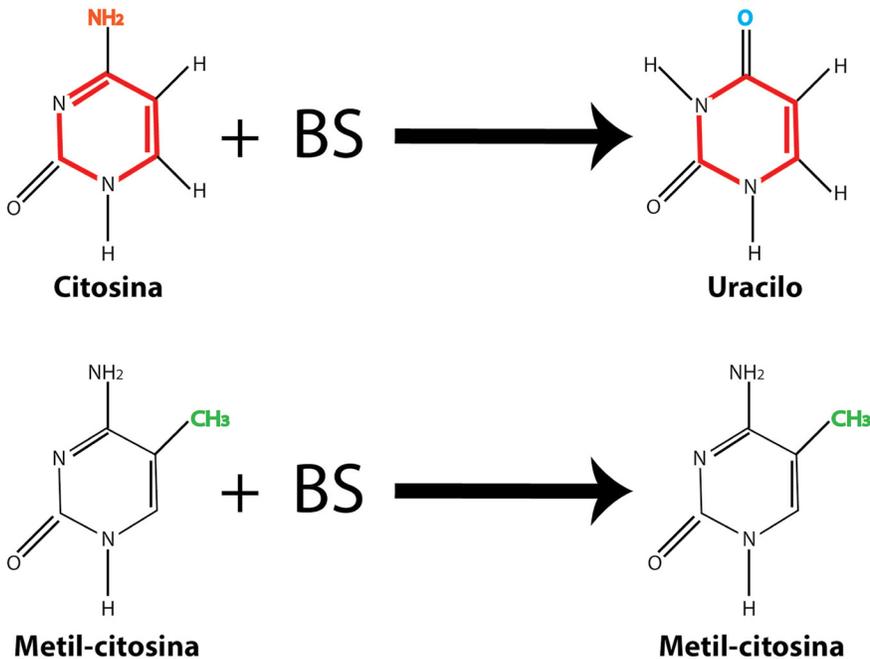


Figura 2. La desaminación de las citosinas no metiladas por tratamiento con bisulfito de sodio (BS) para generar uracilo permite distinguir a las citosinas 5-metiladas que no sufren cambio con el mismo tratamiento.

II. Método de pirosecuenciación.

Es un método cuantitativo para la detección de metilaciones que emplea oligonucleótidos biotinilados para amplificar fragmentos de ≤ 300 pb por PCR (Dejeux y col., 2009). El método requiere al menos 10 ng de ADN pre-tratado con bisulfito de sodio que se amplifica con uno de los cebadores biotinilados (primer pirosecuenciador) en presencia de un nucleótido a la vez (no usa los 4 ddNTPs simultáneamente) cuyo exceso es digerido por una apirasa en cada paso. Así, si se tiene un TTP, al unirse a la adenina mediante la polimerasa libera un PPi que genera ATP (mediante una ATP sulfurilasa) necesario para oxidar la D-luciferina (vía luciferasa) que al formar oxiluciferina se genera una señal que puede ser detectada de manera específica, de acuerdo al orden en que se incorporen los nucleótidos en la reacción. Los fragmentos obtenidos por PCR que estén biotinilados se recuperan con perlas de estreptoavidina y con ayuda de un primer de secuenciación se procesa en un pirosecuenciador automatizado.

III. Detección de metilaciones sin tratamiento con bisulfito.

Este método sustituye el uso de bisulfito de sodio por una digestión del ADN con enzimas de restricción sensibles a y dependientes de metilación más la amplificación por PCR cuantitativa que permite la medición precisa del grado de metilación en sitios determinados (Oakes, y col., 2006). Este método se realiza en un día, no requiere de compuestos radioactivos y el par de oligonucleótidos que se usa es el mismo para la amplificación de todos los templados. Por último, la especificidad de la detección de las metilaciones no depende de los oligonucleótidos sino de las enzimas de restricción utilizadas.

El descubrimiento mediante técnicas analíticas sensibles de formas de metilación derivadas de manera secuencial de la clásica 5-metilcitosina (5mC) o quinta base del genoma, ha dado lugar al mapeo del metiloma humano. Dicho hallazgo ha originado un cambio del paradigma de la metilación restringida a islas CpG que se calcula representa $\sim 1\%$ de las bases del ADN en mamíferos, así como la ocurrencia de metilaciones también en el extremo 3' en casos específicos.

En contraste, la metilación en células troncales alcanza hasta ~25% que incluye a los derivados de la 5mC, éstos son: la 5-hidroxi-metilcitosina (5hmC) o sexta base del genoma (Tahiliani y col, 2009), la 5-formilcitosina (5fC) y la 5-carboxicitosina (5caC). Para la conversión de 5-mC en 5-hmC intervienen las enzimas TET1-TET3 (ten-eleven translocation). La 5hmC es más abundante en tejido cerebral en condiciones normales, en tanto que en distintos tipos de cáncer entre ellos el cáncer de hígado, sus niveles disminuyen notablemente (Pfeifer y col., 2013). Esta reducción puede revertirse introduciendo enzima TET2 en células de melanoma que muestran una subregulación de las enzimas TET, con una reducción concomitante del potencial metastásico (Lian y col, 2012). Aún con esta evidencia, no es clara la función de la sexta base del genoma y de sus subsecuentes modificaciones. El descubrimiento reciente de que tanto la 5hmC como la 5fC pueden expresarse de manera estable en mamíferos, siendo más abundantes en cerebro (mucho menos en hígado) sugiere que estas modificaciones no son únicamente intermediarios de la desmetilación activa (Bachman y col., 2015).

La detección experimental de la quinta y subsecuentes bases del genoma no es posible obtenerse por el método convencional con ADN tratado con bisulfito ya que no permite distinguir entre las citosinas metiladas y las citosinas hidroximetiladas porque éstas no se afectan por el paso de desaminación. Un método alternativo convierte las bases 5mC a 5caC mediante glucosilación y oxidación (por mTet1) y deja los residuos hidroximetilados "protegidos". En un siguiente paso, el ADN se trata con bisulfito de sodio y por lo tanto, las citosinas y 5-caCs son leídas como T y las 5-hidroximetilcitosinas protegidas como C (Yu y col., 2012). Un segundo método primero oxida las 5-hidroxi-metilcitosinas con perrutenato de potasio a 5-formilcitosinas, se trata el ADN con bisulfito y las formilcitosinas y citosinas se leen como T, la secuencia se compara con una secuencia obtenida pretratando con bisulfito, así se puede distinguir entre metilcitosinas e hidroximetilcitosinas (Booth y col., 2012).

Actualmente se cuenta con anticuerpos comerciales para cada especie metilada en el extremo 5', e incluso para metilaciones que ocurren en el extremo 3' y estándares de ADN no metilados, metilados e hidroximetilados para distintas aplicaciones. La espectrometría de masas y la cromatografía bidimensional en capa fina también resultan ser de gran utilidad para discernir entre las distintas metilaciones.

Técnicas para cuantificar modificaciones de histonas

I. Inmunoprecipitación de la cromatina o ChIP. Esta técnica permite la identificación de interacciones entre proteínas y regiones específicas del ADN. La unión proteína-ADN es estabilizada químicamente y posteriormente, el ADN unido a las proteínas es cortado por sonicación o por enzimas de restricción. Esta mezcla se incuba con anticuerpos específicos para las proteínas de interés y el complejo ADN-proteína-anticuerpo es purificado por medio de columnas de afinidad. El ADN se libera tanto de la proteína como del anticuerpo mediante calor, y finalmente el ADN se cuantifica por RT-PCR o PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos. La técnica de ChIP permite analizar las regiones que unen un factor de transcripción al mismo tiempo, aunque es necesario saber previamente cuáles son las regiones blanco para el diseño de oligonucleótidos para PCR.

II. Espectrometría de masas. Como alternativa para la detección de modificaciones postraduccionales en histonas se usa la espectrometría de masas. Esta técnica permite la cuantificación de acetilaciones en lisinas y otras modificaciones menos frecuentes, pero de relevancia para la regulación epigenética (Britton y col., 2011; Henriksen y col., 2012). Esta metodología permite la distinción y comparación de modificaciones presentes en tejidos normales y en procesos patológicos como el cáncer, además de permitir observar posibles combinaciones de estas modificaciones con el reclutamiento de proteínas y enzimas asociadas a la cromatina. Igualmente, la espectrometría de masas permite

distinguir modificaciones “seriadas”; además de glucosilaciones, es posible detectar propionilaciones, butirilaciones, formilaciones y ADP-ribosilaciones (Britton y col., 2011).

Perspectivas de la terapia epigenética

En general, es posible decir que el campo de la epigenética se encuentra en efervescencia y sin duda, un mayor conocimiento de las interacciones necesarias entre los mecanismos genéticos y epigenéticos hará posible el tratamiento integral de distintos tipos de cáncer hepático y otras enfermedades. Debido al carácter reversible de las modificaciones epigenéticas, la terapia epigenética busca el uso de agentes desmetilantes e inhibidores de desacetilasas que promueva una expresión epigenética normal. Se conocen diversos agentes que son capaces de revertir la expresión de genes epigenéticamente silentes pero aún no son suficientemente selectivos y por lo tanto son tóxicos. Algunos inhibidores de la metilación del ADN como la 5-aza-2'-deoxicitina, o de acetilasas como la tricostatina A, tienen efecto suprimiendo o atenuando la activación de las células estrelladas (Zimmer y Lammert, 2011). Recientemente se han reportado datos preliminares de la fase II de pruebas clínicas del belinostat (inhibidor de desacetilasas de histonas de clase I y II), que aparentemente estabiliza el HCA de pacientes en etapa avanzada (Yeo y col., 2012).

Otros estudios a nivel preclínico utilizan antagonistas de miARNs (antagomirs) que secuestran miARN en dúplex pequeños y sin inducir respuesta inmune. Un ejemplo exitoso de antagonistas son los ácidos nucleicos cerrados (LNA, locked nucleic acids) que son análogos conformacionales bicíclicos de ARN y que se administran por vía intravenosa o subcutánea para secuestrar al miR-122 del hígado (Herceg y Paliawl, 2011; Szabo y col., 2013). Entre los blancos para realizar terapia génica se encuentra el miR-199a/b-3p por su gran potencial antitumoral. Actualmente se prueban métodos para dirigir hacia el hígado u otros

órganos, ARN interferente o miARN dúplex al hígado y otros órganos, usando lípidos catiónicos o nanopartículas (Szabo y col., 2013).

Agradecimientos

Se agradecen las sugerencias del Dr. Marco Antonio Briones Orta, quien actualmente labora en el Institute of Hepatology, Foundation for Liver Research en Londres, Reino Unido. A la Revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias, A.C, por la autorización para reproducir figuras incluídas en la portada del capítulo. Se agradece a Jorge Bravo-Martínez la elaboración del material gráfico de este capítulo. A Javier Gallegos por su ayuda en la localización de referencias especializadas.

Referencias

- Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, et al. (2012). Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* **130**:1319-1328.
- Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, Burgess HE, Iurlaro M, et al. (2015). 5-Formyl-cytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nature Chem Biol* **11**:555-557.
- Bednar J, Dimitrov S. (2011). Chromatin under mechanical stress: from single 30 nm fibers to single nucleosomes. *FEBS J* **278**:2231-2243.

- Bird A. (2001). Methylation talk between histones and DNA. *Science* **294**:2113-2115.
- Booth MJ, Branco MR, Ficz G, Oxley D, Krueger F, et al. (2012). Quantitative sequencing of 5-methyl cytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science* **336**:934-937.
- Britton LMP, Gonzales-Cope M, Zee BM, Garcia BA. (2011). Breaking the histone code with quantitative mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics* **8**:631-643.
- Candiloro ILM, Mikeska T, Dobrovic A. (2011). Closed-tube PCR methods for locus-specific DNA methylation analysis. *Methods Mol Biol* **791**:55-71.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acid Res* **22**:2990-2997.
- Davey Ca, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **319**:1097-1113.
- Dejeux E, El abdalaoui H, Gut IG, Tost J. (2009). Identification and quantification of differentially methylated loci by the pyrosequencingTM technology. *Methods Mol Biol* **507**:189-205.
- Delgado-Coello BA. ¿Qué es la epigenética? (2011). *Revista Ciencia de la Academia Mexicana de Ciencias* **62**:73-82.
- Du Y, Kong G, You X, Zhang S, Zhang T, et al. (2012). Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18. *J Biol Chem* **287**:26302-26311.

- Gutschner T, Diederichs S. (2012). The hallmarks of cancer. A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol* **9**:703-719.
- Herceg Z, Paliwal A. (2011). Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: How environmental factors influence the epigenome. *Mut Res* **727**:55-61.
- Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, et al. (2011). Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* **19**:232-243.
- Issa J-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Rev* **4**:988-993.
- Li YY. (2012). Genetic and epigenetic variants influencing the development of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **18**:6546-6551.
- Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, et al. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* **150**:1135-1146.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**:251-260.
- Mandrekar P. (2011). Epigenetic regulation in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* **17**: 2456-2464.
- Mann DA. (2014). Epigenetics in liver disease. *Hepatology* **60**:1418-1425.
- Marquardt JU, Factor VN, Thorgeirsson SS. (2010). Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications. *J Hepatol* **53**:568-577.

- Mensaert K, Denil S, Trooskens G, Van Criekinge W, Thas O, De Meyer T. (2014). Next- generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. *Environ Mol Mutagen* **55**:155-170.
- Melo SA, Esteller M. (2011). Dysregulation of microRNAs in cancer: Playing with fire. *FEBS Lett* **585**:2087-2099.
- Moghe A, Joshi-Barve S, Ghare S, Gobejishvili, Kirpich I, McClain CJ. (2011). Histone modifications and alcohol-induced liver disease: are altered nutrients the missing link? *World J Gastroenterol* **17**: 2465-2472.
- Nishida N, Kudo M, Nagasaka T, Ikai I, Goel A. (2012). Characteristic patterns of altered DNA methylation predict emergence of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**:994-1003.
- Oakes CC, La Salle S, Robaire B, Trasler JM. (2006). Evaluation of a quantitative DNA methylation analysis technique using methylation-sensitive/dependent restriction enzymes and real-time PCR. *Epigenetics* **1**:146-152.
- Pfeifer GP, Kadam S, Jin S-G. (2013). 5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer. *Epigenetics Chromatin* **6**:10.
- Recillas-Targa F, de la Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes E. (2011). Insulation of tumor suppressor genes by the nuclear factor CTCF. *Biochem Cell Biol* **89**:479-488.
- Sceusi EL, Loose DS, Wray C. (2011). Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB* **13**:369-376.
- Szabo G, Sarnow P, Bala S. (2013). MicroRNA silencing and the development of novel therapies for liver disease. *J Hepatol* **57**:462-466.

- Takahashi K, Yan I, Haga H, Patel T. (2014). Long noncoding RNA in liver diseases. *Hepatology* **60**:744-753.
- Tao R, Li J, Xin J, Wu J, Guo J, et al. (2011). Methylation profile of single hepatocytes derived from hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* **6**:e19862.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**:930-935.
- Yeo W, Chung HC, Chan SL, Wang LZ, Lim R, et al. (2012). Epigenetic therapy using belinostat for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a multicenter phase I/II study with biomarker and pharmacokinetic analysis of tumors from patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Research Group. *J Clin Oncol* **30**:3361-3367.
- Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song C-X, Jin P, Ren B. (2012). Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Protoc* **7**:2159-2170.
- Zeybel M, Mann DA, Mann J. (2013). Epigenetic modifications as new targets for liver disease therapies. *J Hepatol* **59**:1349-1353.
- Zhang G, Wang Q, Xy R. (2010). Therapeutics based on microRNA: a new approach for liver cancer. *Curr Genomics* **11**:311-325.
- Zimmer V, Lammert F. (2011). Genetics and epigenetics in the fibrogenic evolution of chronic liver diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **25**:269-280.

AVANCES EN EL ESTUDIO
EXPERIMENTAL DE LA
**BIOQUÍMICA
HEPÁTICA**

Entre las múltiples motivaciones de los científicos para ejercer su profesión están la inquietud por entender los fenómenos de la naturaleza, plantear preguntas, el desarrollar los procedimientos para alcanzar las respectivas respuestas y por supuesto, el compartir el conocimiento adquirido. En este volumen se hace un reconocimiento a aquellos pilares que han sentado las bases para los fantásticos avances en el estudio de la bioquímica hepática, recopilando aportaciones pioneras que tienden a diluirse en la abrumadora literatura específica del campo. También se han incluido temas de actualidad como lo es la ingeniería de tejidos, que promete soluciones a grandes problemas de impacto clínico y social. Las autoras hemos sido motivadas por el deseo de compartir los conocimientos teóricos y experimentales adquiridos a través de los años en nuestros grupos de trabajo, con los jóvenes interesados en esta área de conocimiento. Agradecemos a los especialistas que cuidadosa y críticamente han leído cada uno de los capítulos, y a nuestros colegas que nos han permitido generosamente compartir detalles experimentales desarrollados en sus laboratorios.

ISBN (Libro electrónico): 978-607-02-9076-3

ISBN (Libro impreso): 978-607-02-9153-1



D.R. 2017
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México

