

La dieta alta en colesterol altera el proceso reparador del factor de crecimiento de hepatocitos

María Concepción Gutiérrez Ruiz*, Mayra Domínguez Pérez, Sandra Rodríguez González, Natalia Nuño Lámbarrí, Cynthia Licon Retama y Luis Enrique Gómez-Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Resumen

El hígado graso representa en la actualidad un problema de salud grave en el mundo occidental. En nuestro país se consume una gran cantidad de alimentos que son ricos en colesterol. El colesterol es un componente importante en las balsas lipídicas, donde se encuentran inmersos muchos de los receptores de factores de crecimiento, por lo que su funcionamiento puede verse alterado en presencia de concentraciones altas del mismo. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-Met son responsables de iniciar una respuesta reparadora tras un daño. En el presente trabajo nos centramos en estudiar el efecto que genera una dieta alta en colesterol en el proceso molecular de reparación mediado por el HGF, tanto en hepatocitos como a nivel tisular. Los resultados muestran un retraso en la activación de la ruta de señalización mediada por HGF, lo cual se traduce en una deficiencia en el proceso de reparación, que en caso de una agresión continua podría favorecer la progresión del daño hepático.

PALABRAS CLAVE: Colesterol. Esteatosis. Factor de crecimiento de hepatocitos.

Abstract

Currently, fatty liver represents a serious public health problem in the Western world. In our country, a large amount of food rich in cholesterol is consumed. Cholesterol is an important component in lipid rafts, where many receptors for growth factors are localized, so its functionality could be altered in the presence of high cholesterol concentration. Hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-Met are known to promote repair after an injury. The aim in the present work was to study the effect of a high cholesterol diet in the molecular repair process mediated by HGF in hepatocytes and liver tissue. Data show a delay in the activation of the HGF-mediated signaling cascade which results in a deficient repair process, that in the case of a continuous aggression could favor the progression of liver damage.

KEY WORDS: Cholesterol. Steatosis. Hepatocyte growth factor.

Introducción

El síndrome metabólico es la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, combina problemas en el metabolismo de glucosa, acción de la insulina, sobrepeso, dislipidemia, un estado proinflamatorio, hipertensión, etc., lo cual eventualmente conduce a la obesidad, a la diabetes tipo 2, a las enfermedades

cardiovasculares y, como se ha venido estudiando ampliamente en los últimos años, a serios problemas hepáticos¹⁻³.

La enfermedad por hígado graso no alcohólica (NAFLD) es la manifestación hepática del síndrome metabólico^{4,5} y se caracteriza por un incremento en el depósito de lípidos en el hígado, el cual, progresivamente, alcanza un estado inflamatorio (esteatohepatitis no alcohólica [NASH]), fibrosis, cirrosis y cáncer hepatocelular (HCC).

Correspondencia:

*María Concepción Gutiérrez Ruiz
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Avda. San Rafael Atlixco, 186
Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.
E-mail: mcgr@xanum.uam.mx

El proyecto fue patrocinado parcialmente con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT # 131707 y 166042), el Estímulo Antonio Ariza Cañadilla, de la Fundación Mexicana para la Salud Hepática, México, y la Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa

Fecha de recepción en versión modificada: 11-11-2011

Fecha de aceptación: 18-05-2012

En EE.UU. se sabe que el 90% de los pacientes con obesidad presentan NAFLD, de los cuales un 10% progresan a NASH, y de ellos un 26% a cirrosis⁵.

Si bien se ha caracterizado el impacto de una dieta rica en ácidos grasos o en carbohidratos en el desarrollo de la NAFLD, se ha dejado a un lado los efectos que tiene en la salud hepática una dieta alta en colesterol; esto toma particular importancia en México, ya que el contenido de colesterol de la dieta del mexicano es 10 veces superior a la que tienen países europeos, sobre todo los de la costa del Mediterráneo. Recientemente, se ha caracterizado los efectos que tiene la sobrecarga de colesterol en los hepatocitos de ratas alimentadas con una dieta hipercolesterolémica (HC)^{6,7}, compuesta por un alimento base para roedores (purina # 5001) suplementada con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio.

El colesterol es importante para el buen funcionamiento celular. Es componente central de las balsas lipídicas, por lo que una disminución o aumento de los niveles de colesterol afecta seriamente a los componentes proteicos de las balsas, sobre todo cuando se trata de receptores de factores de crecimiento o citocinas⁸.

Datos reportados por Mari, et al.⁹ informan que la sobrecarga de colesterol, y no la de triglicéridos, en el hepatocito sensibiliza a la célula a la esteatohepatitis mediada por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y Fas. Por otro lado, el mismo grupo de investigación reportó que el colesterol mitocondrial contribuye a la resistencia de células de hepatocarcinoma a la quimioterapia por un mecanismo dependiente del incremento en el orden de la membrana mitocondrial. El tratamiento con estatinas indujo sensibilidad de las células cancerosas a la doxorubicina⁷, demostrando que al menos existe un efecto, en la resistencia a las terapias anticancerosas, conferido por el colesterol. Lo anterior deja claro que, más que la cantidad de grasa en la célula hepática, es el tipo de ella la que marca una sensibilidad al daño hepático.

En el hígado, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor c-Met son los principales responsables de iniciar una respuesta reparadora tras un daño¹⁰. Las principales respuestas desplegadas por el HGF tendientes a controlar el daño y a reparar el tejido están, básicamente, relacionadas con procesos mitogénicos, motogénicos, morfogénicos, de sobrevivencia y de control del estado redox celular y el estrés oxidante¹¹⁻¹³. Nuestro grupo de investigación ha venido caracterizando ampliamente este último aspecto, habiendo comprobado que el HGF induce la expresión de proteínas antioxidantes y de sobrevivencia por mecanismos que involucran rutas de señalización canónicas de la reparación, como son las mediadas por las proteínas Stat3, Erk, Akt, y por

factores de transcripción como el factor nuclear (NF) κ B, entre otros^{11,12,14}. Entre ellas toma particular importancia la ruta de Erk, la cual inicia cuando receptores con actividad de tirosina cinasa, como c-Met, son activados, generando a su vez una respuesta en cadena mediada por la fosforilación secuencial de los miembros de la ruta como son RAS, RAF, MEK y, finalmente, Erk, quien se transloca al núcleo y permite la fosforilación y activación de factores de transcripción que dirigirán la síntesis de proteínas de reparación, proliferación y sobrevivencia¹⁵.

Se ha visto que los niveles séricos de HGF se elevan tras una agresión aguda con diversos agentes hepatotóxicos como el tetracloruro de carbono (CCl₄), el alcohol, el lipopolisacárido (LPS) o por una hepatectomía parcial¹⁶, y este incremento está relacionado con una recuperación del órgano. El mecanismo de protección y reparación mediado por el HGF ha sido ampliamente estudiado, básicamente, en modelos de hepatectomía parcial y por agentes químicos tóxicos, sin embargo, se desconoce cómo se da este proceso en condiciones de sobrecarga de lípidos en las células hepáticas, principalmente de colesterol. En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de las rutas moleculares que despliega el HGF tanto en hepatocitos como en el hígado de ratones que han sido sometidos a una dieta rica en colesterol por 2 días.

Material y métodos

Materiales

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich de México, salvo cuando se indique lo contrario. Los anticuerpos, tanto primarios como secundarios, fueron adquiridos en Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology). El HGF recombinante humano fue adquirido en Peprtech México, y se usó siempre a una concentración de 50 ng/ml. Los estuches comerciales de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para las citocinas estudiadas fueron de la marca R&D Systems.

Aislamiento y cultivo de hepatocitos de ratón

Para el aislamiento de hepatocitos de ratón se utilizó la técnica de la doble perfusión con colagenasa, de acuerdo con lo reportado previamente por Gómez-Quiroz, et al. (2008)¹¹. Brevemente, el hígado es perfundido con 30 ml de una solución amortiguadora salina de Hanks (HBSS) suplementada con EGTA, para eliminar el calcio que media la interacción entre los hepatocitos; posteriormente se perfundió con 50 ml de una solución compuesta por medio

Williams suplementado con colagenasa al 0.03%; al término de esta segunda perfusión el hígado se recupera y se homogeneiza en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino. La suspensión celular se centrifugó en percoll para eliminar las células muertas de las vivas. Se determinó la viabilidad por la técnica de azul de tripano. Finalmente, los hepatocitos viables se sembraron a una densidad de 1.25×10^5 cel/cm² y se dejó estabilizar el cultivo por 4 h, al término de lo cual se cambió el medio por otro sin suero hasta la realización de los experimentos.

Inmunoanálisis: Western blot

Finalizado el tratamiento, las células fueron recuperadas, lisadas con el amortiguador de lisis M-Per (Pierce Chemical, Rockford, IL) y sometidas a una electroforesis en geles en gradiente 4-20% Duramide (Lonza). La proteína se transfirió a una membrana de polivinilidenedifluoruro (PVDF) (Bio-rad) y se continuó con el procedimiento estándar de *Western blot*, según lo hemos reportado previamente¹⁴. Los anticuerpos usados en el presente estudio fueron contra: catalasa, γ -glutamil cisteinil sintetasa (GCS), actina, y contra las formas totales y fosforiladas de STAT3, Akt, RAS, MEK, RAF, Erk y c-Met. La detección se llevó a cabo empleando un estuche comercial de quimioluminiscencia (GE Health Care).

Determinación de proteínas oxidadas

La determinación de proteínas oxidadas es un marcador indiscutible de estrés oxidante; esta determinación se realizó empleando el estuche comercial Oxyblot (Millipore) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Histología y determinación de lípidos por aceite rojo O

Los hígados obtenidos de los animales fueron fijados con paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) por 12 h; al término fueron lavados con PBS e incluidos en medio óptimo de corte (OCT) en criomódulos y congelados en nitrógeno líquido. Una vez estabilizados por 2 h a -70 °C, se hicieron cortes de 8 μ m y se montaron en laminillas de vidrio cargadas positivamente, y se procedió a la realización de la técnica de tinción de lípidos con aceite rojo O siguiendo el protocolo reportado por Mari, et al. (2006)⁹.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se realizó por medio de la técnica del ácido bicinonínico, empleando el

estuche comercial BCA kit (Pierce). Se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Determinación de peróxidos

El contenido de peróxidos fue determinado usando la diclorofluoresceína (DCFH), la cual emite fluorescencia en presencia de peróxidos. Se sembraron 50,000 cel/pozo en placas de 96 pozos, se dejó estabilizar el cultivo por 12 h y se adicionó la DCFH a una concentración final de 3 μ M por 30 min. Pasado el tiempo de incubación la placa se llevó a un detector multimodal DTX 880 (Beckman Coulter) y se excitó a 480 nm. La detección se realizó a 520 nm; los datos se reportan como unidades arbitrarias de fluorescencia por número de células.

Determinación de los niveles séricos de citocinas por *enzyme-linked immunosorbent assay*

La determinación en suero de HGF, TNF- α e interleucina 6 (IL-6) se realizó por medio de la técnica de ELISA empleando ensayos comerciales (R&D Systems) siguiendo el protocolo del fabricante.

Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en por lo menos tres eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados se hizo empleando el análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey. El nivel de significancia fue de p inferior a 0.05.

Resultados

Con la finalidad de investigar los efectos que genera a nivel hepático un incremento en la ingesta de colesterol, sometimos a un grupo de ratones a una dieta HC compuesta por un alimento balanceado para roedores (chow), suplementado con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio por 48 h. Los animales control recibieron sólo la dieta chow.

En la figura 1 se puede observar el aspecto macroscópico del hígado de un ratón sometido a una dieta regular (Fig. 1 A) y un ratón sometido a la dieta HC (Fig. 1 D), como se puede observar, este último presenta cambios en la coloración característica de un hígado sano, tornándose a un color rosado pálido por el gran contenido de lípidos depositados en el órgano, el incremento en el depósito de lípidos fue corroborado por histología usando la técnica de aceite rojo O,

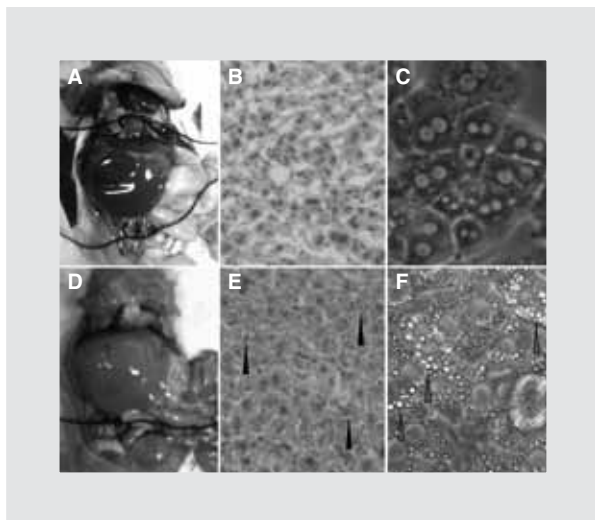


Figura 1. La dieta HC induce esteatosis. **A:** aspecto macroscópico del hígado con dieta chow. **B:** HC. **C:** histología con tinción de aceite rojo O de tejido hepático de ratón con dieta chow. **D:** con dieta HC. Hepatocitos en cultivo primario de ratones con dieta. **E:** chow, y con dieta HC. **F:** imágenes representativas de al menos tres animales diferentes.

la cual permite determinar la presencia de lípidos neutros en el tejido. La figura 1 E muestra una gran cantidad de microvesículas lipídicas que es característico del hígado con esteatosis generado por la dieta HC⁹, efecto que no se observa en el tejido de ratones alimentados con la dieta chow (Fig. 1 B). Para determinar de manera más precisa la acumulación de lípidos, aislamos hepatocitos de los ratones alimentados con ambas dietas y los sometimos a cultivo por 12 h, la figura 1 F muestra el incremento de vesículas lipídicas en los hepatocitos en comparación con las células de los ratones alimentados con la dieta chow (Fig. 1 C).

Con la finalidad de conocer si la dieta alta de colesterol afecta a la capacidad de reparación mediada por el HGF, los hepatocitos aislados de ratones sometidos a ambas dietas fueron sembrados en cajas de 6 cm y se dejaron estabilizar los cultivos por 12 h en medio sin suero. Posteriormente, se hizo una herida en el cultivo con una punta de micropipeta de 10 µl y se adicionó 50 ng/ml de HGF por diferentes tiempos. La figura 2 muestra el resultado de un ensayo herida-cicatriz. Como se observa, el HGF indujo en los hepatocitos chow un claro efecto reparador desde las 24 h de tratamiento, caracterizado por la motogénesis de las células, las cuales tienden a reparar o sellar la herida que se generó, efecto que no se observó en los cultivos no tratados (NT). En el caso de los hepatocitos HC el efecto del HGF es nulo a las 24 h, viéndose un inicio incipiente y retrasado a las 48 h. Los datos sugieren que la sobrecarga de colesterol en los hepatocitos genera un efecto reparador deficiente y tardío mediado por el HGF.

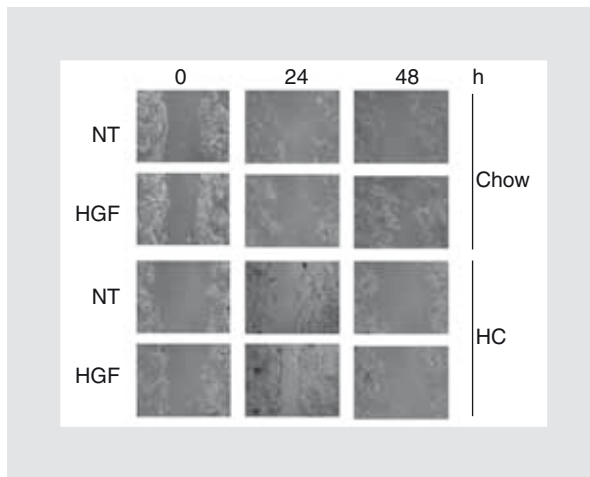


Figura 2. Ensayo de herida-cicatriz. Hepatocitos de ratones alimentados con dieta chow y con dieta HC fueron sembrados y estabilizados. Posteriormente se hizo una herida como se indica en material y métodos, y se dejó el cultivo a los tiempos indicados. Las fotografías fueron tomadas 24 y 48 h después del tratamiento con HGF (50 ng/ml). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Con el objetivo de caracterizar la transducción de señales mediada por el HGF y su receptor c-Met, realizamos un ensayo curso-temporal por *Western blot* para analizar el estado de activación de c-Met por la fosforilación en la tirosina 1365. Las células de animales con ambas dietas fueron tratadas o no con HGF por 0, 0.5, 1, 5, y 15 min. En la figura 3 se puede observar que en las células chow se incrementa la fosforilación de c-Met a los 30 s después de iniciarse el tratamiento con HGF, manteniéndose elevado al minuto y decayendo a valores normales a los 5 min, mientras que en el caso de los hepatocitos HC se eleva a los 5 min y a los 15 min está a niveles del control. Lo anterior estuvo relacionado con la activación de una de las principales proteínas blanco de la ruta de HGF/c-Met río abajo, como es Akt; la fosforilación de Akt en las células chow se observó al minuto de tratamiento, mientras que en las células HC se presentó hasta los 15 min después de iniciado el tratamiento. Estos resultados generan una explicación molecular del proceso de reparación retrasado que se observó en el ensayo de herida-cicatriz (Fig. 2).

A continuación, el estudio se centró en caracterizar el tipo de daño en nuestro modelo. Previamente, el grupo de Fernández-Checa había reportado que, en ratas alimentadas con la misma dieta que hemos empleado, se presentaban desórdenes a nivel mitocondrial generando estrés oxidante⁹, por lo que decidimos corroborar si en nuestro modelo en ratones teníamos condiciones oxidantes que puedan explicar el desorden observado. Procedimos a evaluar los niveles de peróxidos

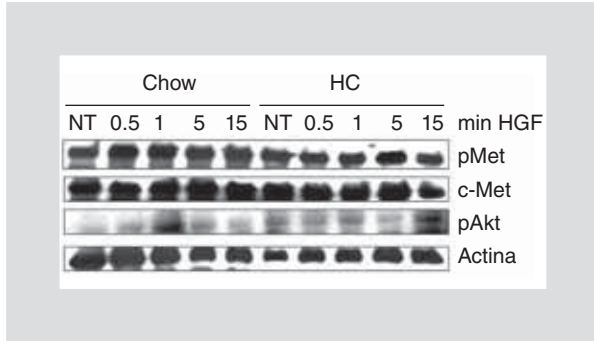


Figura 3. Ensayo curso temporal de la activación de c-Met y Akt. Hepatocitos de ratones alimentados con dieta chow o con dieta HC fueron tratados con 50 ng/ml de HGF por los tiempos indicados. Se extrajo la proteína total y se procedió a realizar en los estudios de Western blot, como se indica en material y métodos. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. La actina se usó como control de normalización de carga.

generados por la dieta HC. En la figura 4 A se presentan los resultados, observándose que las células HC generaron un incremento significativo de peróxidos en comparación con las células chow. Lo anterior se relacionó con una elevación de proteínas oxidadas, las cuales son consecuencia de un incremento en el contenido de moléculas oxidantes (Fig. 4 B).

Con la finalidad de evaluar el efecto protector inducido por el HGF, evaluamos la expresión de dos de las principales enzimas antioxidantes como son la catalasa y la γ -GCS, que es la enzima limitante en la síntesis del glutatión, principal agente hepatoprotector. Hepatocitos provenientes de animales sometidos a las dos dietas fueron tratados con 50 ng/ml de HGF por 3, 6, 12 y 24 h, se extrajo la proteína total y se realizó una serie de *Western blot* usando anticatalasa y anti- γ -GCS. Como se puede observar en la figura 5 A, el HGF indujo la expresión de ambas enzimas en los hepatocitos chow, sin embargo, en las células HC se observó una disminución de las dos proteínas investigadas, sugiriendo un restablecimiento del estado redox celular inducido por el HGF. Para corroborar lo anterior se realizó un ensayo para determinar el contenido de las proteínas oxidadas bajo el tratamiento con HGF, observándose en las células HC que este tratamiento tiende a revertir el estado oxidante, en comparación con las células chow. Los resultados sugieren que el HGF protege a las células contra los efectos oxidantes inducidos por la dieta HC.

Finalmente, para tener una aproximación *in vivo* del fenómeno de estudio, decidimos tratar a una serie de animales de experimentación con ambas dietas, con una dosis única de 0.4 μ g/g de peso de CCl_4 , 24 h después se recuperó la sangre y el tejido hepático para hacer la

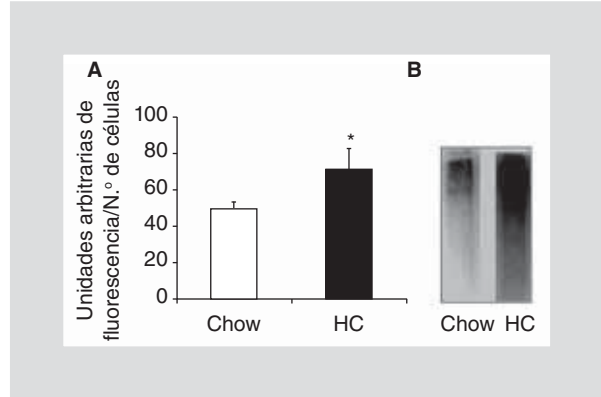


Figura 4. La dieta HC induce estrés oxidante. Hepatocitos en cultivo obtenidos de ratones alimentados con la dieta normal chow o con la dieta HC fueron usados para determinar: la generación de peróxidos empleando la DCFH (A) y para determinar el contenido de proteínas oxidadas en lisado total celular (B). Las barras representan el promedio \pm ES. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes ($p \leq 0.05$) con respecto a las células de animales con dieta chow.

determinación de citocinas de reparación hepática en sangre y *Western blot* en lisado total de hígado.

Se midieron los niveles séricos de HGF, TNF- α e IL-6 a las 24 h después de la inyección con CCl_4 . En la figura 6 se muestra que, tras la inyección con el agente hepatotóxico, los niveles de HGF se incrementan

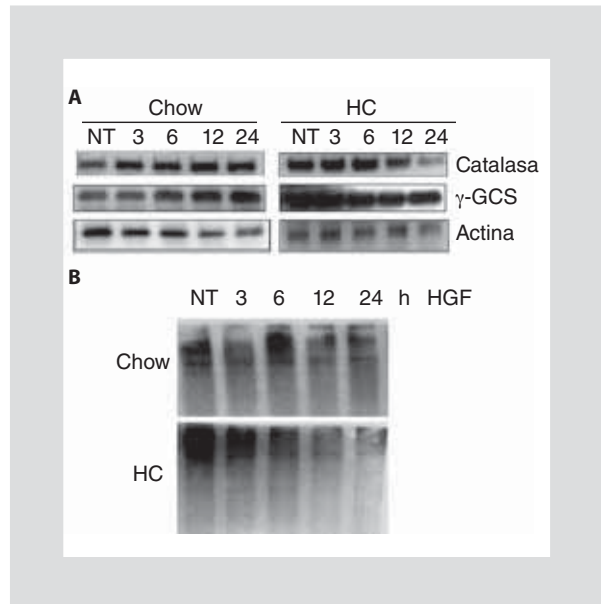


Figura 5. El HGF contrarresta el estrés oxidante generado por la dieta HC. Hepatocitos en cultivo obtenidos de ratones alimentados con la dieta Chow o con la dieta hipercolesterolémica (HC) fueron tratados con 50 ng/ml de HGF por los tiempos indicados, se aisló la proteína total y se sometió a: A: análisis por Western blot de catalasa y gama-glutamyl cisteinil sintetasa (γ -GCS) y B: Oxidación de proteínas por oxyblot. La actina se usó como control de carga.

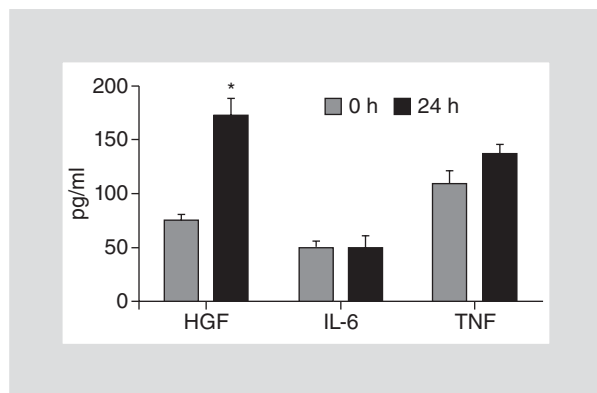


Figura 6. El CCl_4 induce el incremento de HGF en suero. Ratones macho de la cepa CD1 fueron inyectados con CCl_4 (0.4 μ g/g), 24 h después se sacrificaron y se extrajo suero para la cuantificación de HGF, IL-6 y TNF- α por el método de ELISA. Las barras representan el promedio de al menos tres ratones \pm ES ($p \leq 0.05$) con respecto a los ratones a 0 h (sin CCl_4).

notablemente, mientras que los niveles de IL-6 y TNF- α permanecen sin cambios. Lo anterior demuestra que el HGF es el primer factor que se incrementa tras una agresión a nivel hepático.

Decidimos explorar el estado que guardan las principales proteínas de reparación que son activadas por el HGF, como son Stat3, Akt y Erk, realizamos *Western blot* de ellas en homogenado total de hígado. Los resultados muestran que no hay cambios significativos en Stat3, ni en Akt (datos no mostrados). Sin embargo, en Erk y las proteínas de la ruta que la activa se encontraron cambios significativos, como se puede observar en la figura 7 A. La ruta canónica de Erk está activada en todos sus niveles, presentando un incremento en la fosforilación de RAS, RAF, MEK y Erk en los tratamientos con el CCl_4 en animales alimentados con ambas dietas. Sin embargo, la activación es mucho más marcada en los animales con HC, sobre todo en RAS; esto puede deberse a que RAS puede ser activado no sólo por c-Met sino por otros receptores de factores de crecimiento o citocinas que se encargan también de iniciar una señal de reparación. Interesantemente, otros de los reguladores de la ruta, como la fosfatasa SHP2, se encuentra también muy activada pero sólo en los animales alimentados con la dieta HC, siendo ligeramente mayor dicha activación en los hígados de los animales que recibieron el tóxico.

Discusión

El HGF a través de su receptor c-Met despliega una gran variedad de rutas de señalización que tienden a reparar el tejido dañado y a mantener la homeostasis celular. Originalmente, el HGF fue identificado como un potente mitógeno para hepatocitos adultos¹⁷, sin embargo

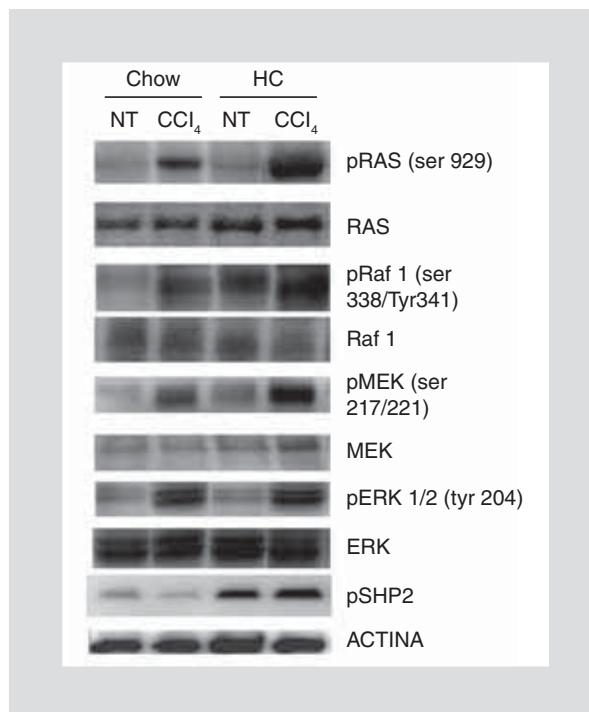


Figura 7. La ruta de RAS/Erk se activa por efectos del CCl_4 . Ratones alimentados con la dieta chow o con la dieta HC recibieron una inyección intraperitoneal (ip) de tetracloruro de carbono (0.4 μ g/g), 24 h después se extrajo la proteína total y se sometió a un análisis por *Western blot* de las proteínas fosforiladas y totales de RAS, RAF, Mek, Erk y Shp2. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. La actina se usó como control de carga.

se ha venido caracterizando muchas otras funciones, además de la de proliferación; particularmente, nuestro grupo de investigación se ha venido enfocando en los años previos a la caracterización de la respuesta antioxidante del HGF en distintas patologías hepáticas^{11,14}. En el presente trabajo nos centramos en estudiar el efecto que genera una dieta alta en colesterol en el proceso molecular de reparación mediado por el HGF, tanto en hepatocitos como a nivel tisular.

Nuestros resultados muestran que, tras 2 días con la dieta HC, el hígado responde almacenando lípidos, lo cual lo determinamos con la técnica de aceite rojo O (Figs. 1 B y E), observando una tinción positiva para los animales con la dieta HC, lo cual se corroboró en células en cultivo por microscopía de campo claro (Fig. 1 F). Nuestros datos coinciden con los reportados por Mari, et al.⁹, donde observaron que ratas sometidas a la misma dieta por 2 días presentan un grado de esteatosis microvesicular, elevación de colesterol y ácidos grasos libres (FFA) a nivel hepático.

La sobrecarga de colesterol en los hepatocitos puede generar que los receptores de factores de crecimiento se desestabilicen debido a que muchos de ellos, particularmente c-Met, se encuentran en balsas lipídicas⁸,

donde el colesterol desempeña un papel preponderante en la funcionalidad de estas estructuras membranales¹⁸. De hecho, una de las principales funciones del HGF, como es la de reparar por medio de la inducción de la motogénesis celular, se ve seriamente afectada en los hepatocitos HC, y esto se relacionó con un retraso en la activación de c-Met y Akt (Fig. 3). Los datos sugieren que, si bien los hepatocitos HC responden con la activación de c-Met, ésta se presenta con anomalías, inicialmente con un retraso, lo cual puede generar que los mecanismos compensatorios o inhibidores puedan también activarse y detener la ruta.

Mari, et al.⁹ reportaron que el principal organelo afectado por la dieta alta en colesterol es la mitocondria, generando especies reactivas de oxígeno que condiciona al daño hepatocelular. Por lo anterior, en nuestro estudio exploramos si el HGF es capaz de iniciar, como parte de una respuesta reparadora, la activación de medidas antioxidantes que tiendan a disminuir el daño oxidante. Comprobamos en nuestro modelo que, efectivamente, el colesterol genera el incremento de especies reactivas de oxígeno y daño oxidante, juzgado por el incremento notable de proteínas oxidadas (Fig. 4). Previamente, reportamos que el HGF protege contra el daño oxidante generado por el metabolismo de etanol incrementando la expresión de proteínas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa¹⁴. Hemos podido comprobar en este estudio que el mecanismo es prácticamente el mismo: el HGF incrementa la expresión de proteínas antioxidantes como un mecanismo central de hepatoprotección, lo cual se ve reflejado en la disminución notable en el contenido de proteínas oxidadas en las células provenientes de ratones alimentados con la dieta HC.

Para corroborar las observaciones de nuestros estudios *in vitro*, decidimos tratar con CCl₄ a los ratones alimentados con la dieta HC y con la dieta chow, recibiendo una dosis aguda subletal de 0.4 µg/g 24 h. Los datos corroboraron lo previamente observado; los valores de HGF se elevaron significativamente como respuesta al daño hepático (Fig. 6) y permitió la activación de la ruta de sobrevivencia mediada por RAS/Erk (Fig. 7). Los datos presentados muestran claramente que, en el animal de experimentación, el CCl₄ induce un estado de activación elevado de la ruta RAS/Erk en el hígado HC comparado con el hígado control (chow) sólo con el tóxico. La principal diferencia que encontramos es la activación significativa únicamente en los hígados HC de la fosfatasa Shp2, la cual se ha reportado tener funciones controversiales, reportando en unos casos que la sobreactivación de

la fosfatasa incrementa y estabiliza la ruta RAS/Erk y en otros casos la de inhibirla¹⁹. Nuestros resultados muestran que, si bien el proceso de reparación se ve retrasado, termina ocurriendo, al menos, bajo nuestro diseño experimental y las dosis subletales que hemos usado.

En conclusión, el presente trabajo muestra que una dieta alta en colesterol genera una deficiencia en el proceso de reparación hepática mediada por el HGF, debido a un retraso en la activación de la ruta de señalización. Nuestro modelo presenta sólo los efectos agudos ante una segunda agresión, sin embargo estímulos sostenidos oxidantes bajo un ambiente donde predomina un proceso alterado de reparación puede condicionar a procesos crónicos o de transformación que pueden derivar en procesos carcinogénicos, como ha sido probado en ratones deficientes en la señalización de Met¹³.

Bibliografía

1. Ashburn DD, Reed MJ. Gastrointestinal system and obesity. *Crit Care Clin.* 2010;26:625-7.
2. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005;365:1415-28.
3. Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology.* 2002;35:1485-93.
4. Park EJ, Lee JH, Yu GY, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell.* 2010;140:197-208.
5. Siegel AB, Zhu AX. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. *Cancer.* 2009;115:5651-61.
6. García-Ruiz C, Mari M, Colell A, et al. Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol Histopathol.* 2009;24:117-32.
7. Montero J, Morales A, Llacuna L, et al. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2008;68:5246-56.
8. Seveau S, Bierne H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P. Role of lipid rafts in E-cadherin- and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol.* 2004;166:743-53.
9. Mari M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab.* 2006;4:185-98.
10. Bertotti A, Comoglio PM. Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem Sci.* 2003;28:527-33.
11. Gómez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgerisson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2008;283:14581-9.
12. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgerisson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest.* 2006;116:1582-95.
13. Takami T, Kaposi-Novak P, Uchida K, et al. Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodietylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2007;67:9844-51.
14. Valdés-Arzate A, Luna A, Bucio L, et al. Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:424-30.
15. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene.* 2000;19:5582-9.
16. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86:588-610.
17. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;122:1450-9.
18. Dolganiuc A. Role of lipids in liver health and disease. *World J Gastroenterol.* 2011;17:2520-35.
19. Chan G, Kalaitzidis D, Neel BG. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:179-92.