

La acumulación de colesterol en hepatocitos sobreactiva el fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NADPH) oxidasa pero abroga la respuesta de protección del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

Alberto G. López-Reyes^{1,2}, Karina Martínez-Flores², Denise Clavijo-Cornejo², Natalia Nuño-Lámbarrri³, Mayrel Palestino-Domínguez³, Verónica Souza^{3,4}, Leticia Bucio^{3,4}, Arturo Panduro^{4,5}, Roxana U. Miranda^{3,4}, Luis Enrique Gómez-Quiroz^{3,4} y María Concepción Gutiérrez-Ruiz^{3,4*}

¹Doctorado en Biología Experimental, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F., México; ²Laboratorio de Sinovioanálisis, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F., México; ³Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D.F., México; ⁴Red Fisiopatología de las Enfermedades Hepáticas, PROMEP-SEP, México D.F., México; ⁵Departamento de Biología Molecular en Medicina, Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal., México

Resumen

El incremento en la prevalencia de la obesidad en México está generando también el aumento de varias enfermedades crónicas, entre ellas las relacionadas con el hígado. Datos experimentales muestran que es el tipo de lípido, más que el contenido de ellos, lo que marca la susceptibilidad al daño hepático. La sobrecarga de colesterol en el hígado conduce al agravamiento en el daño inducido por otros agentes tóxicos; sin embargo, poco se ha explorado con respecto al estado que guarda la protección celular, sobre todo aquella mediada por el NADPH oxidasa e inducida por el HGF. En el presente trabajo nos centramos en estudiar los efectos de la sobrecarga de colesterol en el proceso de protección mediado por la vía de HGF/NADPH oxidasa. Los resultados muestran que una dieta hipercolesterolémica indujo daño hepático y esteatosis en ratones. Los hepatocitos aislados de estos animales mostraron una sobreactivación de la oxidasa, pero no respondieron al efecto del HGF. La dieta hipercolesterolémica disminuyó la expresión de los componentes del NADPH oxidasa, lo cual se ve compensado por un incremento en la actividad. En conclusión, la sobrecarga de colesterol impide la protección hepática mediada por el sistema HGF/NADPH oxidasa.

PALABRAS CLAVES: Colesterol. Hepatocitos. Esteatosis. NADPH oxidasa. HGF.

Abstract

The increment in the prevalence of obesity incidence in Mexico is leading to the increase in many chronic maladies, including liver diseases. It is well known that lipid-induced liver sensitization is related to the kind of lipid rather than the amount of them in the organ. Cholesterol overload in the liver aggravates the toxic effects of canonical liver insults. However, the status on the repair and survival response elicited by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and the

Correspondencia:

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

Este trabajo fue apoyado por el Conacyt #166042 y #131707.
PROMEP-SEP # 913026-14612111.

Fecha de recepción en versión modificada: 05-06-2014
Fecha de aceptación: 22-01-2015

hepatocyte growth factor (HGF) is not completely understood. In the present, work we aimed to figure out the HGF/NADPH oxidase-induced cellular protection in the hepatocyte with a cholesterol overload. Our results show that a hypercholesterolemic diet induced liver damage and steatosis in mice. The hepatocytes isolated from these animals exhibited an increase in basal NADPH oxidase activity, although transcriptional levels of some of its components were decreased. No effect on the oxidase activity was observed in HGF treatments. The protective effect of HGF was abrogated as a result of cholesterol cellular overload, calculated by a survival assay. In conclusion, the cholesterol overload in hepatocytes impairs the HGF/NADPH oxidase-induced cellular protection. (Gac Med Mex. 2015;151:456-64)

Corresponding author: María Concepción Gutiérrez-Ruiz, mcgr@xanum.uam.mx

KEY WORDS: Cholesterol. Hepatocyte. Steatosis. NADPH oxidase. HGF.

Introducción

La obesidad representa el principal problema de salud pública en nuestra sociedad, ya que, al igual que la diabetes y el síndrome metabólico, son consideradas desórdenes pandémicos en países desarrollados¹.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico; sin embargo, este desorden puede presentarse independiente de este padecimiento, ya que forma parte de la historia natural de muchas de las enfermedades hepáticas².

A pesar de que se asume que el hígado graso es el resultado de la acumulación de triglicéridos (TG), el potencial tóxico de otros lípidos, como el colesterol, ha sido muy poco estudiado. En los últimos años, se han reportado algunos estudios experimentales de que la sobrecarga de colesterol representa, tal vez, el principal mediador tóxico en la NAFLD o la esteatohepatitis^{3,4}. En humanos se ha visto que el colesterol libre se encuentra incrementado en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y se correlacionó con la activación de proteína unidora a elementos de respuesta a esteroides (SREBP-2), factor transcripcional que dirige la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de colesterol⁵.

El colesterol es un lípido con una importancia biológica indiscutible, forma parte fundamental de las membranas biológicas y es precursor de varias hormonas y de sales biliares; sin embargo, la pérdida en el balance de este lípido genera problemas que impactan en la salud, ya sea por falta o bien por exceso de él⁶.

Recientemente hemos publicado que una dieta alta en colesterol (HC) (2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio) altera el proceso reparador en el hígado mediado por el HGF⁴.

El HGF representa uno de los principales mediadores de hepatoprotección cuando interactúa con su receptor, el protooncogén c-Met; se inicia una cascada de señalización mediada por sistemas como PI3K/Akt, Stat3 o Erk, que activan sistemas que confieren sobrevivencia, mitogénesis, motogénesis y protección antioxidante⁷⁻⁹. Nuestro grupo de investigación ha venido caracterizando este último aspecto en los años recientes. Hemos reportado que el HGF es capaz de inducir la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa o la superóxido dismutasa (SOD), que confieren protección contra los efectos tóxicos inducidos por el metabolismo de etanol⁸ o por los fármacos antifímicos rifampicina e isoniazida¹⁰. Por otro lado, hemos reportado que la ausencia de señalización de c-Met condiciona la gravedad de procesos fibrogénicos¹¹ y carcinogénicos^{12,13} en estudios llevados a cabo en ratones con eliminación condicional de c-Met en el hígado.

Recientemente, hemos publicado que el HGF/c-Met regula sistemas prooxidantes, como el NADPH oxidasa, encontrando que el HGF ejerce un efecto bifásico en el sistema, estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tiempos cortos y reprimiéndolo transcripcionalmente en tiempos superiores a las 12 h de tratamiento con el factor de crecimiento. Esta regulación bifásica demostró en ambos casos ejercer respuestas protectoras y de sobrevivencia en hepatocitos¹⁴. De hecho, análisis transcriptómicos globales o microarreglos llevados a cabo por nuestro grupo han mostrado que la simple eliminación del receptor c-Met incrementa la actividad de NADPH oxidasa y el estrés oxidante por la pérdida del control de c-Met sobre la oxidasa¹².

El NADPH oxidasa es un sistema multicomponente formado por subunidades membranales como las catalíticas NOX1-5 y p22; por otro lado, están las regulatorias que se encuentran en el citosol, como p47,

p67, entre otras, y que son reclutadas por las NOX y p22 para iniciar la producción de ROS, particularmente de anión superóxido¹⁵. Uno de los sistemas más conservados y distribuidos en prácticamente todos los tipos celulares es el sistema de NOX2, el cual requiere de la activación de p47 para una eficiente función. Se sabe que p47 es un regulador central en la actividad de la enzima y que es activado por cinasas como la proteína cinasa C, que a su vez es activada por el HGF/c-Met¹⁴.

Partiendo del conocimiento de que las diferentes formas de NADPH oxidasa se encuentran como proteínas integrales de membrana y de que una sobrecarga de colesterol puede afectar notablemente a las membranas celulares, en el presente trabajo nos hemos enfocado en el estudio del efecto regulador ejercido por el HGF en el sistema del NADPH oxidasa en hepatocitos con una sobrecarga celular de colesterol.

Materiales y métodos

Animales

En el presente estudio se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL6 de 8-12 semanas de vida. Los animales se mantuvieron en el bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación y el manejo de los mismos se hizo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y a la *NIH guidelines for the care and use of laboratory animals*. Los animales estuvieron a una temperatura controlada (22 °C), ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h y un régimen de comida y agua de libre acceso. Se formaron dos grupos con 10 animales en cada uno. Los ratones, previo al inicio de la dieta, se dejaron en ayuno durante 12 h. El primer grupo fue alimentado durante 48 h con una dieta balanceada estándar (Chow), y el segundo recibió una dieta hipercolesterolémica consistente en la dieta estándar Chow suplementada con 2% de colesterol y 0.5% de colato de sodio.

Diseño experimental

Al término del tratamiento se extrajo sangre total de los animales de ambos grupos y se separó el suero para realizar pruebas bioquímicas de función hepática, así como para determinar el perfil de lípidos. El tejido hepático fue seccionado para ser fijado con paraformaldehído neutro al 4% y ser embebido en parafina para los estudios histológicos; otra parte fue congelada a -80 °C hasta su utilización.

Histología

Se obtuvieron cortes de 7 µm de los tejidos en parafina y se llevaron a cabo tinciones rutinarias de hematoxilina y eosina.

Pruebas bioquímicas y de función hepática

Las mediciones de aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), colesterol y TG fueron analizadas por un método automatizado empleando el sistema Reflotron (Roche, Inc.).

Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos

Otro grupo de animales se ocupó para el aislamiento de hepatocitos, los cuales se obtuvieron por el método de la doble perfusión con colagenasa, siguiendo el protocolo previamente reportado por Gómez-Quiroz, et al. en 2008¹⁶. Los hepatocitos fueron cultivados en cajas de Petri a una densidad de 250,000 cel/cm² en medio Williams E suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) e incubados en una atmósfera controlada (37 °C, 5% CO₂). La monocapa de hepatocitos adherida a las 4 h fue lavada con *buffer* salino de fosfatos y el medio fue reemplazado por otro libre de SFB.

Los hepatocitos en cultivo se trataron con 50 ng/ml de HGF (PeproTech, EE.UU.) a diferentes tiempos (0.5, 1, 3, 6 y 12 h). Después del tratamiento con HGF las células se utilizaron para la determinación del contenido de lípidos o fueron lisadas para extraer proteína total para *Western blot*. Otro grupo de células se empleó para determinar la actividad del NADPH oxidasa.

Determinación de colesterol libre con filipina

El contenido de colesterol en hepatocitos se determinó empleando la filipina (*filipin*) en hepatocitos aislados de ambos grupos siguiendo el protocolo reportado por Marí, et al.³.

Determinación de ROS en hepatocitos

La determinación de ROS, particularmente del anión superóxido, se realizó de acuerdo a lo reportado previamente¹⁰.

Western blot

El análisis del contenido de proteína se realizó por *Western blot* de acuerdo al protocolo reportado previamente¹⁷. Se utilizaron anticuerpos contra NOX2, p47 y Nrf2, todos ellos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. La normalización de la carga se realizó con antiactina (NeoMarkers, Fremont, CA).

Determinación histológica de lípidos neutros

La determinación de los lípidos neutros se realizó por medio de la técnica del aceite rojo O como se ha reportado previamente⁴.

Actividad del NADPH oxidasa

La actividad de la enzima se realizó por la determinación del anión superóxido en un sistema con inhibición del NADPH oxidasa de acuerdo a lo reportado por Pescatore, et al. en 2012¹⁸.

Ensayo de viabilidad

La viabilidad se determinó empleando el estuche comercial CCK-8 (Dojindo, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron 5,000 cel/pozo en placas de 96 pozos, posteriormente se les retiró el medio y se suplementó con uno fresco libre de suero.

Las células Chow y HC se trataron con antimicina A (AA) (15 μ M) durante 12 h, en presencia o no de HGF (50 ng/ml). Adicionalmente, otro grupo de células fue pretratado con difenil iodonium (DPI), un inhibidor de NADPH oxidasa (10 μ g/ml) 30 min previo al tratamiento con HGF, posteriormente se agregó la AA.

Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó empleando el estuche comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce-Thermo Scientific, Inc.), basado en la técnica del ácido bicinonínico siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los datos están representados como el promedio \pm error estándar en al menos tres experimentos independientes. La comparación entre grupos se realizó por medio de la prueba de *analysis of variance* de una vía

con una prueba *post hoc* de Bonferroni usando el programa informático GraphPad Prism 5 para Mac OS X. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

Resultados

Al término de los dos días de tratamiento los animales no mostraron cambios significativos con respecto a su comportamiento, peso total y del hígado (datos no mostrados). Al realizar la inspección del hígado se notó una coloración pálida en el de los animales que se alimentaron con la dieta HC, tal y como hemos reportado previamente⁴.

Con la finalidad de determinar el fenotipo esteatótico en los animales alimentados con la dieta HC, se realizó una tinción rutinaria de hematoxilina y eosina. La figura 1 B muestra claramente una esteatosis, particularmente microvesicular en comparación con los animales alimentados con la dieta balanceada Chow (Fig. 1 A).

Se realizó un análisis del perfil lipídico en suero en los animales, encontrando el colesterol total (CL) y los TG elevados (Fig. 1 C), sin cambios significativos en HDL y en LDL; igualmente, el CL se encontró elevado en tejido hepático en los animales con HC (Fig. 1 D) respecto a los animales Chow.

El daño en el hígado fue evidenciado por el incremento significativo en las actividades de las enzimas AST, ALT y LDH en los animales HC con respecto a los Chow.

Posteriormente se aislaron los hepatocitos y se mantuvieron como cultivo primario. Con la finalidad de verificar que el proceso de aislamiento y cultivo no afectó a la sobrecarga lipídica tanto de colesterol como de lípidos neutros, se realizó una detección por microscopía del colesterol libre, usando filipina, un antibiótico natural que reconoce al hidroxilo del colesterol libre emitiendo fluorescencia, y por medio del aceite rojo O para los lípidos neutros. La figura 2 B muestra claramente que los hepatocitos de ratones HC presentan mayor fluorescencia con respecto a los Chow; el análisis fluorométrico se evidenció en la figura 2 C. De manera muy similar, los hepatocitos HC mostraron un incremento significativo en el contenido de lípidos neutros en comparación con los Chow (Figs. 2 E y F).

Previamente reportamos que el HGF ejerce un efecto bifásico, en hepatocitos primarios, sobre el NADPH oxidasa, incrementando su actividad a tiempos cortos de tratamiento y disminuyéndola a tiempos largos¹⁴.

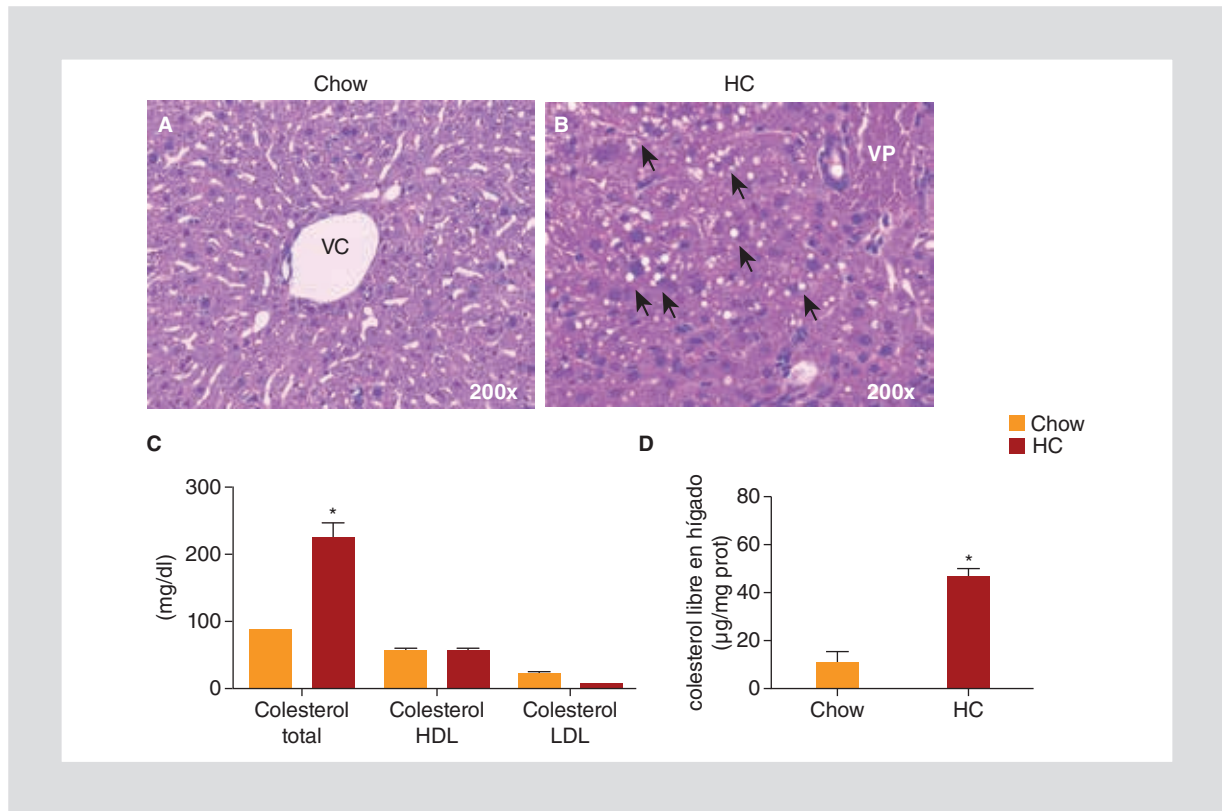


Figura 1. La dieta HC induce esteatosis. Los hígados de animales alimentados con la dieta regular Chow o HC durante dos días fueron extraídos y preparados para un análisis de hematoxilina y eosina. **A:** sección de un hígado Chow. **B:** sección de un hígado HC. Las flechas indican gotas lipídicas. Imágenes representativas de al menos tres animales. Aumento original 200X. **C:** perfil lipídico. **D:** colesterol libre determinado por métodos automatizados. Cada barra representa el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ versus Chow.

Con la finalidad de evaluar si la sobrecarga de colesterol modifica este comportamiento, realizamos un ensayo en la actividad de la enzima determinando la generación de anión superóxido en presencia o ausencia de DPI, un inhibidor de la oxidasa, y de SOD, enzima dismutante del superóxido; la figura 3 muestra que los hepatocitos HC presentan un incremento significativo en la actividad basal (HC NT) en relación a las células no tratadas Chow; sin embargo, el HGF fue incapaz de modificar de alguna forma la actividad de la enzima.

Un análisis en el contenido por *Western blot* de los principales componentes catalíticos (NOX2) y reguladores (p47) del sistema del NADPH oxidasa, así como del factor de transcripción que responde a NADPH oxidasa (Nrf2), fueron analizados por *Western blot*. En la figura 4 se observa el análisis densitométrico de estas proteínas y de los geles representativos (Fig. 4 D). Los datos muestran que lejos de tener un incremento transcripcional se observó una disminución significativa en las células HC NT con respecto al Chow NT. Transcripcionalmente el HGF

indujo una disminución a la 1 y 3 h de tratamiento en NOX2, en p47 a las 3 h y en Nrf2 a las 3 h con respecto al HC NT.

Finalmente, para determinar el estado protector que guarda el HGF en los hepatocitos HC se realizó un estudio de viabilidad con CCK-8. La figura 5 muestra que el HGF fue capaz de proteger ante los efectos prooxidantes de la AA, mientras que las células HC no mostraron efecto protector alguno mediado por el HGF. El inhibidor del NADPH oxidasa DPI abrogó la respuesta protectora del HGF observada en las células Chow sin efecto en las HC.

Discusión

Se ha documentado ampliamente el grave problema que existe en México con la obesidad, particularmente infantil¹⁹, la cual está impactando en el ser humano no sólo en el sistema cardiocirculatorio o en el metabolismo, sino también a nivel hepático, donde se ha venido documentando su impacto en desórdenes como la NAFLD y NASH.

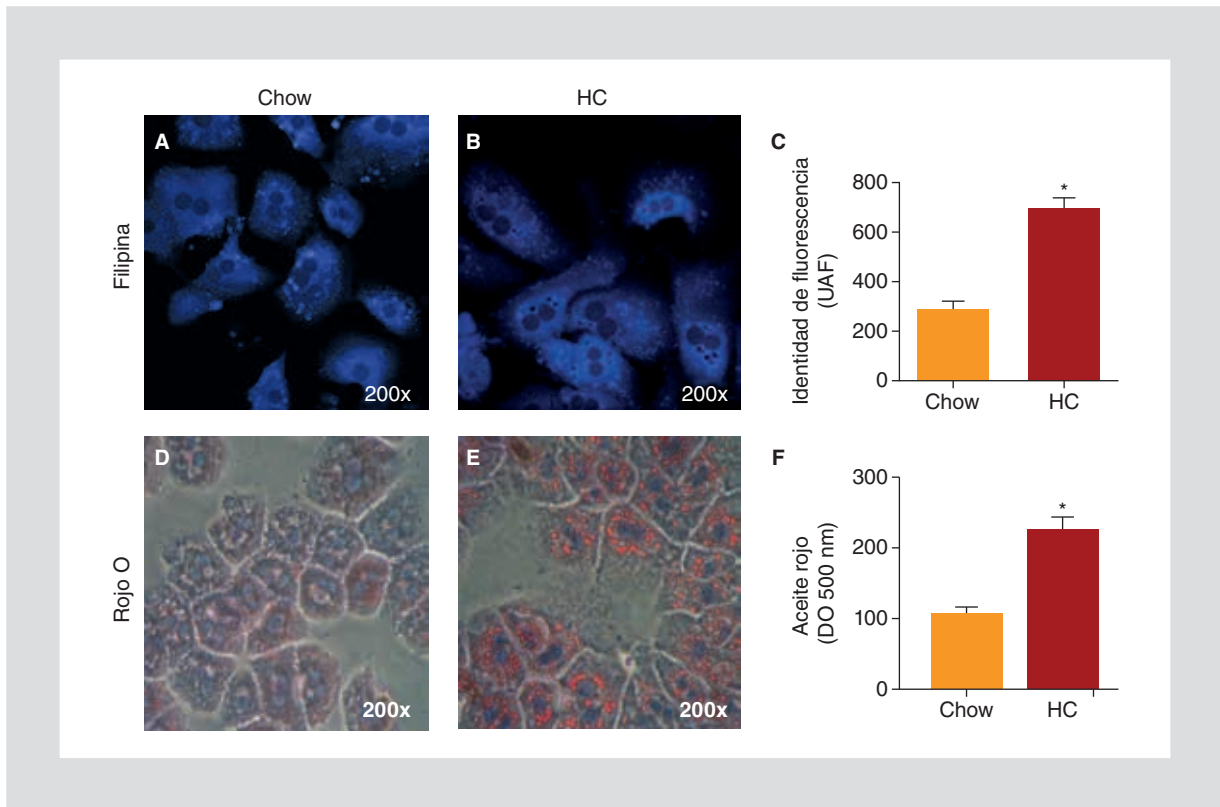


Figura 2. Contenido de colesterol y lípidos neutros en hepatocitos aislados y en cultivo. Los hepatocitos se aislaron por el método de la doble perfusión con colagenasa y se cultivaron en las condiciones especificadas en material y métodos. Se determinó la presencia de colesterol por medio de filipina en hepatocitos Chow (A) y en hepatocitos HC (B). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la filipina (C) se realizó con el software Image J. Los lípidos neutros se detectaron con la prueba de aceite rojo O en hepatocitos Chow (D) y en hepatocitos HC (E). Posteriormente se extrajo el aceite rojo y se cuantificó a 500 nm por espectrofotometría (F). Las fotografías se muestran a un aumento original de 200X. Cada barra representa el promedio \pm SEM. UAF: unidad arbitraria de fluorescencia. * $p < 0.05$ versus Chow.

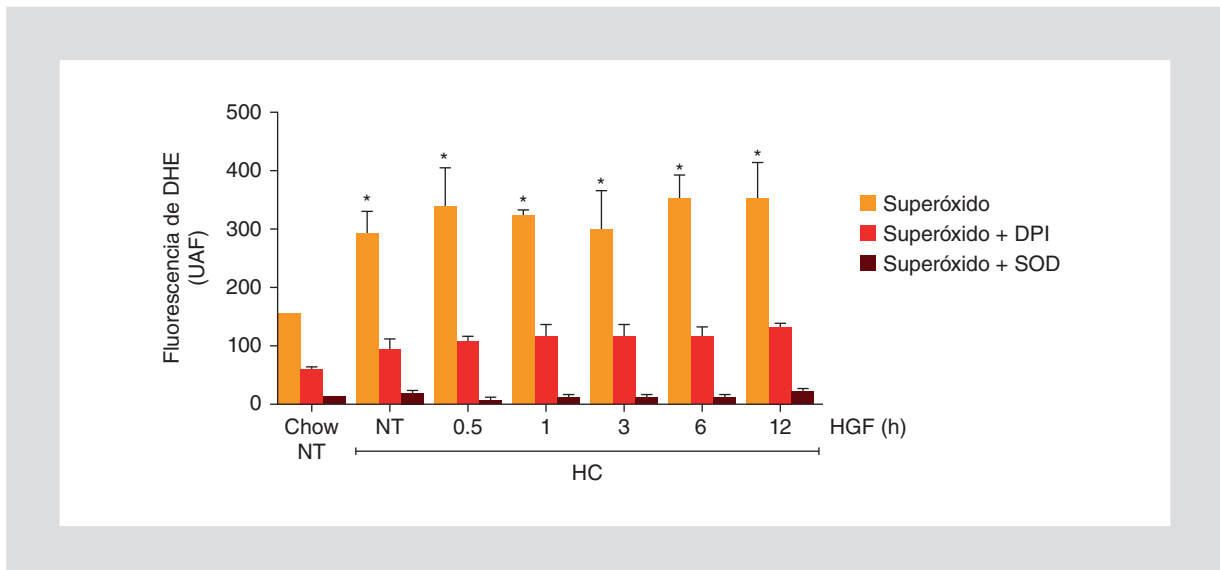


Figura 3. Actividad de NADPH oxidasa. Los hepatocitos fueron aislados de ratones Chow y de HC, se cultivaron y se trataron o no con 50 ng/ml de HGF durante los tiempos indicados. Se cuantificó la producción de anión superóxido de acuerdo a la técnica especificada en el apartado «Materiales y métodos» en presencia o no del inhibidor de NADPH oxidasa DPI o de la enzima SOD. Cada barra representa el promedio \pm SEM de las UAF. * $p < 0.05$ versus Chow.

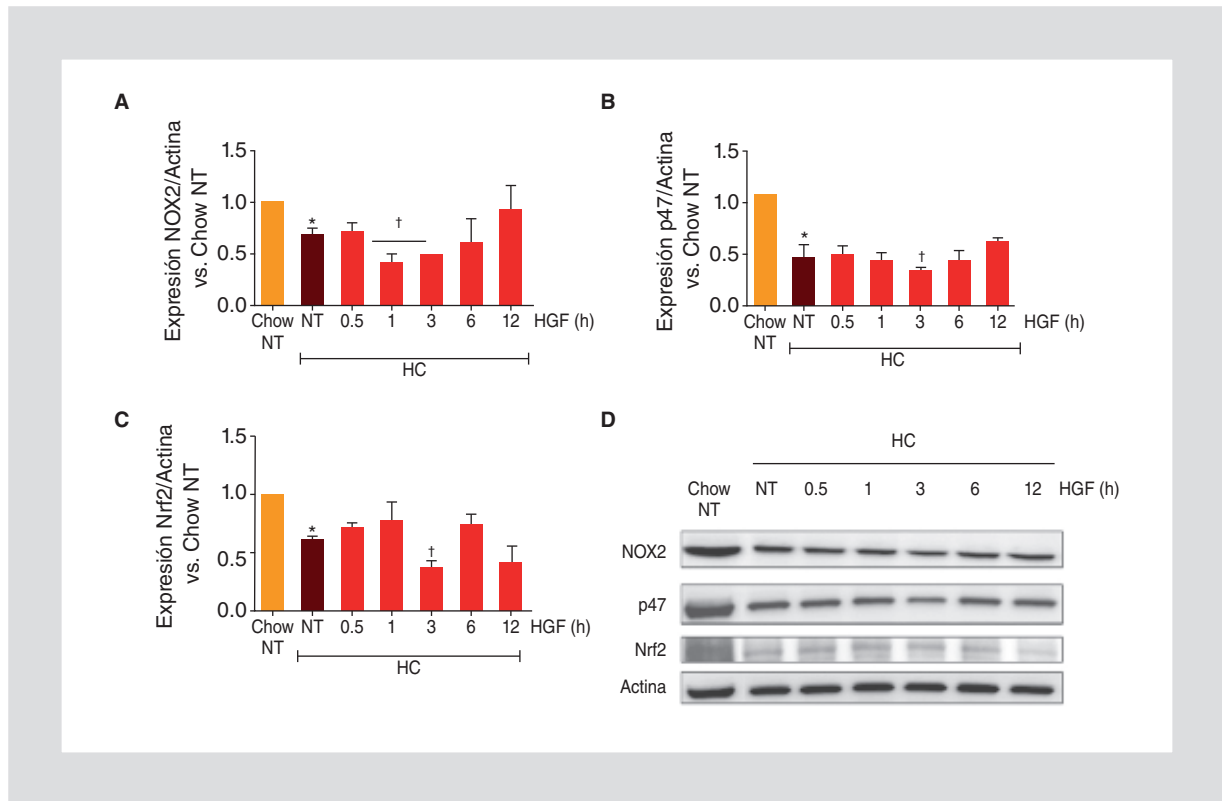


Figura 4. Niveles de expresión por Western blot. La proteína total se aisló y se procedió a realizar el Western blot como se especifica en el apartado «Materiales y métodos»; se corrieron al menos tres experimentos independientes. Se reporta la gráfica del análisis densitométrico. **A:** NOX2. **B:** p47. **C:** Nrf2. **D:** gels representativos. La actina se usó como control de carga. Cada barra representa el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ versus Chow NT. † $p < 0.05$ versus HC NT.

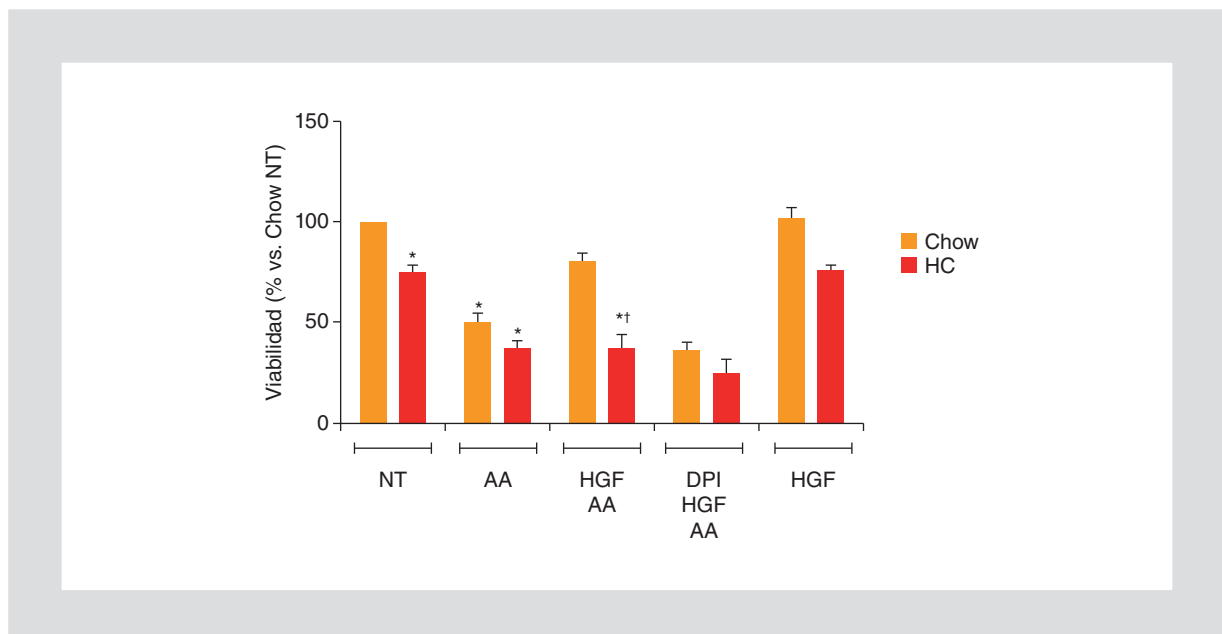


Figura 5. Viabilidad celular. Tanto las células Chow como las HC fueron cultivadas en placas de 96 pozos y fueron tratadas o no con AA (15 μ M) durante 6 h, en presencia o no de HGF (50 ng/ml) o DPI (10 μ g/ml). La viabilidad al término de los tratamientos se determinó por medio del estuche comercial (kit) CCK-8 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las barras representan el promedio de cuatro experimentos independientes \pm SEM. * $p < 0.05$ versus Chow NT. † $p < 0.05$ versus Chow HGF+AA.

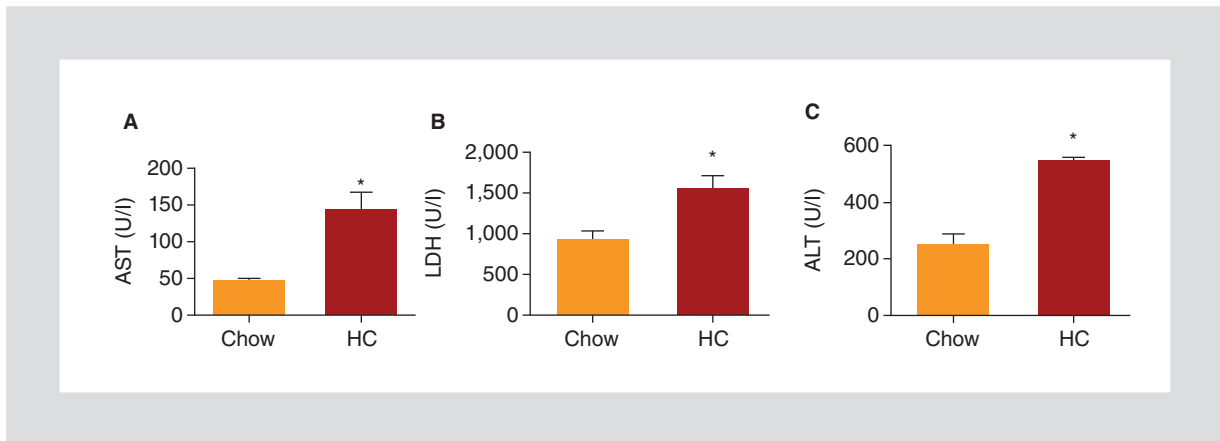


Figura 6. Determinación de pruebas de función hepática. **A:** AST. **B:** LDH. **C:** ALT. La determinación se llevó a cabo por métodos automatizados como se refiere en la sección «Materiales y métodos». Cada barra representa el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$ versus Chow.

La Organización Mundial de la Salud ha dejado claro que los tres principales factores de riesgo para las enfermedades crónicas son el tabaquismo, la hipertensión y los niveles elevados de colesterol en plasma²⁰. Algunos estudios han mostrado, particularmente en adolescentes y niños mexicanos, que los niveles de colesterol son muy elevados, ubicándolos como personas con un alto riesgo de padecer enfermedades crónicas en la etapa adulta²¹⁻²³.

Se ha publicado que una dieta rica en colesterol genera un incremento en el contenido de este lípido en hepatocitos de animales de experimentación, mostrando que el hígado es más susceptible a estímulos citotóxicos mediados, por ejemplo, por el factor de necrosis tumoral α . Esta sensibilización ejercida por los lípidos acumulados se presentó exclusivamente en animales con una sobrecarga de colesterol y no en aquéllos que recibieron una dieta que favorecía la sobrecarga de TG, pero no de colesterol, lo que confirma que es el tipo de lípidos, y no la cantidad, lo que determina el daño hepático³.

La dieta HC proporcionada a los animales mostró ejercer un efecto esteatogénico claro; las histologías mostradas en la figura 1 muestran el tejido hepático con esteatosis, particularmente microvesicular, mientras que los niveles en suero de colesterol libre están significativamente elevados con respecto a los animales con dieta Chow, sin cambios en HDL y LDL (Fig. 1 C). Estudios llevados a cabo en pacientes con esteatosis y NASH mostraron que el contenido de colesterol libre es mayor en NASH que en esteatosis, y esto correlacionó con la inducción del factor de transcripción SREBP-2⁵.

El daño en el hígado se evidenció por un incremento en las pruebas de función hepática (Fig. 6), las

cuales se elevaron significativamente en los animales alimentados con la dieta HC, lo cual es congruente con lo reportado previamente por Marí, et al.³, dejando patente una vez más que el contenido de colesterol se relaciona con la severidad en el daño hepático.

Con la finalidad de conocer directamente el efecto en el mecanismo de protección iniciado por el HGF y el NADPH oxidasa en los hepatocitos, aislamos hepatocitos de animales de ambos grupos y analizamos el contenido de lípidos. La figura 2 muestra que aun en cultivo los hepatocitos retienen la sobrecarga tanto de colesterol (Fig. 2 B) como de lípidos neutros (Fig. 2 E).

Procedimos a determinar la actividad del NADPH oxidasa en los hepatocitos HC. La figura 3 muestra que las células HC no tratadas presentan un incremento significativo en la actividad del NADPH oxidasa con respecto a las Chow no tratadas; sin embargo, a diferencia de lo encontrado previamente en hepatocitos Chow¹⁴, el HGF no mostró efecto alguno sobre dicha actividad en los hepatocitos HC. Clavijo-Cornejo, et al.¹⁴ reportaron previamente un incremento en la actividad, desde los 5 min teniendo un pico máximo a los 30 min de tratamiento, decayendo la actividad hasta valores por debajo del control a las 24 h. Ambos efectos mostraron ser fundamentales para la protección ejercida por el HGF. El incremento temprano tendió a la activación de Nrf2, un factor de transcripción encargado de la expresión de proteínas antioxidantes y de fase II y III de detoxificación²⁴⁻²⁶, mientras que la represión transcripcional mediada por el HGF evitó la utilización de NADPH oxidasa por factores citotóxicos como el factor de crecimiento transformante β . Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la sobrecarga de colesterol abrogó la activación de

NADPH oxidasa por el HGF. Así mismo, si bien la dieta por sí sola indujo la represión transcripcional de proteínas del sistema como NOX2, NOX4 y p47, el HGF no influyó en este efecto negativo (Fig. 4).

Interesantemente, los datos muestran un resultado compensador en el NADPH oxidasa, ya que si bien la dieta HC disminuyó su expresión, la actividad se encuentra elevada, lo que sugiere un claro efecto compensatorio.

Nuestro grupo ha caracterizado los efectos del HGF como factor hepatoprotector. Sabemos que la ausencia en la señalización de él condiciona a daño oxidante, apoptótico, fibrótico y carcinogénicos^{11-13,16}, dejando claro lo indispensable que es la respuesta del HGF en la protección hepática. En el presente trabajo mostramos que la sobrecarga de colesterol impide la respuesta protectora del HGF, lo cual condicionó al daño oxidante (Fig. 5).

Los resultados sugieren fuertemente que en estados hipercolesterolémicos el HGF es incapaz de ejercer su respuesta protectora presentando al hígado vulnerable, particularmente ante retos prooxidantes como pueden ser la infección por el virus de la hepatitis B o C, el alcohol o procesos inflamatorios sistémicos. El control de los niveles hepáticos de colesterol libre se posiciona como un nuevo blanco de intervención terapéutica.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Conacyt #166042 y #131707. PROMEP-SEP # 913026-14612111 y por la Universidad Autónoma Metropolitana. Alberto G. López-Reyes es estudiante del doctorado en Biología Experimental de la DCBS, UAMI. Agradecemos a la unidad de microscopía confocal de la DCBS UAMI y al M en C Roberto Lazzarini por la adquisición y análisis del ensayo con filipina.

Bibliografía

1. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nut Rev*. 2012;70(1):3-21.
2. Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol*. 2013;19(3):210-5.
3. Mari M, Caballero F, Colell A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006;4(3):185-98.

4. Gutiérrez Ruiz MC, Domínguez Pérez M, Rodríguez González S, Nuno Lámbarri N, Licona Retama C, Gómez-Quiroz LE. [High cholesterol diet modifies the repairing effect of the hepatocyte growth factor]. *Gac Med Mex*. 2012;148(3):236-42.
5. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballero J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and S1A expression in human NASH. *J Hepatol*. 2009;50(4):789-96.
6. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):125-38.
7. Thorgeirsson SS. The central role of the c-Met pathway in rebuilding the liver. *Gut*. 2012;61(8):1105-6.
8. Valdes-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(4):424-30.
9. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(12):834-48.
10. Enriquez-Cortina C, Almonte-Becerril M, Clavijo-Cornejo D, et al. Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *Toxicol Sci*. 2013;135(1):26-36.
11. Marquardt JU, Seo D, Gomez-Quiroz LE, et al. Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(6):942-51.
12. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *J Clin Invest*. 2006;116(6):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-nitrosodimethylamine induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2007;67(20):9844-51.
14. Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, Lopez-Reyes A, et al. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*. 2013;95(6):1177-84.
15. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
16. Gomez-Quiroz LE, Factor VM, Kaposi-Novak P, Coulouarn C, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;283(21):14581-9.
17. Gomez-Quiroz LE, Paris R, Lluís JM, et al. Differential modulation of interleukin 8 by interleukin 4 and interleukin 10 in HepG2 cells treated with acetaldehyde. *Liver Int*. 2005;25(1):122-30.
18. Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem*. 2012;287(35):29290-300.
19. Fernández Cantón, Sonia B. MN, Yura A, Viguri Uribe R. Sobrepeso y obesidad en menores de 20 años de edad en México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011;68:79-81.
20. OMS. Dieta, Nutrición y Prevención de enfermedades crónicas. Informe de una consulta Mixta de Expertos OMS. 2003.
21. Roth GA, Fihn SD, Mokdad AH, Aekplakorn W, Hasegawa T, Lim SS. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: an analysis of national health examination survey data from eight countries. *Bull World Health Organ*. 2010;89(2):92-101.
22. González G, Fernández JD, Sánchez J, Rodríguez JJ, Quintero AG. Colesterolemia en adolescentes sexo femenino de morelos, México. *Revista Chilena de Nutrición*. 2005; 32(2):134-41.
23. Juárez-Muñoz IE, Anaya-Florez MS, Mejía-Arangure JM, et al. Niveles séricos de colesterol y lipoproteínas y frecuencia de hipercolesterolemia en un grupo de adolescentes de la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2006;63:162-8.
24. Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(1):57-65.
25. Niture SK, Kaspar JW, Shen J, Jaiswal AK. Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;244(1):37-42.
26. Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. *Biochem J*. 2006;395(3):599-609.