



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA CITOCINA TGF- β
DURANTE EL PROCESO DE TRANSDIFERENCIACIÓN DE LOS HEPATOCITOS
PRIMARIOS DE RATA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
BIOL. PAULA ZEPEDA GUTIÉRREZ**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARINA MACÍAS SILVA
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. ÁNGELES TECALCO CRUZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Facultad de Química, UNAM**

Ciudad de México, Noviembre, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Índice.....	2
Lista de Abreviaturas	3
Resumen	4
Introducción	5
El Hígado	5
La Vía de Señalización del TGF-β	8
El cofactor transcripcional SnoN como regulador de la vía del TGF-β	12
El Proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)	13
La EMT y la vía del TGF-β	17
El proceso de EMT en el hígado	19
Antecedentes	20
Fenotipo de los hepatocitos y las acciones del TGF-β	20
Hepatocitos cultivados en un sándwich de colágena tipo I	21
Planteamiento del Problema	23
Hipótesis	23
Objetivos	23
General	23
Particulares	23
Materiales y Métodos	26
Aislamiento de hepatocitos de rata	26
Técnicas de cultivo celular	27
Cultivo de Hepatocitos en Sándwich de colágena tipo I	29
Lisis celular y cuantificación de proteínas	30
Electroforesis de proteínas y Western Blot	30
Inmunoprecipitación de proteínas	32
Inmunofluorescencia	32
Aislamiento de RNA	34
RT-PCR	34
Análisis Estadístico	35
Resultados	36
El cultivo de los hepatocitos primarios en sándwich de ColI retrasa los cambios en su morfología	36
Discusión	54
Conclusiones	59

Perspectivas	61
Bibliografía	62
ANEXO	70

Lista de Abreviaturas

- ALK- activin receptor like kinase
- APC- adenomatous polyposis coli
- EMT- Epithelial Mesenchymal Transition
- HGF -Hepatocyte growth factor
- HNF4- α - Hepatic Nuclear Factor 4 α
- LPC- liver progenitor cells
- LRP- Lipoprotein receptor-related protein
- MET- Mesenchymal Epithelial Transition
- PC- pericentral
- PP- periportal
- SMAD- Mothers against decapentaplegic homolog
- SNON- SKI novel protein
- TGF- β - Transforming Growth Factor beta
- T β R-I- Transforming Growth Factor beta Receptor I
- T β R-II- Transforming Growth Factor beta Receptor II
- α -SMA- alpha Smooth Muscle Actin

Resumen

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citocina encargada de regular diversos procesos en las células, como la diferenciación, la proliferación, la migración y la apoptosis, entre otros; sus acciones siempre dependen del contexto celular, por ejemplo en una célula epitelial el TGF- β inhibe la proliferación y estimula la apoptosis mientras que en una célula mesenquimal promueve la migración. Además, esta citocina tiene un papel relevante en controlar la plasticidad celular.

Durante la regeneración hepática se ha observado que las principales células epiteliales del hígado, los hepatocitos, pueden pasar temporalmente por un proceso de transdiferenciación conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT), pero del tipo parcial. De igual forma, se ha observado que en un cultivo primario los hepatocitos se transdiferencian y cambian su morfología cuboidal y su fenotipo epitelial, y adquieren una forma estrellada y un fenotipo mesenquimal. La citocina TGF- β es uno de los inductores más importantes del proceso de EMT. Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos evaluar el estado de activación de la vía del TGF- β y su relación con el cambio de fenotipo que presentan los hepatocitos primarios mantenidos en cultivos prolongados. Los resultados muestran que existe una activación gradual de la vía del TGF- β , que se observó por un aumento en los niveles de fosforilación de la proteína efectora de la vía llamada Smad2. Esto correlaciona con una disminución de los marcadores epiteliales (albúmina y HNF4) y un aumento de los marcadores mesenquimales (vimentina y α -SMA). Asimismo, se observó un aumento en los niveles del inhibidor de la vía conocido como SnoN, un cofactor transcripcional de las proteínas Smad. Cabe resaltar que todos estos cambios observados en los hepatocitos mantenidos en cultivo primario por una semana sobre una monocapa de colágena tipo I, se atenúan o se retrasan cuando los hepatocitos son cultivados en un sándwich de colágena tipo I.

Introducción

El Hígado

El hígado es uno de los órganos más grandes del cuerpo y se encuentra conformado por diferentes tipos de células, tales como: las células de Kupffer, las células estrelladas, las células endoteliales, los colangiocitos y los hepatocitos; estos últimos ocupan un 80% del volumen total del órgano confiriéndole así sus principales funciones, entre las que destacan (Rizo, 2010):

1. Síntesis de proteínas que forman parte del sistema de coagulación, trombina y protrombina.
2. Síntesis de urea a partir de iones de amonio derivados del metabolismo de las proteínas.
3. Almacenamiento de glucógeno, hierro y cobre, así como de las vitaminas A, D, E y K.
4. Síntesis y conversión de aminoácidos no esenciales.
5. Producción de sales biliares involucradas en el metabolismo de las grasas.
6. Conversión del glucógeno y grasa a glucosa y viceversa.

El hígado está organizado en lobulillos, subunidades de forma generalmente hexagonal, en donde los hepatocitos se distribuyen de forma radiada en torno a una vena central. En el exterior se encuentra la cápsula de Glisson, la cual es una capa de tejido conjuntivo fibroso que se encarga de recubrir al órgano y delimitar a los lobulillos hepáticos (Tortora, 2012).

Para poder realizar estas funciones básicas los hepatocitos poseen una polaridad única, en la que una parte de su membrana constituye la cara basolateral que encara a las células endoteliales separando el flujo sanguíneo sinusoidal, mientras que la cara apical contribuye a la formación del canalículo biliar. El establecimiento de la polaridad es esencial para la funcionalidad del hepatocito, y depende de la interacción de un conjunto de factores como las moléculas de adhesión, el citoesqueleto, las uniones con otras células y con la matriz extracelular. Por lo tanto, defectos en la polarización de estas células puede llevar al desarrollo de diversas patologías como la fibrosis, la hepatitis o el cáncer (Gissen & Arias, 2015).

La principal relevancia que tiene la estructura del hígado radica en la formación de un gradiente de nutrientes que inicia en el borde del lobulillo hepático, donde se encuentra la triada portal, conformada por una vena, una arteria y un conducto biliar; aquí se junta la sangre oxigenada proveniente de la circulación pulmonar con la sangre rica en nutrientes que proviene del sistema gastrointestinal. Esta mezcla baña a los hepatocitos hasta que es recolectada por la vena central al interior del lobulillo hepático. Debido a esto podemos observar diferencias funcionales y fenotípicas en los hepatocitos ubicados en la zona periportal (PP), es decir, cerca de la triada portal, comparados con los hepatocitos de la zona pericentral (PC), cerca de la vena central. Por ejemplo, los hepatocitos PP son de menor tamaño y presentan mayor actividad de la peroxidasa de glutatión, mientras que los hepatocitos PC comúnmente son multinucleados y presentan una mayor actividad del citocromo P450, encargado del metabolismo de fármacos (Usta et al., 2015).

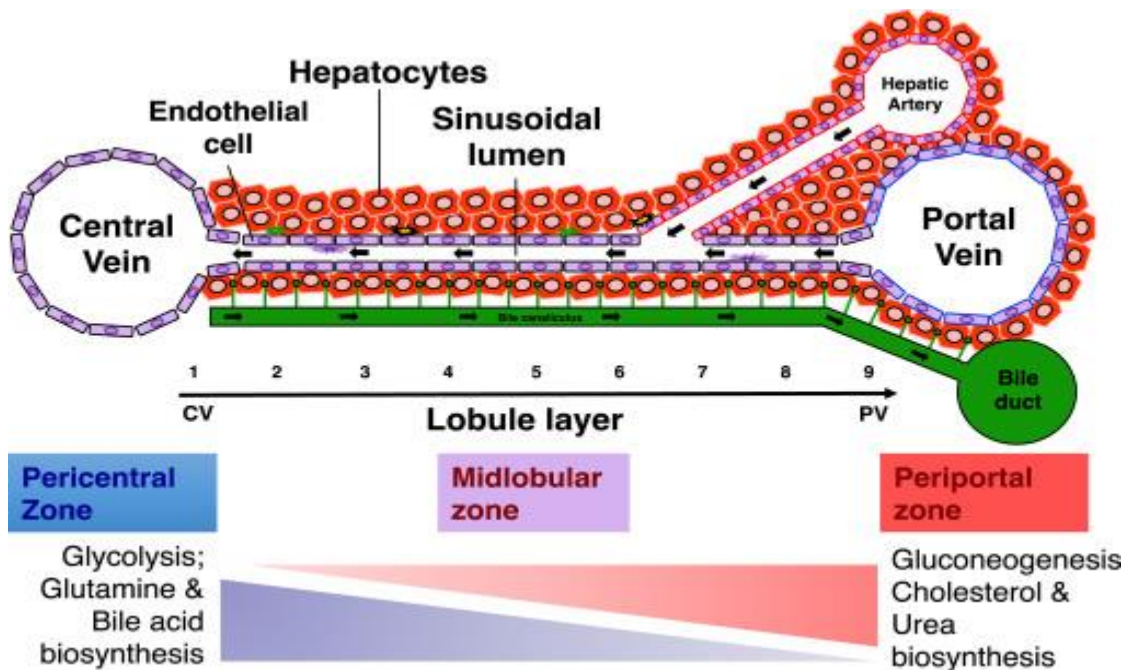


Figura 1. Zonación de los hepatocitos. El gradiente de nutrientes que se forma desde la zona periportal hacia la zona pericentral es fundamental para la funcionalidad de los hepatocitos. Las células PP son las encargadas de llevar a cabo el metabolismo de aminoácidos mediante el ciclo de la urea, Tomada de (Tan, Loh, & Ang, 2017).

Este fenómeno conocido como “zonación hepática” es un ejemplo de la plasticidad fenotípica que poseen los hepatocitos, por lo que surge la pregunta: ¿cómo surge la zonación hepática?. Para responder esta pregunta se han planteado 3 diferentes hipótesis (Torre, Perret, & Colnot, 2010):

1. Hipótesis del desarrollo. Esta hipótesis sugiere que tanto los hepatocitos PP como los PC tienen un origen embrionario distinto; sin embargo, esta hipótesis ha quedado descartada debido a que un hígado perinatal no presenta zonación hepática y transcripcionalmente presenta ambos programas. Además, la zonación se observa una semana después del nacimiento.
2. Modelo de proliferación continua (*Streaming Model*). Este modelo sugiere que los hepatocitos proliferan de manera continua al borde del espacio portal, lo que da lugar a hepatocitos con fenotipo PP, cuando estos van madurando, van migrando y adquieren el fenotipo PC. Esta hipótesis está basada en la observación de que los hepatocitos PP tienen mayor proliferación que los PC; sin embargo, estudios en los que se marca a los hepatocitos en proliferación muestran que esta ocurre en ambas partes del lobulillo hepático, haciendo inviable este modelo.
3. Influencia del microambiente celular. Debido a que la microestructura del hígado y sus funciones metabólicas son muy específicas, se sugiere que el microambiente, particularmente el gradiente de nutrientes que se forma en el lobulillo hepático es el principal responsable de controlar la zonación hepática. Además, otro componente importante en el microambiente de los hepatocitos es la interacción que tienen con las otras células presentes en el hígado, así como con las moléculas que estas puedan secretar, haciendo de este modelo el más aceptado.

En el año 2006 Benhamouche y colaboradores (Benhamouche et al., 2006) describieron a la vía de señalización de Wnt/ β -Catenina como parte del mecanismo que regula que los hepatocitos se diferencian hacia un fenotipo PP o PC, siendo de particular importancia el papel del regulador negativo de la vía llamado APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), el cual es considerado como el “guardián” de la zonación hepática. Por un lado, en los hepatocitos PC la vía de Wnt está activa, mientras que los PP son los únicos que expresan APC, lo que mantiene a la vía de Wnt apagada; en consecuencia, los hepatocitos PC encienden el programa transcripcional que incluye la expresión de genes necesarios para llevar a cabo la glucólisis y el metabolismo de xenobióticos, mientras que reprimen el programa genético PP, en el cual encontramos la maquinaria necesaria para llevar a cabo el ciclo de la urea y la gluconeogénesis (Torre et al., 2010).

La plasticidad de los hepatocitos va más allá de las diferencias metabólicas que existen a lo largo del cordón hepático, existen diversos estudios que demuestran que en los hepatocitos

y en las demás células epiteliales del hígado (colangiocitos y endoteliales) se puede activar el proceso conocido como transición epitelio-meséquima (EMT por sus siglas en inglés) para regenerar la masa hepática perdida después de una hepatectomía parcial (Kim, Hyun, Wang, Lee, & Jung, 2018). Además, los hepatocitos pueden dar origen a los colangiocitos, por un proceso de transdiferenciación, para reparar daños ocasionados a los conductos biliares. Cabe resaltar que este proceso está regulado por el TGF- β (Schaub et al., 2018); sin embargo, aún se desconoce si el proceso inverso, es decir que los colangiocitos den origen a los hepatocitos, ocurre *in vivo* o bien que los mismos hepatocitos sean los únicos que pueden sustituir a los hepatocitos perdidos.

La Vía de Señalización del TGF- β

El TGF- β es el prototipo de una superfamilia de proteínas implicadas en el crecimiento, la diferenciación, la proliferación y la migración de las células, aunque también se ha demostrado su actividad como inductor de la apoptosis en las células epiteliales (Coulouarn, Factor, & Thorgeirsson, 2008). La superfamilia está dividida en dos ramas, con base en su habilidad para activar a diferentes proteínas efectoras: **1)** BMP/GDF (Bone morphogenetic proteins y Growth and Differentiation Factors) y **2)** TGF- β /Activina/Nodal, en este último grupo encontramos tres isoformas del ligando TGF β : TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3.

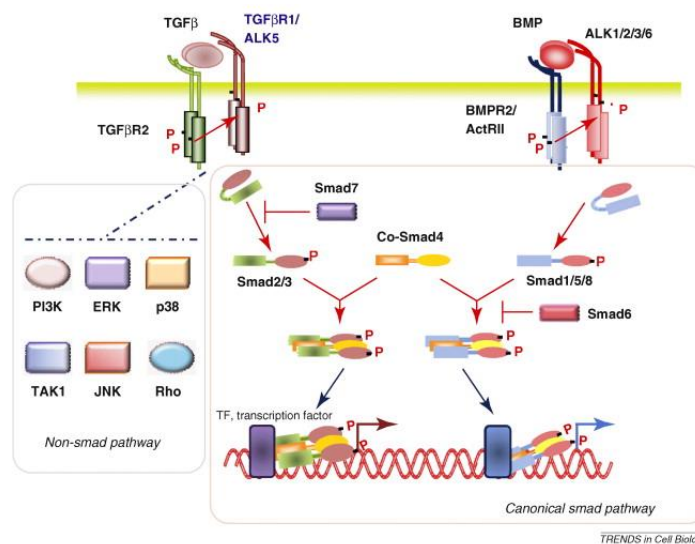


Figura 2. La vía de señalización de TGF- β . Vía canónica: Cuando el ligando TGF- β se une al receptor tipo II se induce la formación de un heterodímero con el receptor tipo I, el cual es transfosforilado por la actividad de cinasa del receptor tipo II. El receptor tipo I es el encargado de transmitir la señal a las proteínas Smad2 y

Smad3 (R-Smads), que forman un trímero con Smad4 (Co-Smad). Este trímero es translocado al núcleo para interactuar con factores de transcripción capaces de regular la expresión de los genes blanco. Por otra parte, las I-Smad (inhibitorias) como Smad6 y Smad7 son capaces de impedir la activación de las R-Smads. Vía no-canónica: los receptores activados son capaces de activar a otras vías como ERK1/2, PI3K, p38, TAK1, JNK y Rho. Mientras que el ligando de TGF- β utiliza al receptor ALK5 para fosforilar a Smad2/3, los ligandos de BMPs utilizan a los receptores ALK1/2/3/6 para fosforilar a Smad1/5/8. Tomada de (Pardali, Goumans, & ten Dijke, 2010).

Los miembros de esta superfamilia de factores señalizan a través de receptores transmembranales con actividad enzimática de cinasa. En mamíferos existen 5 diferentes receptores tipo II: T β RII, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II, y AMHR-II, mientras que existen 7 receptores tipo I que se conocen como ALK1-7, por sus siglas en inglés de *Activin Receptor-like Kinases*. Esta clasificación de los receptores está basada en sus propiedades funcionales y estructurales. El dominio citoplásmico de los receptores tipo II tiene actividad de cinasa constitutivamente activa, y se encarga de fosforilar a los receptores tipo I en residuos de serina y treonina localizados en su dominio GS (rico en glicinas y serinas) en respuesta a la unión del ligando (Wrighton, Lin, & Feng, 2009).

La vía de señalización comienza cuando el ligando TGF- β se une al receptor T β R-II, que promueve el reclutamiento y la activación del dominio cinasa del receptor T β R-I, ambos receptores son proteínas transmembranales que tienen actividad de cinasas de residuos de serina y treonina (Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004). Cuando el receptor T β R-I es fosforilado, es decir, es activado por fosforilación por el T β R-II, aumenta su afinidad por sus proteínas efectoras: las proteínas Smads, para así propagar la señal al fosforilarlas; estas proteínas se encuentran altamente conservadas desde invertebrados hasta mamíferos. Las Smads estructuralmente contienen dos dominios globulares: el MH1 que reconoce la secuencia CAGAC en el DNA y el MH2 que se une a coactivadores transcripcionales, entre otras proteínas (Massague & Lo, 2000). La familia de las Smad comprende a 8 proteínas divididas en 3 subgrupos: **1)** R-Smads (Smad1/2/3/5/8) en las que el dominio MH1 es capaz de unirse a secuencias específicas del DNA y regula negativamente la función del dominio MH2, esta último interacciona con el receptor tipo I, pero también con otras Smads para formar complejos heterotriméricos, así como también se asocia con otros factores de transcripción, **2)** Co-Smad (Smad4) o Smad común y **3)** I-Smads o Smad inhibitorias (Smad6 y Smad7). Las Smad activadas por el receptor T β R-I son Smad2 y Smad3, las cuales al ser fosforiladas en el motivo SXS de su dominio carboxilo terminal forman un complejo con Smad4. Este complejo es el que es translocado al núcleo, en donde interactúa de una manera específica con otros factores de transcripción, como por

ejemplo el factor AP-1, entre muchos otros, y juntos regulan la transcripción de genes blanco responsivos al TGF- β (Vera Gómez, 2013). La interacción de las Smad con diferentes cofactores transcripcionales en la célula, es lo que determina si los genes blanco serán activados o reprimidos; en conjunto también con modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA o la modificación de histonas, que son las que determinan qué genes son susceptibles de ser regulados (Massagué, 2012).

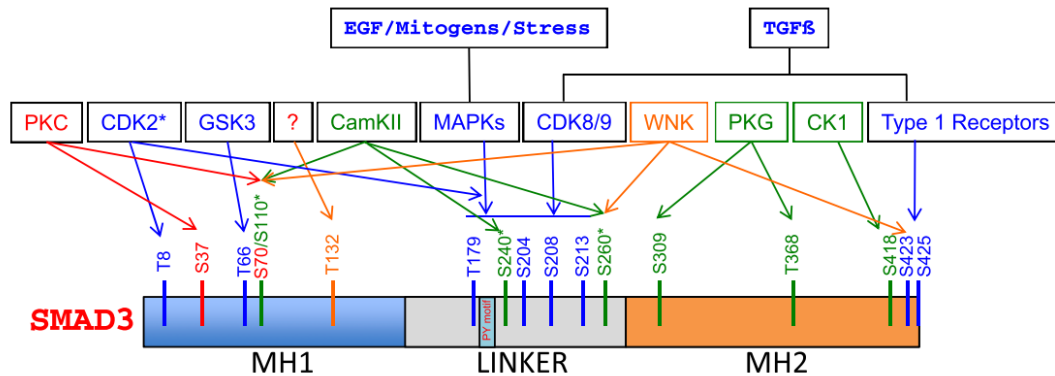


Figura 3. Representación de los dominios de la proteína Smad3. Las proteínas R- Smad poseen dos dominios globulares unidos por una región linker. Se conocen diversos sitios de fosforilación para las R-Smads que determinan la función del TGF- β . Tomada de (Bruce & Sapkota, 2012).

La mayoría de las Smad permanecen en el citoplasma con la ayuda de la proteína andamio SARA, que se une a estas, facilitando su exposición al receptor cuando el ligando llega a estimularlo (Sosa-Garrocho & Macías-Silva, 2004). En su estado basal, las Smad se transportan del citoplasma al núcleo por una interacción con las nucleoporinas; sin embargo, cuando se encuentran formando un oligómero con Smad4 son necesarios factores de exportación e importación para atravesar la membrana nuclear (Massagué, 2012). El tercer grupo de Smad son las inhibitorias, en este grupo encontramos a Smad6 y Smad7. Smad7 compite con las R-Smad por el receptor tipo I, además puede reclutar fosfatasas o ligasas de ubiquitina E3, que inactivan al receptor o bien lo marcan para su degradación vía el proteosoma (Pardali et al., 2010). La inducción de la expresión de Smad7, tras la estimulación con el ligando TGF- β , genera un asa de retroalimentación negativa que inhibe la vía.

Las Smad también pueden ser reguladas por BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), cuyo receptor BMPRII fosforila a algunos receptores tipo I como ALK3 o ALK6 (*activin receptor like kinase*). La diferencia con la vía de las BMPs radica en que las R-Smad fosforiladas son las Smad1, 5 y 8, las cuales también requieren de formar un complejo con

Smad4 para regular la transcripción de sus genes blanco en el núcleo (Pardali et al., 2010). A pesar de que se ha observado que la función de las Smad es esencial para muchas de las acciones fisiológicas del TGF- β y de otros factores relacionados, en algunos contextos celulares no participan las Smad para desencadenar una respuesta (Prieto, Rivas, & Pérez-barriocanal, 2002), cuando esto sucede, a las otras vías activadas se les conoce como las vías no canónicas del TGF- β .

Cuando el receptor T β R-II es fosforilado en la Y284 por Src, una cinasa de residuos de tirosina (no-RTK), este sitio puede servir para la unión de moléculas capaces de conducir a la activación de la vía de las MAP cinasas (MAPK/ERK), en donde las proteínas efectoras ERK1/2 son capaces de interactuar con las Smad y con otros cofactores transcripcionales, para regular la transcripción de genes blanco del TGF- β ; por ejemplo, las cinasas ERKs son necesarias para la pérdida de las uniones adherentes célula-célula y para la motilidad celular inducida por el TGF- β . Las cinasas JNK y p38 son activadas por el TGF- β a través de la cinasa MKK4, utilizando al T β R-I fosforilado de una forma independiente a las Smads, para esto el receptor utiliza otras proteínas, tales como TAK1 (TGF- β activated kinase 1) y MKK4. Las cinasas JNK y p38 tienen un papel en el cambio de la forma de la célula, regulando al citoesqueleto de actina. Otra ruta activada por el TGF- β es la de la GTPasa RhoA, en donde Par6, una proteína andamio que regula la polaridad epitelial de las células, interactúa con el T β R-I en las uniones célula-célula. Cuando Par6 es fosforilado por la estimulación con TGF- β recluta a la proteína Smurf1, este complejo ubiquitina a RhoA promoviendo su degradación, una vez más ayudando a la pérdida de las uniones intercelulares. La activación de todas estas vías no canónicas es importante para el proceso EMT, el cual se explicará más adelante (Zhang, 2009).

En su conjunto, las proteínas Smad tienen múltiples interacciones moleculares con otros factores transcripcionales una vez dentro del núcleo, que junto con la variedad de ligandos y receptores involucrados en la vía del TGF- β dan como resultado diferentes respuestas que dependen del contexto celular; por ejemplo, el TGF- β puede inhibir la proliferación de células epiteliales pero también puede promover el crecimiento de fibroblastos, o bien regular la expresión de genes encargados de la diferenciación celular; mientras que en las células troncales ayuda a mantener la pluripotencia. Sin embargo, en algunas patologías como el cáncer, esta citocina puede suprimir la proliferación de las células malignas en etapas iniciales, aunque una vez avanzada la enfermedad se da un cambio o *switch* en la

respuesta de las células cancerosas al TGF- β , en donde se promueve la metástasis (Massagué, 2012). Es importante mencionar que la diversidad de respuestas mediadas por el TGF- β está ligada a la interacción que tienen las Smad con la maquinaria transcripcional en el núcleo; por ejemplo, en caso de que el complejo Smad2/3/4 interactúe con p300/CBP (co-activadores con actividad de acetiltransferasa de histonas) se promueve la transcripción de genes, mientras que la presencia de las oncoproteínas Ski y SnoN (correpresores transcripcionales) impide la formación del complejo entre las R-Smad/Co-Smad con p300/CBP y en su lugar se reclutan HDAC (desacetilasas de histonas), y en consecuencia se reprime la transcripción de genes.

El cofactor transcripcional SnoN como regulador de la vía del TGF- β

Las proteínas Ski y SnoN han sido identificadas como importantes reguladores negativos en la vía de señalización del TGF- β , desde su descubrimiento en 1986 en el retrovirus aviar *Sloan-Kettering* que induce la transformación oncogénica de células embrionarias de pollo (Li, Turck, Teumer, & Stavnezer, 1986). Cuando la proteína SnoN se encuentra sobreexpresada en las células, estas pierden la habilidad de entrar en arresto celular tras la estimulación con TGF- β (Stroschein, Wang, Zhou, Zhou, & Luo, 1999). De igual forma, se ha reportado el incremento en la expresión de Ski y SnoN en diversos tipos de cáncer, y se piensa que SnoN puede contribuir al papel dual que presenta el TGF- β en el cáncer, dependiente del contexto celular; en donde niveles bajos de SnoN promueven la transcripción de genes blanco en células epiteliales de pulmón (Sarker, Wilson, & Bonni, 2005) cuando se sabe que SnoN generalmente es un regulador negativo de la vía.

En condiciones basales SnoN se encuentra asociado indirectamente al promotor de su propio gen llamado *Skil*, reprimiendo su expresión. Cuando se da un estímulo con TGF- β y se activa la vía canónica, SnoN es reemplazado por el complejo de Smads activadas S2/3/4 en el promotor, promoviendo la transcripción del gen *Skil*, mientras que después de una estimulación larga con la citocina, aumentan los niveles de la proteína SnoN, por lo que esta proteína vuelve a asociarse al promotor de su gen para reprimir su transcripción, ejerciendo así una regulación negativa sobre la vía del TGF- β (Tecalco-Cruz et al., 2012). Además, cabe mencionar que tanto la proteína SnoN como Ski son capaces de reclutar diversos represores transcripcionales como N-CoR (*nuclear hormone receptor co-*

repressor), mSin3A, HIPK2 y MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein*), como se muestra en la Figura 3 (Luo, 2004). De manera simultánea Ski y SnoN pueden interactuar con el complejo Smad2/3 en su región N-terminal, mientras que con Smad4 interactúan a través del dominio tipo SAND, y de esta forma bloquean la capacidad que tiene la vía canónica del TGF- β /Smads de llevar a cabo la regulación de la transcripción de sus genes blanco.

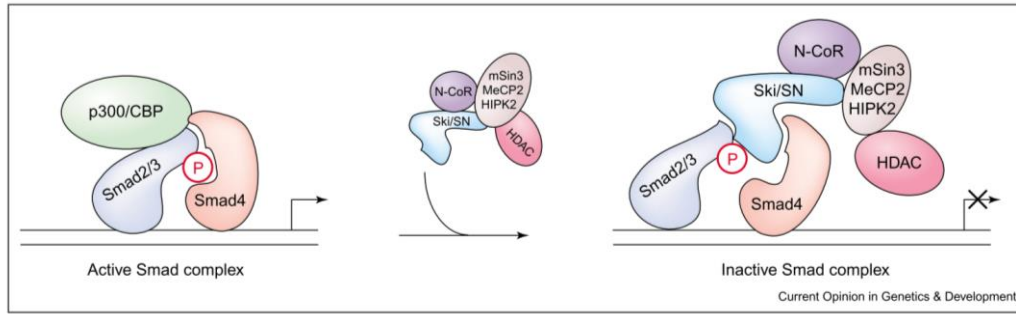


Figura 4. Interacción del heterodímero Smad2/3/4 con la maquinaria transcripcional, para reprimir o promover la transcripción de los diferentes genes blanco. Tomada de (Luo, 2004).

El Proceso de Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)

De manera general, se puede decir que los animales estamos conformados por dos fenotipos celulares principales: epitelial y mesenquimal, estos dos estados no son excluyentes ni definitivos, sino que en años recientes se ha observado que las células pueden pasar de un fenotipo a otro en ciertas condiciones (Nieto, Huang, Jackson, & Thiery, 2016). Las células epiteliales son aquellas que conforman la masa de nuestros órganos y recubren prácticamente todo nuestro cuerpo, se caracterizan por formar capas al unirse entre ellas mismas con diferentes tipos de uniones celulares (desmosomas, uniones adherentes, uniones tipo gap, etc.), y por presentar una polaridad apicobasal que les ayuda en sus funciones altamente especializadas; por otro lado, las células mesenquimales no poseen polaridad ni uniones intercelulares de ningún tipo, lo que les brinda la habilidad de moverse como células individuales a través de la matriz extracelular (Acloque, Adams, Fishwick, Bronner-Fraser, & Nieto, 2009).

El proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) es un proceso biológico en el cual una célula epitelial sufre múltiples cambios bioquímicos y epigenéticos que le permiten adquirir un fenotipo mesenquimal, en consecuencia, se pierde la polaridad de las células pero se incrementa su movilidad, adquieren resistencia a la

apoptosis y también pueden llegar a producir componentes de matriz extracelular de manera incrementada. Para que el proceso de EMT ocurra, es necesario la activación de diversos factores de transcripción, así como cambios en la expresión de marcadores de superficie, como por ejemplo la E-cadherina es cambiada por N-cadherina, cambia la reorganización del citoesqueleto y la producción de enzimas que degraden la matriz extracelular, como algunas metaloproteinasas necesarias para movilizarse. Por otro lado, existe también el proceso inverso conocido como transición mesénquima-epitelio (MET), el cual también es de suma importancia durante el desarrollo embrionario y en la regeneración de tejidos, es por esto que dependiendo del momento y del lugar en el que la EMT ocurre, este proceso se ha clasificado en 3 diferentes tipos (Kalluri & Weinberg, 2009):

1. EMT asociada al desarrollo embrionario:

Ocurre en diferentes momentos durante la formación del embrión y exceptuando a la notocorda todas las estructuras derivadas del mesodermo son remodeladas por varias rondas subsecuentes de EMT y MET hasta diferenciar los órganos y tejidos durante la organogénesis, para generar los diversos linajes celulares a partir de un mismo tipo celular progenitor. La primera EMT que ocurre es para ayudar a la implantación del embrión en la pared uterina y el inicio de la formación de la placenta; posteriormente, facilita la migración de las células progenitoras que darán origen a una variedad de tejidos más especializados, y luego se da el proceso inverso MET, para dar lugar al órgano ya constituido en su gran mayoría por células epiteliales. Se sabe que las células que ingresan a la línea primitiva son estimuladas por un ligando de la vía de Wnt, lo cual activa la vía en la parte posterior del embrión, posteriormente proteínas de la familia de TGF- β son necesarias para inducir la gastrulación, como Nodal y BMP, lo que induce la expresión del factor de transcripción *Snail*, responsable de orquestar el proceso de la EMT en la mayoría de los tipos celulares.

2. EMT asociada a la reparación de tejidos y a la fibrosis

Después de que ocurre un daño a un tejido epitelial, ya sea por la infección de un virus o una bacteria o bien por un daño mecánico como por ejemplo una cortada en el tejido, se generan diversas respuestas para evitar que el daño se propague y se

inicia una remediación a dicho daño, una de esas respuestas es la inflamación, un proceso tisular que involucra una cascada de eventos moleculares y celulares que caracterizan a dicho proceso; en primer lugar existe una focalización de la respuesta al lugar donde se encuentra el agente agresor, en segundo lugar, la inflamación tiende a ser una respuesta inmediata por parte del cuerpo y en tercer lugar, existe un reclutamiento de células del sistema inmune. Cuando la causa del daño ha sido controlada inician los procesos de reparación en donde destaca la llegada y proliferación de fibroblastos (Bordés González, Martínez Beltrán, García Olivares, & Guisado Barrilao, 2010). Cuando la inflamación es constante, la EMT ayuda a dar origen a más fibroblastos, para cumplir con la demanda del proceso de reparación; sin embargo, también puede desencadenar en fibrosis, terminando por ocasionar una falla en el órgano. Por ejemplo, se sabe que durante la fibrosis renal existe un proceso de fibrogénesis, en el cual se generan nuevos fibroblastos mediante el proceso de EMT, mientras que una pequeña población de estos proviene de la médula ósea. Para poder distinguir a los fibroblastos se han identificado a diferentes marcadores de fenotipo, como la colágena tipo I, la vimentina o la α -SMA; sin embargo, el uso de estos marcadores representa algunas dificultades pues no son exclusivos de fibroblastos; así por ejemplo, la α -SMA es un marcador generalmente utilizado para identificar células de músculo liso, mientras que la síntesis de colágena tipo I sólo se detecta en ciertas subpoblaciones de fibroblastos (Kalluri & Neilson, 2003). A pesar de estas dificultades estos marcadores junto con las proteínas FSP1, DDR2 y la desmina han sido utilizados para identificar a las células de diferentes tejidos, como pulmón, hígado y riñón, que han atravesado por el proceso de EMT asociado a la inflamación crónica. Es importante mencionar que bajo ciertas circunstancias, las células pueden preservar ciertas características epiteliales, como su morfología o marcadores moleculares como la E-cadherina y citoqueratinas específicas, al mismo tiempo que expresan los marcadores mesenquimales antes mencionados, a esto se le conoce como un proceso de EMT parcial (Kalluri & Weinberg, 2009).

3. EMT asociada a neoplasia

La organización mundial de la salud describe al cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación celular descontrolado que puede aparecer en cualquier

órgano del cuerpo, formando un tumor que suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en lugares lejanos al tumor original. La mayoría de los tumores sólidos se consideran carcinomas que tienen su origen en diferentes tipos de células epiteliales en el cuerpo, y para que las células del tumor puedan invadir otros tejidos es necesario que pierdan sus uniones célula-célula; una de las principales proteínas que median estas uniones es la E-cadherina, considerada la “guardiana” del fenotipo epitelial, pues en el momento en el que esta proteína se pierde parcial o completamente las células de carcinoma adquieren una capacidad invasiva que se asocia con la progresión de la enfermedad, y las consecuencias son mortales para el que la padece (Yang & Weinberg, 2008). Para lograr disolver las uniones que tienen las células cancerosas con las células vecinas y migrar e invadir otro tejido, las células del tumor atraviesan por el proceso de EMT, en el que se pierde la polaridad apico-basal, y hay un rearrreglo del citoesqueleto de actina, y para poder invadir otros tejidos las células comienzan la expresión de metaloproteasas (MMPs por sus siglas en inglés) que rompen la matriz extracelular que las rodea; en consecuencia, las células cancerosas pueden diseminarse por el torrente sanguíneo en un proceso conocido como extravasación, y cuando estas células metastásicas llegan al tejido blanco, deben de realizar una ronda de MET para adherirse a dicho tejido y comenzar el tumor secundario (Katsuno, Lamouille, & Derynck, 2013). Es debido a esto que el desarrollo del cáncer se considera semejante al desarrollo embrionario, además, se sabe que los mecanismos moleculares que gobiernan a ambos procesos son muy similares.

El hecho de que se logre formar un tumor secundario en un tejido lejano al tumor original requiere que las células metastásicas no sólo logren migrar, sino también proliferen de manera indefinida, es decir, tener la capacidad de autorrenovarse, la cual es una característica de las células troncales. En 2008, S. Mani y colaboradores observaron que no todas las células pertenecientes al mismo tumor de origen mamario tenían la capacidad de dar origen a un nuevo tumor, pero al expresar de forma constitutiva factores de transcripción que gobiernan al proceso de EMT, como Twist y Snail, observaron que aumenta el número de las células tumorales con la habilidad de proliferar indefinidamente, en otras palabras el proceso de EMT puede dar origen a células troncales cancerosas (conocidas en inglés como *Cancer Stem Cells*) (Mani et al., 2008).

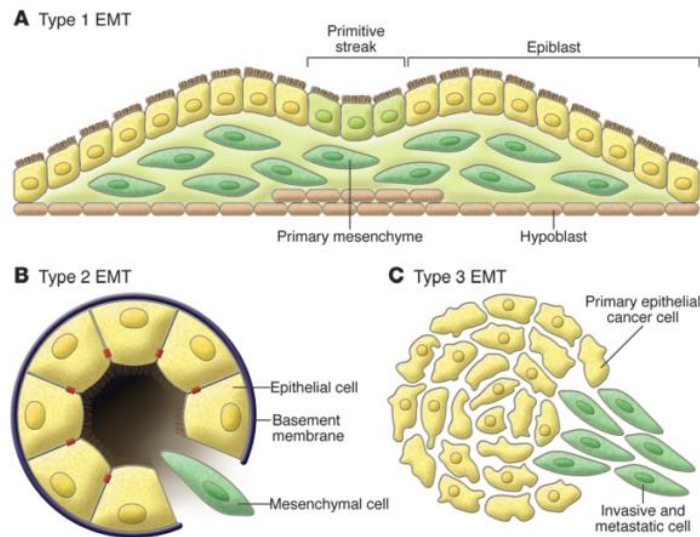


Figura 5. Tipos de EMT. A) EMT asociada al desarrollo embrionario para que tenga lugar la implantación, el desarrollo de la cresta neural, la organogénesis, entre otros procesos. B) Rearreglo de las células por EMT después de una lesión ocasionada al tejido. C) Epitelio secundario asociado a cáncer, donde las células recurren a la EMT para hacer metástasis e invadir nuevos tejidos. Tomada de (Kalluri & Weinberg, 2009).

La EMT y la vía del TGF- β

Como se mencionó anteriormente, la EMT ocurre de forma normal durante el desarrollo embrionario, o bien de manera patológica en procesos oncogénicos. Todos los tipos de EMT dependen de casi las mismas vías de señalización que regulan la proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células. Estas vías están interconectadas y dependiendo del contexto celular, actúan de manera sinérgica para promover la EMT, como se observa en la Figura 6. La vía del TGF- β es conocida como la principal inductora de la EMT, mediante diversos mecanismos moleculares que se discutirán más adelante. La vía canónica de Wnt está implicada en el inicio y el mantenimiento de la formación del mesodermo durante el desarrollo embrionario. Diversos estudios han demostrado la importancia de esta vía en el desarrollo de la cresta neural y de las válvulas cardíacas. La vía de Notch depende del TGF- β para su activación durante la EMT, en el desarrollo embrionario de diversas estructuras como la cresta neural craneal y el tejido cardíaco. A pesar de esto, la activación de Notch no está conservada en los diferentes tipos de EMT que ocurren en la embriogénesis, por lo que se considera que la activación de esta vía no es suficiente para inducir EMT. Por otro lado, la activación de los diferentes receptores con actividad de cinasa de residuos de tirosina (también conocidos como RTKs) se ha visto

asociada a la EMT parcial, que ocurre durante la formación de diferentes órganos como los riñones o la tráquea, e incluso estos receptores pueden reducir la expresión de E-cadherina y de esta forma inducir la EMT (Yang & Weinberg, 2008).

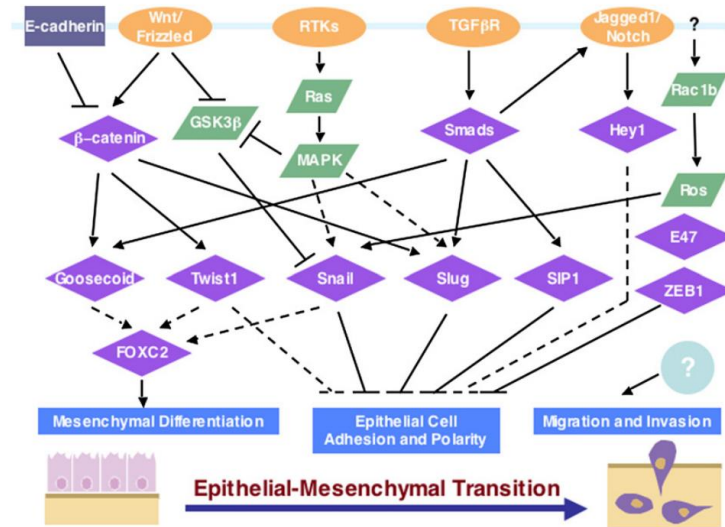


Figura 6. Las diferentes vías de señalización que promueven la EMT. La vía de TGF-β es la que se sabe tiene la capacidad de inducir EMT en casi todos los tipos celulares al promover la transcripción de genes como Snail, sin embargo, otras vías de señalización también pueden inducirla de manera independiente o sinérgica al TGF-β. Por un lado, tenemos a la β-cateína cuya activación se da por la pérdida de E-cadherina o bien por la unión de un ligando Wnt, que promueve la diferenciación mesenquimal, mientras que la estimulación de los RTKs por diferentes factores de crecimiento inhibe la expresión de moléculas de adhesión y características de la polaridad de la célula. La vía de Notch es inducida por el mismo TGF-β pues también es necesaria para la EMT. Tomada de (Yang & Weinberg, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la vía del TGF-β es la principal inductora de la EMT combinando sus efectores canónicos, las Smads, o bien sus vías no-canónicas, como la de Rho y Akt, de manera que se activan directamente los factores de transcripción responsables de la EMT como Snail, Slug, ZEB1 y ZEB2. Si bien las Smads pueden por sí mismas unirse a secuencias reguladoras de sus genes blanco, ya sea para reprimir o promover su transcripción, también son capaces de interactuar con otras proteínas que dependen de otras vías de señalización, lo que le da al TGF-β su dependencia del contexto celular; por ejemplo, el complejo Smad3/4 se une directamente al promotor de *Snail*, induciendo así su transcripción, una vez sintetizada la proteína Snail, es capaz de interactuar con Smad3/4, y de unirse a los genes que codifican para E-cadherina y ocludina, reprimiendo su transcripción, y así la estimulación por TGF-β induce directamente la disolución de las uniones célula-célula que conllevan a la EMT (T. Vincent

et al., 2009). De igual forma, la proteína Snail es capaz de realizar cambios epigenéticos, por ejemplo, la proteína LSD1 (desmetilasa de histonas específica de lisina) es reclutada por Snail a la secuencia promotora del gen que codifica a E-cadherina, reduciendo los niveles de H3K4m2, lo que inhibe parcialmente la actividad del promotor y en consecuencia bajan los niveles de E-cadherina (Lin, Ponn, Hu, Law, & Lu, 2010).

Otro mecanismo mediante el cual el TGF- β regula la EMT es controlando la expresión de miRNAs de la familia 200, que de manera general se encuentran en bajos niveles en las células que han atravesado por la EMT inducida por el TGF- β . Los miRNAs-200 inhiben la expresión de las proteínas ZEB1 y ZEB2, siendo así responsables de estabilizar el fenotipo epitelial, lo que no favorece la EMT. Las Smad también pueden interactuar con la RNA helicasa p68, un componente de Drosha, una ribonucleasa involucrada en el procesamiento de micro-RNAs, y así las Smad promueven la generación de los llamados miRNAs (Morikawa, Derynck, & Miyazono, 2016).

El proceso de EMT en el hígado

La fibrosis y el cáncer representan dos patologías en donde la EMT contribuye al desarrollo de la enfermedad. Por un lado, tenemos a la fibrosis que se caracteriza por un exceso en el depósito de proteínas de matriz extracelular, y por el otro al cáncer, en donde ocurre una proliferación descontrolada de células transformadas que son capaces de migrar a otros tejidos para formar tumores secundarios. En el caso de la fibrosis, las proteínas de matriz extracelular son sintetizadas principalmente por los fibroblastos que residen en el órgano, cuando surge un daño, los fibroblastos comienzan a secretar proteínas fibrosas; sin embargo, las células epiteliales pueden sufrir una EMT y contribuir con la secreción de matriz extracelular. Existen diferentes grados en el desarrollo de la fibrosis, que comienza con un aumento en la cantidad de colágenas secretadas y un remodelado de la matriz, el grado más severo de fibrosis se distingue por la presencia de nódulos de regeneración, en donde se ha perdido completamente la microestructura del hígado y los hepatocitos sufren apoptosis (Baiocchi et al., 2016).

El cáncer hepatocelular (HCC) es particularmente agresivo, en donde se ha registrado hasta un 70% de recurrencia en los primeros 5 años. El tratamiento más exitoso para el HCC es el trasplante de hígado; sin embargo, la falta de donadores impide que las personas

diagnosticadas con esta patología tengan un buen pronóstico. La mayoría de los pacientes que desarrollan carcinoma hepatocelular previamente presentan lesiones constantes en el hígado, este daño crónico impacta en los mecanismos de control de la proliferación de los hepatocitos desencadenando el cáncer (Novikova, Khromova, & Kopnin, 2017).

Antecedentes

Fenotipo de los hepatocitos y las acciones del TGF- β

Los hepatocitos, tanto *in vivo* como *in vitro*, presentan una plasticidad importante debido a que atraviesan por el proceso de EMT, sin una estimulación externa en el caso particular de los cultivos primarios (Mehta et al., 2016). Esto representa un problema al momento de querer evaluar el metabolismo de fármacos u otras funciones hepáticas, pero una ventaja al estudiar la EMT regulada por el TGF- β en procesos de regeneración. Cuando hablamos de regeneración hepática, la activación de las proteínas Smad y el aumento en los niveles de la proteína SnoN son importantes, puesto que es posible que la formación de los complejos Smad/SnoN permita a los hepatocitos proliferar en la presencia del TGF- β , y una vez que el hígado haya alcanzado su masa original los niveles de SnoN bajan para reestablecer las funciones anti-proliferativas del TGF- β (Macías-Silva, Li, Leu, Crissey, & Taub, 2002).

En un hígado sano los hepatocitos son células epiteliales con funciones altamente especializadas que dependen de su localización en el lobulillo hepático, y que son determinadas en parte por su exposición a un gradiente diferencial de nutrientes y oxígeno que corre desde la triada portal hasta la vena central, en donde los hepatocitos periportales son metabólicamente más activos, es decir, que a pesar de que todos los hepatocitos sintetizan albúmina, los periportales lo hacen en mayor cantidad, pero tras la activación del proceso de EMT, la albúmina deja de sintetizarse, por lo que se considera un marcador importante del fenotipo epitelial.

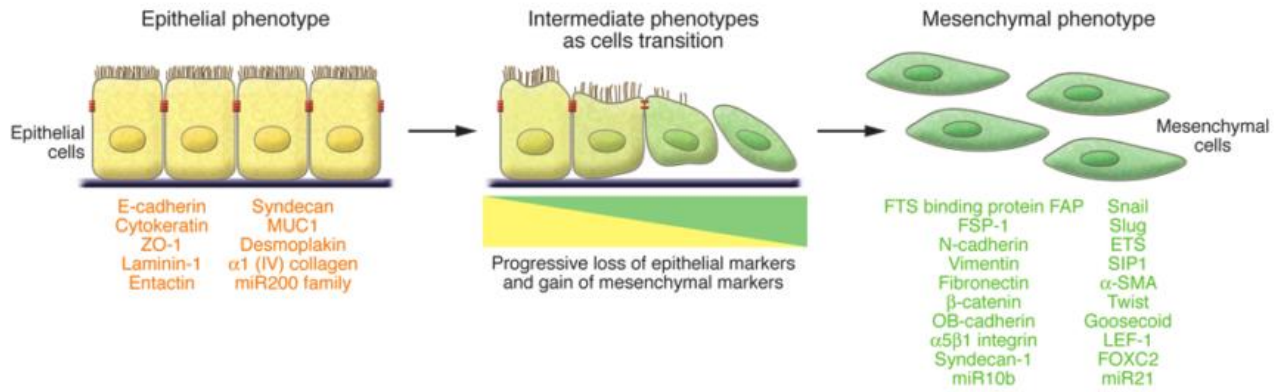


Figura 7. La EMT implica un cambio en el fenotipo de las células que se puede medir mediante marcadores de fenotipo como E-cadherina o ZO-1 para células epiteliales, y Vimentina, α -SMA e incluso β -catenina para células mesenquimales. Tomada de (Kalluri & Weinberg, 2009).

Hepatocitos cultivados en un sándwich de colágena tipo I

La técnica para cultivar hepatocitos primarios entre dos capas de colágena (sándwich) fue implementada por Dunn et al. en 1989, como un esfuerzo por evitar la pérdida de las funciones que tienen los hepatocitos en cultivo primario en una monocapa de colágena tipo I. Dos años más tarde el mismo grupo de investigadores, descubrieron que las funciones hepáticas perdidas se podían recuperar, incluso una semana después de que los hepatocitos se encontraban en cultivo, con solo agregar una segunda capa de colágena (Oorts et al., 2018). Desde entonces se han realizado más modificaciones a los cultivos de hepatocitos primarios para mantener su fenotipo y su funcionalidad, como realizar co-cultivos con otras células hepáticas (Shulman & Nahmias, 2013), suplementar el medio de cultivo con diferentes factores de crecimiento (TUSCHL & MUELLER, 2006) o bien utilizar sistemas de microfluídica (Novik, Maguire, Chao, Cheng, & Yarmush, 2010).

El sándwich de colágena es una técnica útil y sencilla que permite mantener el fenotipo de los hepatocitos por periodos prolongados, en donde se ha observado la formación de canalículos biliares, que después de unos días llegan a formar una red, similar a como ocurre en el hígado *in vivo*; cabe mencionar que en este proceso la participación de las uniones celulares estrechas es fundamental (Fu, Wakabayashi, Ido, Lippincott-Schwartz, & Arias, 2010). De igual forma, se ha demostrado que no sólo una segunda capa de colágena es importante para el mantenimiento de los hepatocitos en cultivo primario, sino también mantener una alta la densidad celular. Chinnici y colaboradores demostraron que la

densidad celular en la que se encuentran los hepatocitos en cultivo determina si estos entran a mitosis, apoptosis o pasan por el proceso de EMT, aun cuando en el medio de cultivo se encuentran los suplementos necesarios para mantener su fenotipo y función, o bien inducir la mitosis (Chinnici et al., 2017).

Planteamiento del Problema

Se sabe que los hepatocitos en cultivo primario pasan por un proceso de transdiferenciación, en el cual pierden marcadores de fenotipo epitelial y adquieren características mesenquimales (semejantes a fibroblastos) de manera intrínseca, es decir, sin estimulación exógena alguna. La vía del TGF- β es una de las vías principales que controlan la plasticidad de los hepatocitos; por lo tanto, es de nuestro interés estudiar el papel y el estado de activación que tiene la vía de señalización de la citocina TGF- β durante el desarrollo de este fenómeno de transdiferenciación de los hepatocitos en cultivo primario, e investigar su contribución a la regulación del mismo.

Hipótesis

La vía de señalización del TGF- β se activará gradualmente y favorecerá la transdiferenciación de los hepatocitos durante el proceso de transición epitelio-mesénquima por el cual atraviesan estas células al ser mantenidas en cultivo primario por periodos prolongados.

Objetivos

General

Investigar el estado de activación y la participación de la vía canónica de señalización del TGF- β en hepatocitos primarios, que pasan por el proceso de EMT al ser cultivados durante periodos prolongados.

Particulares

1. Evaluar los niveles de algunos marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal que expresan los hepatocitos en cultivo primario, mantenidos por periodos prolongados en monocapa o en sándwich de colágena tipo I.
2. Evaluar la función y el estado de activación de la vía del TGF- β (niveles de p-Smad2 y de SnoN) en hepatocitos recién aislados (frescos) y en hepatocitos en cultivo primario, mantenidos por diferentes tiempos en monocapa o en sándwich de colágena tipo I.

Estrategia Experimental

Obj 1. Evaluar los niveles de algunos marcadores de fenotipo epitelial y mesenquimal que expresan los hepatocitos en cultivo primario, mantenidos en monocapa y en sándwich de colágena tipo I (ColI).

- a) Evaluar por microscopía de campo claro la morfología de los hepatocitos cultivados en monocapa por 1, 3, 5 y 7 días, bajo las siguientes condiciones de tratamiento: Control, TGF- β [100 pM] o SB431542 [10 μ M].
- b) Evaluar y comparar por microscopía de campo claro la morfología de los hepatocitos cultivados en monocapa y en sándwich de ColI por 1, 3, 5 y 7 días.
- c) Evaluar los niveles de las proteínas HNF4- α y albúmina (marcadores epiteliales) y de vimentina y α -sma (marcadores mesenquimales) por inmunoblots, en los hepatocitos cultivados en monocapa y sándwich de ColI por 1, 3, 5 y 7 días. Evaluar los niveles de las proteínas actina y tubulina como controles de carga
- d) Evaluar por inmunofluorescencia la localización subcelular de las proteínas HNF4- α y albúmina (marcadores epiteliales), y de vimentina y α -sma (marcadores mesenquimales) en los hepatocitos cultivados en monocapa y en sándwich de ColI por 1, 3, 5 y 7 días

Obj 2. Evaluar el estado de activación de la vía del TGF- β (niveles de p-Smad2 y de SnoN) en hepatocitos frescos y en hepatocitos en cultivo primario, mantenidos en monocapa o en sándwich de ColI por diferentes tiempos.

- a) Evaluar por ensayos de WB el estado de fosforilación en el motivo SSXS del COOH-terminal la proteína Smad2, así como los niveles totales de Smad2 en hepatocitos cultivados en monocapa y en sándwich de ColI por 1, 3, 5 y 7 días.
- b) Evaluar por ensayos de IP/WB los niveles de la proteína SnoN, y su interacción con las proteínas Smad2 y Smad3 en hepatocitos cultivados en monocapa de ColI por 1, 3, 5 y 7 días.

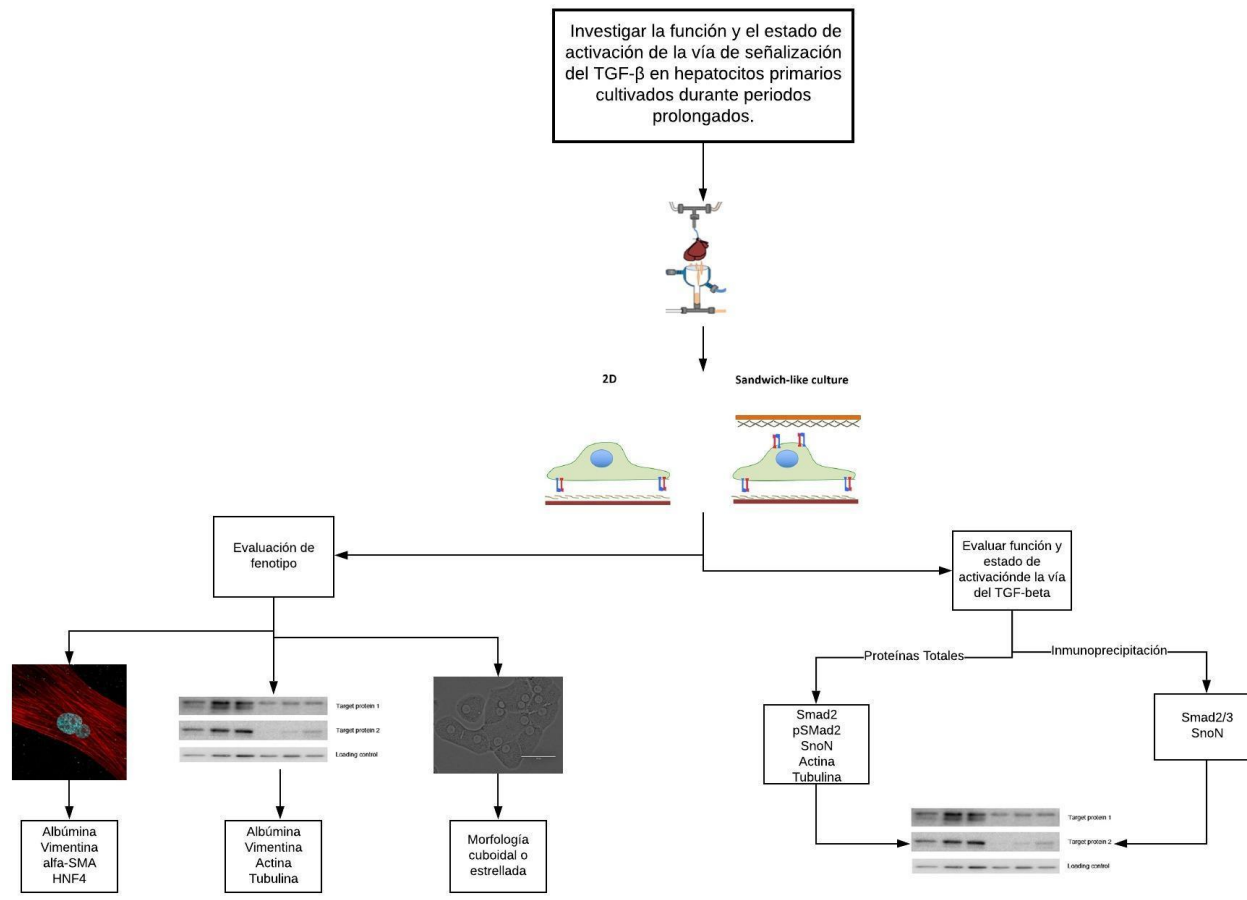


Figura 8. Estrategia Experimental

Materiales y Métodos

Aislamiento de hepatocitos de rata

Para el aislamiento de los hepatocitos se utilizaron ratas Wistar macho de aproximadamente 250g de peso, obtenidas del Bioterio del IFC, UNAM. Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de xilacina/ketamina en una relación 80/10 mg/kg de peso, inyectada por vía intramuscular. Una vez que la rata ya no presentaba respuesta a estímulos externos (como parpadeo, movimiento de vibrisas o corrección en la posición de las patas traseras), se procedió a colocarla en posición para la cirugía (Sosa-Garrocho, 2016).

Se realizó un corte en la parte abdominal de la rata, y los intestinos se movieron de lugar, de manera que se expusó a la vena porta. Con ayuda de unas pinzas se colocaron dos hilos: uno sencillo que se utilizó para ligar la parte inferior de la vena porta y facilitar así la manipulación de la misma; y uno doble, que al momento de introducir la cánula ayudó a mantenerla unida a la vena. Se realizó un pequeño orificio en esta vena con unas tijeras pequeñas y se procedió a introducir la cánula y ligarla con el hilo; posteriormente, se cortaron los ligamentos que mantienen unido al hígado con los órganos cercanos a éste, como los intestinos, y se aisló y colocó al hígado en el contenedor 3 del perfusor mostrado en la Figura 6.

Una vez que el hígado está en posición, se aumentó el flujo y se perfundió al órgano con solución de *Krebs-Ringer* sin Calcio (amortiguado con NaHCO_3 a pH de 7.35-7.4 y gaseado con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2), para remover la sangre y evitar que se coagule. Una vez que el hígado cambió a un color café claro, aproximadamente 10 min después se cambió a una solución de *Krebs-Ringer* + CaCl_2 (cofactor indispensable para la actividad de la colagenasa) a una concentración de 1.27mM durante 3 min, y después se agregó la colagenasa (a una concentración de 1mg/ml) en el contenedor 2, luego se activó la bomba peristáltica que permitió la recirculación. El hígado permaneció en el sistema de recirculación aproximadamente 30 min o hasta que se observó que el hígado perdió su integridad. Una vez digerido el hígado se colocó en una caja de Petri con solución *Krebs-Ringer* + CaCl_2 y se ayudó a liberar a las células con una punta de micropipeta. La mezcla resultante fue filtrada con una malla de nylon de 300-500 μm para remover agregados y fragmentos de tejido. El filtrado se colocó en un tubo de 50mL y se llevó a un volumen de

45mL con *Krebs-Ringer* + CaCl_2 y se agitó suavemente por inversión. Para realizar los lavados, la solución con las células se centrifugó a 500 rpm durante 2 min a temperatura ambiente, y se retiró cuidadosamente el sobrenadante, el botón celular resultante fue resuspendido en la misma solución y se repitieron dos veces más los lavados (Sosa-Garrocho, 2016).

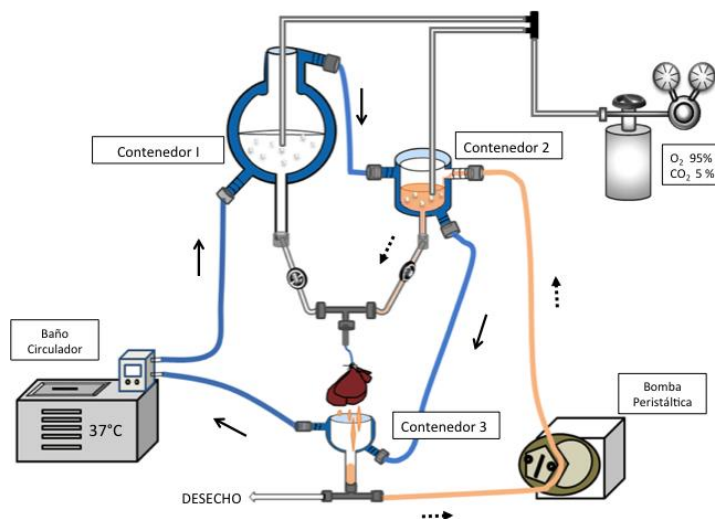


Figura 8. Aparato de perfusión en el cual se recircula agua a 37°C con el fin de mantener tanto las soluciones como al órgano a esta temperatura durante el procedimiento de aislamiento. En el contenedor 1 se coloca la solución *Krebs-Ringer*, el contenedor 2 se utiliza para verter la colagenasa (con *Krebs Ringer* + Ca) y el contenedor 3 mantiene al hígado y recolecta la colagenasa para recircularla con ayuda de una bomba de perfusión. Tomada de (Sosa-Garrocho, 2016).

Se retiró la solución *Krebs-Ringer* + CaCl_2 y se resuspendió el botón celular en PBS + penicilina/estreptomina se centrifugó nuevamente a 500 rpm por 2 min. En el último lavado, las células se resuspendieron en PBS + penicilina/estreptomina (1%) y Percoll, en volúmenes iguales, esto bajo condiciones estériles. La solución con las células se centrifugó a 800 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante que contenía a las células no parenquimatosas y/o muertas. El pellet resultante se resuspendió mediante inversión en Medio Adhesión (MA) adicionado con antibióticos a temperatura ambiente, antes de la siembra.

Técnicas de cultivo celular

Antes de realizar la siembra de los hepatocitos, se prepararon cajas de Petri cubiertas con colágena tipo I (Coll) de rata a una concentración de 1 mg/ml, para esto se utilizaron cajas estériles en las que se vertió 1 ml de colágena previamente diluida en ácido acético al

0.2M, se balancearon las cajas de manera que la colágena cubriera toda la superficie, y se retiró el excedente con ayuda de una pipeta. Para asegurar la esterilidad, las cajas fueron secadas bajo luz UV.

Es importante conocer el número de células que se siembran por caja de manera que la densidad no varíe, para esto se realizó una cuantificación utilizando la cámara de Neubauer. En resumen, se tomaron 100 μL de las células resuspendidas en medio de adhesión y se mezclaron con 100 μL de azul de tripano (4mg/ml); luego se colocaron 10 μL de esta mezcla dentro de la cámara a modo de que la capilaridad llene el espacio que existe entre el cubreobjetos y la cámara. Para realizar el conteo se tomaron en cuenta las células presentes en 5 cuadrantes, de manera que se pueda realizar un promedio de estos. Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para calcular el número de células presentes en 1 mL de medio de adhesión:

$$P \times 10^4 \times 2 = \text{número de células en } 1\text{mL}$$

Donde P es el promedio de células obtenido de 3 cuadrantes de la cámara de Neubauer, 10^4 el volumen de la cámara y 2 el factor de dilución al que se encuentran los hepatocitos.

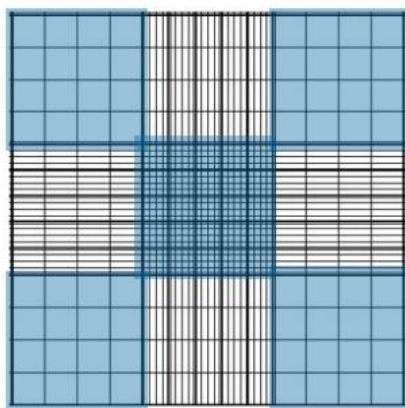


Figura 9. Cuadrantes tomados a consideración para la cuantificación celular utilizando la cámara de Neubauer. Tomada de (Bastidas, 2011).

A partir de este número se tomó el volumen necesario para que en las cajas Petri quedaran sembradas alrededor de 3 millones de células en cada una de las cajas de 10 cm de diámetro, o bien 400 mil células fueron sembradas en las cajas de 35 mm de diámetro.

Para llevar a cabo la siembra, se colocaron 3 ml de medio de adhesión en la caja, después se colocaron las células y se dejaron incubar durante 3h, transcurrido este tiempo se aspiró

el medio con ayuda de una pipeta Pasteur estéril, y se colocaron 5 ml de medio de mantenimiento, el cual se cambió cada dos días.

Cultivo de Hepatocitos en Sándwich de colágena tipo I

Para realizar el cultivo de hepatocitos en sándwich de ColI, se prepararon cajas con colágena tipo I esterilizadas mediante la exposición a luz UV por 30 min, y se sembraron las células como se describió anteriormente. Las células permanecieron en medio de adhesión durante 4h a 37°C para permitir la adhesión a la primera capa de colágena. Posteriormente se retiró el medio y se realizó un lavado con PBS para retirar a las células que no se hubieran adherido, es decir que estuvieran muertas en el cultivo. Se colocó por goteo una capa de solución de colágena mezclada con medio DMEM/F12 10X como se describe en la tabla 1, 300µL para cajas de 6 pozos y 600µL para cajas Petri de 10cm. Es necesario rotar la caja para que todas las células se cubran con una delgada capa de esta solución. Es importante mencionar que debido a que la colágena se encuentra diluida en ácido acético es necesario neutralizar la mezcla con una solución de hidróxido de sodio previamente filtrada, para asegurar la esterilidad de toda la solución. Para confirmar que la solución se encuentra a un pH de 7-7.5 se utilizaron tiras indicadoras de pH, para esto se tomó una pequeña cantidad con una punta estéril y se vertió sobre la tira indicadora, de esta manera no se compromete la esterilidad de la solución. Una vez cubiertas las células con ColI, se colocaron nuevamente a 37°C durante 45 min, o hasta que gelificó la segunda capa de colágena, para esto se utilizó la mezcla sobrante como control de gelificación. Posteriormente se agregó nuevamente medio de adhesión durante 4h a 37C°, después se cambió a medio de mantenimiento, y fue necesario cambiar el medio de cultivo diariamente (Godoy et al., 2013; Lecluyse & Alexandre, 2010).

Tabla 1. Preparación de segunda capa de colágena para cultivo en sándwich, los reactivos deben agregarse en el orden que se indica. * la colágena fue utilizada a una concentración inicial de 1mg/ml diluída en ácido acético. Tomada de (Lecluyse & Alexandre, 2010).

	5 ml	10 ml	15ml	20ml
*Colágena (2mg/ml)	2	4	6	8
Agua Estéril	2	4	6	8
DMEM 10x	0.5	1	1.5	2
0.2 N NaOH	0.5	1	1.5	2

Lisis celular y cuantificación de proteínas

Para lisar a las células y extraer a las proteínas se utilizó el buffer RIPA modificado adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (descritos en el anexo), el cual debe prepararse previamente. Se colocaron las cajas de cultivo sobre una charola con hielo, esto para mantener todo el proceso a 4°C. Las cajas fueron lavadas con 2ml de PBS, no fue necesario que estuviera estéril. Se aspiró el PBS para agregar 1ml del buffer RIPA modificado adicionado con los inhibidores. Una vez que el buffer cubrió toda la superficie de la caja, las células se rasparon con una espátula, y con una micropipeta se retiró el buffer con el lisado celular de la caja, y se colocó en un microtubo. Los microtubos se colocaron en agitación a 4°C durante 1h. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras durante 10 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a un microtubo nuevo. Las muestras pueden ser almacenadas después de ser congeladas mediante la técnica de congelamiento *Flash-frozen*, en la cual se sumergen los microtubos en etanol a -70°C.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford (Biorad). Brevemente, en una celda para espectrofotómetro se colocaron 800 µl de agua destilada, 2 µl de muestra y 200 µl del reactivo de Bradford, en ese orden, y se mezclaron por inversión. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 595 nm. Para calcular la concentración de proteínas en µg/ml se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{Abs\ 595 - 0.0066}{0.0518} \times 500$$

Nota: Fórmula obtenida de la regresión lineal de la curva patrón realizada con Albúmina (1-10µg) donde la pendiente (m) es igual a 0.0518 y la ordenada al origen (b) es igual a 0.0066. El resultado se multiplica por el factor de dilución (500) para obtener la concentración de proteínas en µg/ml.

Electroforesis de proteínas y Western Blot

La técnica SDS-PAGE permite separar a las proteínas desnaturalizadas utilizando geles de poliacrilamida, que poseen poros cuya apertura es dependiente de la concentración de acrilamida y bis-acrilamida; y el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS), que se asocia con las proteínas formando complejos desnaturalizados y cargados negativamente, le permite a la cadena polipeptídica migrar a través del gel con ayuda de un campo eléctrico, para separar a las proteínas con base en su peso molecular. Se utilizó al ditiotreitól (DTT),

quien reduce a los enlaces disulfuro haciendo que la estructura cuaternaria se pierda y en consecuencia hace que las subunidades de la proteína se separen en cadenas peptídicas individuales (Lomonte, 2008).

Para cargar las muestras de proteína, fue necesario hacer alícuotas con la misma concentración de proteína (tomando los datos de la cuantificación de Bradford) y agregar Laemmli 1X. Se montó el gel de poliacrilamida, previamente preparado, en la cámara de electroforesis, con buffer de corrida para cubrir la parte superior e inferior del gel. Las muestras se cargaron con la ayuda de una jeringa Hamilton, y luego se cerró la cámara, se aplicó un voltaje de 50mV para geles grandes y 100mV para geles pequeños hasta que el frente de migración salió del gel.

Una vez terminada la electroforesis se desmontó la cámara, y el gel se cargó en un diskette para llevar a cabo la transferencia. Fue necesario utilizar esponjas y papel filtro para mantener el gel y la membrana de PVDF, en contacto con el buffer de transferencia. La membrana de PVDF se cortó al tamaño del gel, y se hidrató previamente en metanol absoluto y después en buffer de transferencia nuevo. Se montó en una cámara de transferencia, de manera que las proteínas migraran del gel hacia la membrana, para esto se utilizó una corriente eléctrica de 240 mA, aplicada durante 1 h. La cámara de transferencia se colocó a 4°C, y dentro se colocó una barra magnética con el fin de mantener el buffer en agitación y tener una temperatura uniforme.

La membrana se retiró de la cámara de transferencia y se colocó en una solución de bloqueo elaborada con el buffer TBST y leche descremada al 5%, se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 1h. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación, y para reducir el volumen, la membrana se colocó dentro de una bolsa de plástico sellada. Terminado el tiempo de incubación, la membrana se retiró de la bolsa y se enjuagó con agua rápidamente, y después se le realizaron 3 lavados con TBST por 2-3 min cada uno, en agitación cada vez. Se incubó con el anticuerpo secundario durante 1h a temperatura ambiente en agitación, se repitieron el enjuague con agua y los lavados con TBST. Para revelar fue necesario sumergir 1 min la membrana en solución con luminol, se colocó la membrana en una bolsa de plástico y se colocó sobre un trozo de película azul. El tiempo de exposición en la placa depende de la proteína de interés. La película azul se colocó en solución reveladora, agua y por último en solución de fijación.

Una vez secas las placas se etiquetaron, y escanearon con el escáner de la marca HP modelo 5590, para posteriormente realizar un análisis de densitometría con ayuda del programa ImageJ.

Inmunoprecipitación de proteínas

La inmunoprecipitación de proteínas es un ensayo que nos permite detectar la interacción de nuestra proteína de interés con una o más proteínas, y de esta forma poder inferir la actividad que está llevando a cabo. Para esto es necesario utilizar la misma cantidad de proteína, en nuestro caso utilizamos 2 mg de proteína diluidos en 1 ml de solución. A continuación, se agrego el anticuerpo anti-Smad2/3 (N-19) (SC-6032) diluido en RIPA (de tal manera que cada muestra contenga 2µL de anticuerpo) y se dejó en agitación a 4°C toda la noche. Posteriormente se agregaron 60µL de proteína G-sefarosa por microtubo, diluida 1:5 en TNTE al 0.1%, incubando nuevamente en agitación a 4°C durante 2h. Después las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 1 min, el sobrenadante fue retirado con una punta limpia y almacenado para una segunda inmunoprecipitación (para la segunda inmunoprecipitación fue utilizado el anticuerpo anti-SnoN (B-3) (SC-136958). Las perlas de proteína G fueron lavadas 3 veces con el buffer TNTE, invirtiendo suavemente los microtubos para resuspender a la proteína G, sin afectar los complejos de proteína formados, y en el último lavado se utilizó una punta de pipeta tipo “colibrí” para retirar eficientemente los restos de buffer. Como paso final, las perlas de proteína G se resuspendieron en 30µL de buffer Laemli 2x, que interrumpe la interacción del anticuerpo utilizado con la proteína G, y por tanto libera al complejo, las muestras se hirvieron por 5 min para desnaturalizar a las proteínas. Después de este paso, las muestras pueden ser almacenadas a -20°C hasta que se procede con la electroforesis.

Inmunofluorescencia

Previo a la técnica de inmunofluorescencia es necesario realizar el cultivo de los hepatocitos sobre un cubreobjetos tratado con ColI. Para esto se requiere hacer una secuencia de lavados al cubre:

- 4 lavados con 1ml de etanol 70% filtrado
- 1 lavado con PBS filtrado
- 4 lavados con dH₂O filtrada

Al concluir el último lavado, se agregó la ColII a una concentración de 1mg/ml hasta cubrir completamente el material y se retiró el excedente, para secar y esterilizar se expone durante 45 min a luz UV. Una vez transcurrido este tiempo se procedió con la siembra de los hepatocitos.

La inmunofluorescencia es una técnica en donde se utilizan dos anticuerpos: el primario, utilizado para reconocer a la proteína de interés, y el secundario, que se encuentra asociado a un fluorocromo y reconoce al anticuerpo primario. El fluorocromo es una molécula que posee un espectro de emisión y de excitación definidos por lo que al estimularlo se puede detectar la presencia del anticuerpo primario (Calderón, 2007).

Para empezar, se retiró el medio de cultivo presente y se realizó un lavado con PBS filtrado, las células se fijaron con PFA al 4% (filtrado) durante 30 min. Después se realizaron 3 lavados con PBS filtrado, y las células fueron permeabilizadas con 500µl de metanol durante 6 min, a una temperatura de -20°C. En el siguiente paso, se colocó 1 ml de PBS filtrado sobre el metanol, ya que es importante que las células nunca se sequen, después se realizaron dos lavados más con PBS.

Se agregó 1 ml de suero de caballo (HS) al 10% y se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente; posteriormente, se agregó el anticuerpo primario diluido en la solución con HS, para esto fue necesario cambiar a los cubreobjetos a una caja de Petri estéril, y utilizar un trozo de *parafilm* y un algodón ligeramente húmedo para proteger a las muestras de la desecación. El anticuerpo primario fue incubado toda la noche a 4°C.

Antes de agregar el anticuerpo secundario fue necesario colocar a los cubres nuevamente en una caja de 12 pozos, y realizar 3 lavados, con PBS filtrado, de 5 min cada uno; posteriormente, se agregaron 300µl del anticuerpo secundario, y se cubrió la caja con papel aluminio, con el fin de proteger a las muestras de la luz, y se incubó en agitación durante 2h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS, 5 min cada uno, se realizó un lavado final con dH₂O filtrada, y se procedió con el montaje. Es importante mantener siempre a las muestras protegidas de la luz directa.

Para el montaje se colocaron 10µl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1µg/mL) sobre los portaobjetos, se tomaron los cubreobjetos con unas pinzas, y se colocaron invertidos sobre los portaobjetos, de manera que las células quedaran cubiertas por el DAPI. Para retirar el líquido excedente de las muestras, se invirtieron los portaobjetos sobre un papel

filtro. Una vez seca la superficie de los cubreobjetos, se utilizó barniz para sellar a las muestras.

Aislamiento de RNA

El RNA total fue aislado de hepatocitos de cultivo primario, brevemente, se aspiró el medio y sin realizar ningún lavado se adicionó 5mL de Trizol por cada 3 millones de hepatocitos sembrados en cajas de 10cm de diámetro y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se adicionó 0.2mL de cloroformo por mL de Trizol utilizado y se agitó a máxima velocidad con ayuda de un Vortex, posteriormente se dejó incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente para después ser centrifugado a 3400rpm durante 45 minutos a 4°C, una vez que se observan dos fases se transfirió la fase acuosa y se agregaron 500µL de isopropanol por mL de Trizol utilizado y se mezcló por inversión. Después de incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugo a 11,000 rpm durante 45 minutos a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol al 75% y se agitó a máxima velocidad con ayuda de un Vortex, nuevamente se centrifugó a 11,000 rpm durante 40 minutos a 4°C. Por último, se retiró el sobrenadante y se dejó evaporar el pellet correspondiente al RNA el cual se resuspendio en H₂O DEPC.

RT-PCR

Se emplearon 2µg de RNA total para la síntesis de cDNA utilizando hexámeros al azar, y la enzima de *Moloney murine leukemia Virus RT (M-MLV RT)* (Invitrogen). Con el cDNA obtenido se realizó una PCR utilizando Taq PCR Master Mix (Qiagen) y oligonucleótidos específicos para SnoN o β-actina, usando el siguiente programa: 95 °C 5 min, 95 °C 45 sec, 55/60 °C 30 sec, 72 °C 1 min. Los productos del PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron y fotografiaron tiñendo con Bromuro de Etidio (0.5µg/mL) e iluminando con luz UV.

Gen		Secuencia <i>primer</i> 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>SnoN/SnoN2</i>	Fw	CTG CTG CGT CCC AGT CTA	308 (snoN), 420 (snoN2)
	Rw	TGA ACT GCT CAG CAT CTC CAC CTC CAT	
	RW	GCT GCA TAA ACT CGT GGT CA	
<i>β-actina</i>	FW	GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG	237
	RW	GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	

Análisis Estadístico

Los valores obtenidos de la densitometría fueron analizados con el programa GraphPad Prism 6 y se realizó una prueba estadística *t de student*, en donde un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

Resultados

El cultivo de los hepatocitos primarios en sándwich de ColI retrasa los cambios en su morfología

Los hepatocitos primarios cultivados en monocapa de colágena cambian su fenotipo de poligonales-redondos a células alargadas con proyecciones de la membrana, lo que asemeja a una célula tipo fibroblasto. Este cambio fenotípico se comienza a observar desde el día 3 de cultivo primario y para el 7° día en cultivo las proyecciones de la membrana plasmática de los hepatocitos llegan ser muy largas, y se vuelve difícil visualizar la membrana plasmática de las células. Como observamos en la Figura 10, al primer día de cultivo los hepatocitos se encuentran formando cordones y conjuntos celulares en ambas condiciones, la membrana de los hepatocitos se observa bien delimitada y en algunas células se puede observar con claridad la presencia de dos núcleos. En el tercer día de cultivo en monocapa de ColI las células comienzan a presentar un estiramiento de sus membranas, con el cual se dificulta visualizar en donde termina la membrana. A partir del quinto día de cultivo en monocapa de ColI los hepatocitos primarios presentan grandes proyecciones membranales y se vuelve difícil distinguir entre una célula y otra, también se observan agregados en el interior de las células. En el séptimo día de cultivo morfológicamente las células se aprecian similares a las del 5°; sin embargo, las proyecciones membranales se ven más largas y debido al estiramiento que tiene el hepatocito, resulta complicado observar su membrana plasmática. Cabe mencionar que entre un cambio de medio de cultivo y otro, ocurrido cada tercer día, se removían a las células muertas, por lo que a los 7 días de cultivo en monocapa también observamos una menor cantidad de células. Se ha reportado previamente que existen células que en vez de transdiferenciarse son llevadas a apoptosis (Shi, Massague, & Massagué, 2003), por lo que suponemos que no todas las células en el cultivo son capaces de pasar por el proceso de la EMT.

Por otro lado, los hepatocitos cultivados en sándwich de colágena se observan con un leve cambio en su morfología, a los 3 días presentan un leve estiramiento en su membrana, en el cual la célula pasa de una forma redondeada a una un poco más poligonal; esta forma se mantiene hasta los 5 días de cultivo, estirándose un poco más a los 7 días. Al comparar los hepatocitos cultivados a los 7 días en monocapa de ColI con los hepatocitos cultivados con el método de sándwich de ColI, observamos que el método de sándwich de ColI nos

permite conservar la morfología de la célula por al menos 5 días, y evita el estiramiento de los hepatocitos y la adquisición de una morfología tipo fibroblasto, aunque falla en mantener la forma redondeada que presentan los hepatocitos en el día 1 de cultivo.

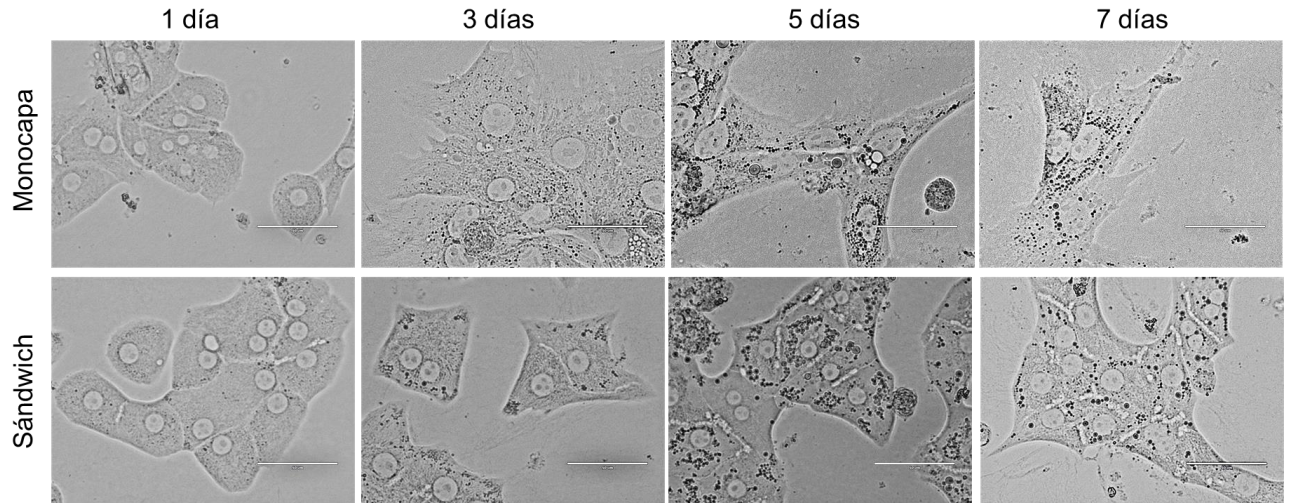


Figura 10. El cultivo en sándwich de colágena retrasa el cambio de morfología de los hepatocitos primarios. Hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena durante 7 días. Fotografías tomadas con microscopio EVOs. Barra 200 μ m

Para evaluar el cambio en los niveles de los marcadores de fenotipo epitelial (albúmina) y mesenquimal (vimentina) a lo largo de 7 días de cultivo, se lisaron a los hepatocitos después de diferentes días de cultivo: el mismo día del asilamiento, así los hepatocitos frescos fueron considerados como 0 días de cultivo, y los demás se cultivaron por 1, 3, 5 y 7 días. En la Figura 11 podemos observar como los niveles de albúmina son muy abundantes en los días 0 y 1 de cultivo, y bajan considerablemente a partir del tercer día de cultivo en monocapa de ColI, y se mantienen así hasta los 7 días, lo que indica una pérdida gradual del fenotipo epitelial, mientras que en el caso del marcador mesenquimal vimentina se observa lo opuesto, empieza con niveles muy bajos de expresión en hepatocitos frescos, que luego aumentan de forma gradual hasta incrementarse cerca de 15 veces en comparación con lo observado para los hepatocitos frescos. Cuando comparamos los marcadores de fenotipo en los hepatocitos cultivados en sándwich de ColI, la proteína albúmina no disminuye sus niveles y por el contrario, los aumenta incluso al doble de los observados en los hepatocitos frescos. En la gráfica (Fig 11B) es interesante observar claramente como al primer día de cultivo en sándwich de ColI los niveles de albúmina aumentan al doble, mientras que a los 3 y 5 días se mantienen cerca del valor inicial y

posteriormente vuelven a subir. En cuanto al marcador mesenquimal vimentina, observamos que no existen diferencias significativas en los niveles de la proteína cuando los hepatocitos son cultivados en monocapa o en sándwich de ColI (Fig 11C), ya que en ambas modalidades la proteína aumenta aproximadamente 15 veces con respecto a los niveles vistos en los hepatocitos frescos. Esto puede indicar que, en el tercer día de cultivo, ya sea en monocapa o sándwich de ColI, tiene lugar un cambio en los mecanismos de regulación del fenotipo epitelial de los hepatocitos.

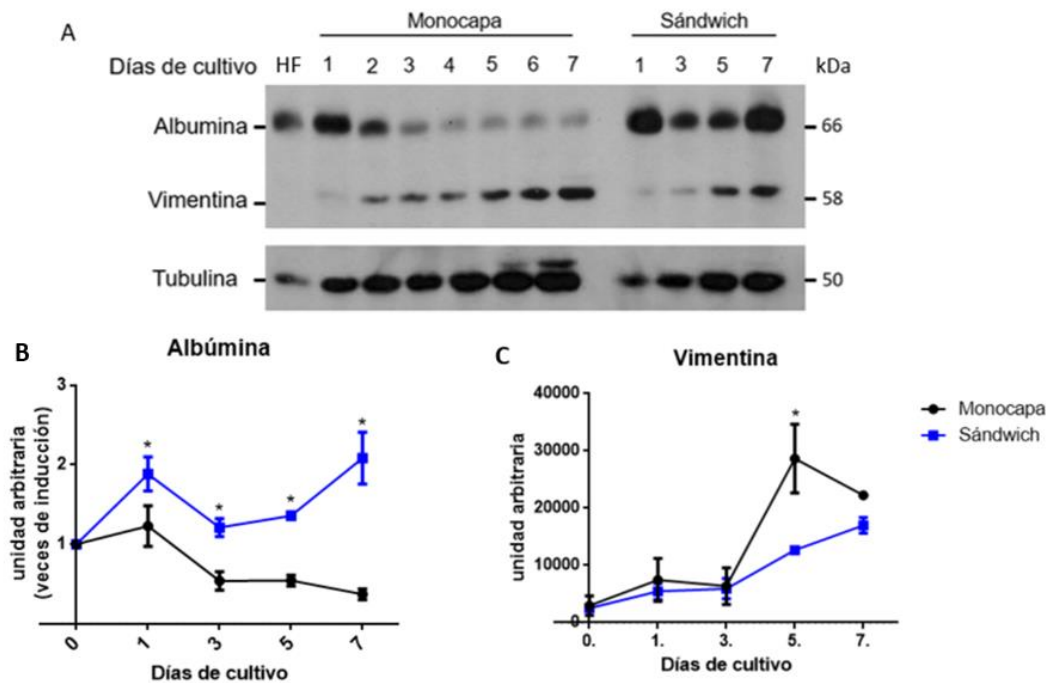


Figura 11. El cultivo en sándwich de colágena retrasa la expresión de marcadores mesenquimales y mantiene por más tiempo la expresión de marcadores epiteliales. (A) Cambio en los niveles de expresión de los marcadores de fenotipo Albúmina y Vimentina en hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena. (B) y (C). Análisis por densitometría del inmunoblot para Albúmina y Vimentina en hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena. T-student $p < 0.05$

Posteriormente nos propusimos analizar mediante inmunofluorescencia la localización subcelular de los ya mencionados marcadores vimentina y albúmina, además de la α -SMA como un marcador de fenotipo mesenquimal, y a HNF4- α (por sus siglas en inglés de *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) como un marcador de hepatocitos diferenciados; cabe mencionar, que estos marcadores han sido utilizados en otros estudios (Cicchini et al., 2015; Giannelli et al., 2016; Yue et al., 2010). Podemos observar en la Figura 12 la

presencia de la proteína HNF4- α con una localización predominantemente nuclear en los hepatocitos de 1 día de cultivo. HNF4- α es un miembro de una superfamilia de receptores nucleares que se ha asociado a la regulación transcripcional de genes hepáticos que participan particularmente en las funciones metabólicas del hígado, como el metabolismo de glucosa y lípidos; sin embargo, también es importante para la diferenciación y morfogénesis de los hepatocitos durante el desarrollo embrionario para formar el hígado adulto, debido a esto podemos considerar que los hepatocitos de 1 día cultivados en monocapa de colágena permanecen funcionales y diferenciados. Recientemente se ha asociado a HNF4- α con un papel en la regulación de las uniones celulares, así como con enfermedades que implican una inflamación crónica e incluso con la EMT (Babeu & Boudreau, 2014), esto nos resulta interesante ya que observamos como a los 7 días de cultivo en monocapa de ColI la expresión de HNF4- α se pierde totalmente, observación que podemos verificar en la Figura 16, donde los niveles de HNF4- α se pierden a los 5 días de cultivo. Cuando los hepatocitos son cultivados en sándwich de ColI observamos como la ubicación nuclear de HNF4- α se mantiene a los 7 días. Tomando en cuenta estos resultados, podemos decir que los hepatocitos cultivados en sándwich de ColI son células que mantienen su estado de diferenciación mas tiempo, y por lo tanto también sus funciones; sin embargo, son necesarias otro tipo de pruebas para evaluar la funcionalidad de los hepatocitos. Otros estudios han evaluado el metabolismo de lípidos, producción de urea y excreción de bilis cuando los hepatocitos son cultivados en la modalidad de sándwich de colágena (Oorts et al., 2018; Zeigerer et al., 2017) demostrando así que este método de cultivo es eficaz para mantener la morfología, la polaridad y la funcionalidad de los hepatocitos *in vitro*. La deslocalización de HNF4- α que observamos en los hepatocitos cultivados en monocapa puede favorecer el cambio de fenotipo. De acuerdo con reportes anteriores, HNF4- α es capaz de reprimir el programa transcripcional de la EMT para mantener el fenotipo de los hepatocitos y es posible que HNF4- α adquiera modificaciones postraduccionales, como resultado de la activación de la vía de TGF- β , como cambios bioquímicos en sus motivos de unión al DNA, lo que le impide unirse a las secuencias promotoras de sus genes blanco (Cozzolino et al., 2013; Santangelo et al., 2012).

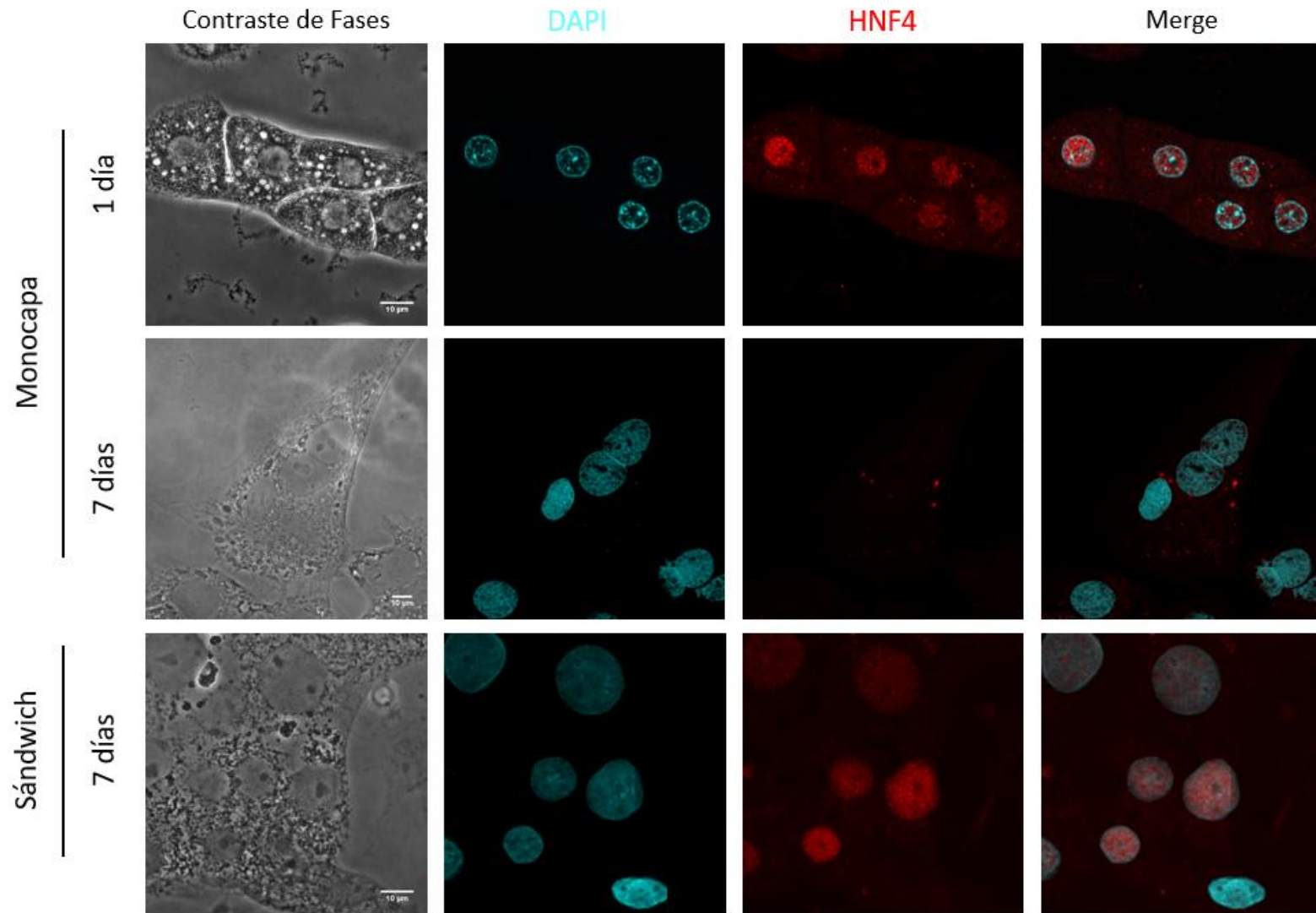


Figura 12. El cultivo en sándwich mantiene la expresión nuclear de HNF4. Inmunofluorescencia para detectar HNF4 en hepatocitos de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena durante 1 y 7 días. La barra de escala representa 10 μm .

La albúmina es una proteína sintetizada exclusivamente por los hepatocitos del hígado, su función en el cuerpo es la de transportar moléculas poco solubles como hormonas, colesterol, y fármacos, entre otras, ya que esta proteína no tiene mecanismos de almacenamiento es necesaria su síntesis diaria, debido a esto la medición de los niveles de la albúmina sérica en los estudios clínicos es utilizada para evaluar la función hepática de los pacientes (Artigas, Wernerman, Arroyo, Vincent, & Levy, 2016; J. L. Vincent, 2009) y de igual forma nos ayuda a conocer la funcionalidad de los hepatocitos en cultivo. Acorde con lo observado anteriormente, la albúmina es muy abundante al primer día de cultivo con una ubicación subcelular citoplasmática, lo que indica que las células mantienen un fenotipo epitelial. Cuando los hepatocitos pasan 7 días cultivados en monocapa de ColI, la expresión de albúmina disminuye considerablemente, por lo que observamos muy poca albúmina en el citoplasma de los hepatocitos de 7 días; sin embargo, cuando se cultivan los hepatocitos en sándwich de ColI se mantienen altos los niveles de albúmina en la célula (Figura 11 y 13).

Por otra parte, se observó también la localización de la proteína vimentina en el citoplasma de los hepatocitos de 1 día de cultivo (Figura 11 y 14), si bien la vimentina es utilizada generalmente como un marcador de células mesenquimales, es una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto que participa en diferentes procesos celulares como la regulación de la adhesión, migración y la mecanotransducción (Eriksson et al., 2009), por lo que se puede considerar que los hepatocitos tienen un nivel basal de expresión de vimentina, aun cuando no han pasado por ningún proceso de cambio fenotípico, como lo ha reportado J. Kim y colaboradores recientemente, en donde analizaron diferentes marcadores de fenotipo, incluyendo la vimentina, en un modelo de regeneración hepática y observaron que incluso los hepatocitos murinos aislados inmediatamente después de una hepatectomía parcial presentan niveles bajos de vimentina (Kim et al., 2018). Tras 7 días de cultivo en monocapa de ColI, aumentan los niveles de la vimentina en los hepatocitos, y se observa con una distribución organizada en forma de filamentos, lo que nos sugiere que se encuentra interactuando con el citoesqueleto. Como se mencionó anteriormente, la vimentina no sólo es parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto, sino que también participa en diferentes funciones celulares como la adhesión y la migración, por lo cual es posible que los hepatocitos, una vez transdiferenciados a un fenotipo tipo fibroblasto adquieran la capacidad de migrar; sin

embargo, esto no ha sido demostrado en ningún modelo. Por lo tanto, podemos sugerir que el aumento en los niveles de la vimentina y el cambio en su organización contribuyen al cambio en la morfología de la célula.

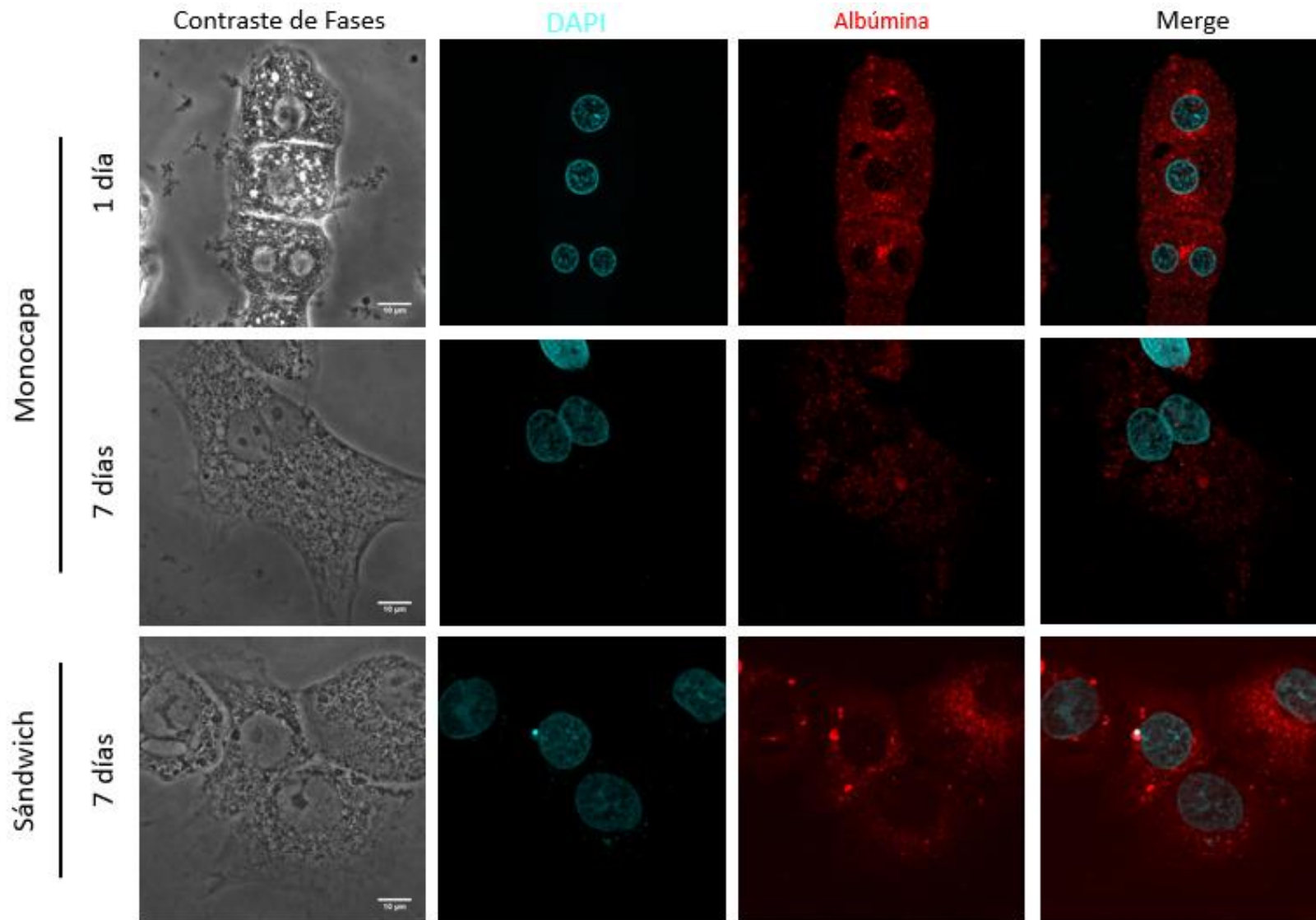


Figura 13. El cultivo en sándwich mantiene la expresión de Albúmina. Inmunofluorescencia para detectar Albúmina en hepatocitos de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágeno durante 1 y 7 días. La barra de escala representa 10 μm .

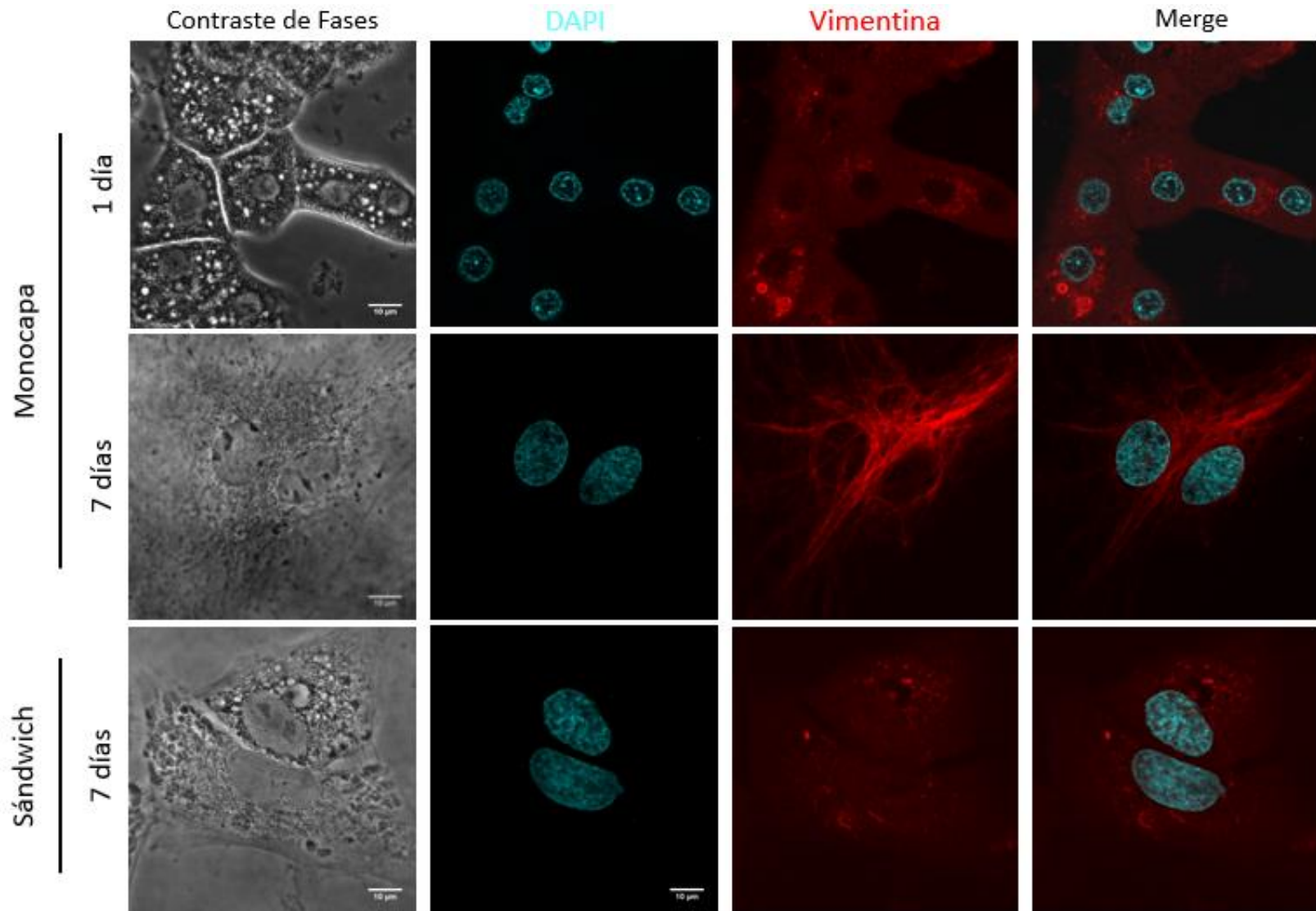


Figura 14. El cultivo en sándwich de ColI previene la asociación de la proteína vimentina al citoesqueleto. Inmunofluorescencia para detectar Vimentina en hepatocitos de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena durante 1 y 7 días. La barra de escala representa 10 μ m.

Debido a que los hepatocitos atraviesan por un proceso de transdiferenciación, en el cual el fenotipo resultante es de tipo fibroblasto se evaluó la expresión del marcador α -SMA (*Alpha-Smooth Muscle Actin*), esta proteína es comúnmente utilizada para identificar a fibroblastos activos y a células que han atravesado por la EMT (Zeisberg & Neilson, 2009). En la Figura 15 se observa como los hepatocitos cultivados en monocapa de ColI pasan de tener α -SMA distribuida por el citoplasma a formar parte de las fibras a los 7 días de cultivo, al contrario de los hepatocitos que son cultivados en sándwich de ColI en donde se previene la formación de dichas fibras. La proteína α -SMA se encuentra por lo general en células musculares; sin embargo, se ha demostrado que su expresión se correlaciona con la activación de los miofibroblastos después de un estímulo que dañe el tejido, estas células después son capaces de reparar el tejido y una vez realizada esta tarea mueren mediante apoptosis, pero si este mecanismo falla, los miofibroblastos continúan produciendo proteínas de matriz extracelular, y así dan lugar al desarrollo de fibrosis (Cherng, Young, & Ma, 2008). Se sabe por estudios previos que durante la fibrosis hepática aumentan el número de miofibroblastos positivos para la expresión de α -SMA en el hígado, y que contribuyen al desarrollo de la enfermedad; sin embargo, Zeisberg y colaboradores utilizan un segundo marcador para distinguir a los miofibroblastos que contribuyen con la fibrosis, la proteína FSP1 (*fibroblas-specific protein 1*), y demuestran con esto que tras la estimulación con TGF- β , el 45% de las células que son positivas para ambos marcadores: α -SMA y FSP1 derivan de hepatocitos mediante un proceso de EMT (Zeisberg et al., 2007).

En resumen, estos resultados nos ayudaron a determinar que los hepatocitos cultivados en monocapa de colágena pierden gradualmente la expresión de los marcadores albúmina y HNF4- α , desde los 3 días de cultivo y después de una semana adquieren la expresión de proteínas características de células mesenquimales, aumentando la expresión de vimentina y de α -SMA. Cuando la modalidad del cultivo se cambia a la de sándwich de ColI, se retrasa la pérdida de los marcadores de fenotipo epitelial, manteniéndolos hasta los 7 días de cultivo; sin embargo, no se evita la adquisición de marcadores mesenquimales.

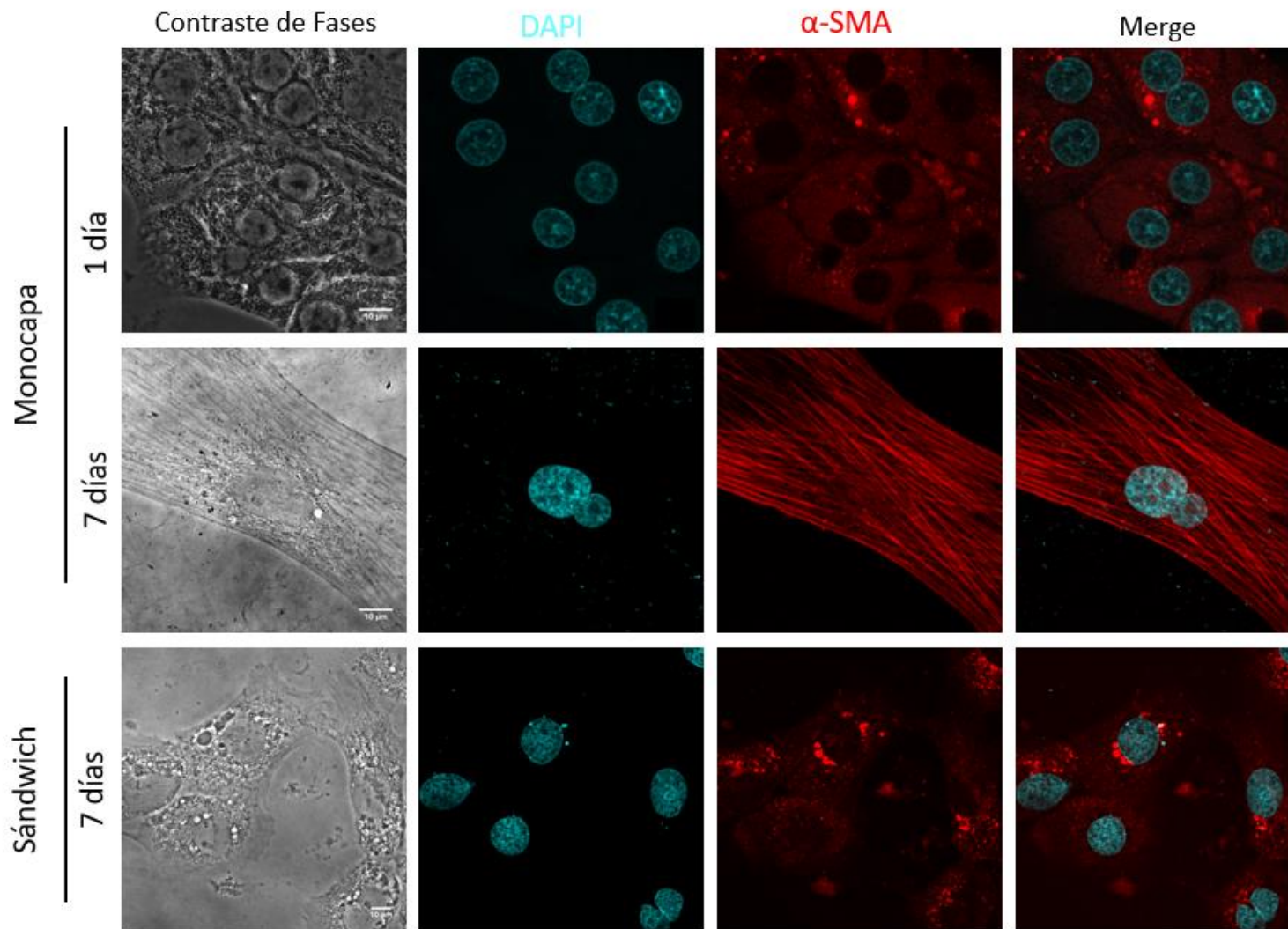


Figura 15. El cultivo en sándwich evita la formación de filamentos de α -SMA. Inmunofluorescencia para detectar α -SMA en hepatocitos de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena durante 1 y 7 días. La barra de escala representa 10 μ m.

La vía del TGF- β se activa de manera gradual en los hepatocitos en cultivo primario

Como mencionó anteriormente, se sabe que la citocina TGF- β es un potente inductor de la EMT, por lo que nos propusimos a evaluar el estado de activación basal de la vía del TGF- β a través de la medición de los niveles de fosforilación de la proteína efectora Smad2, en hepatocitos primarios cultivados en ambas modalidades: monocapa y sándwich de ColI. En la Figura 16 se muestra un curso temporal de 7 días de hepatocitos cultivados en monocapa de colágena, en la que los hepatocitos recién aislados (HF:hepatocitos frescos), es decir que no fueron sembrados, sino que después de concluir con el proceso de aislamiento y los lavados pertinentes para su cultivo se lisaron para obtener un extracto de proteínas totales, presentan altos niveles de Smad2 fosforilada, mientras que en los hepatocitos, después de un día de cultivo, la fosforilación de Smad2 disminuye a los niveles más bajos observados durante el desarrollo del curso temporal; posteriormente, los hepatocitos cultivados en monocapa de ColI muestran un aumento gradual en los niveles basales de Smad2 fosforilada durante los siguientes días de cultivo. Por otro lado, los niveles totales de Smad2 también aumentan gradualmente en los primeros 2 días de cultivo, y se mantienen elevados, en comparación con los hepatocitos frescos.

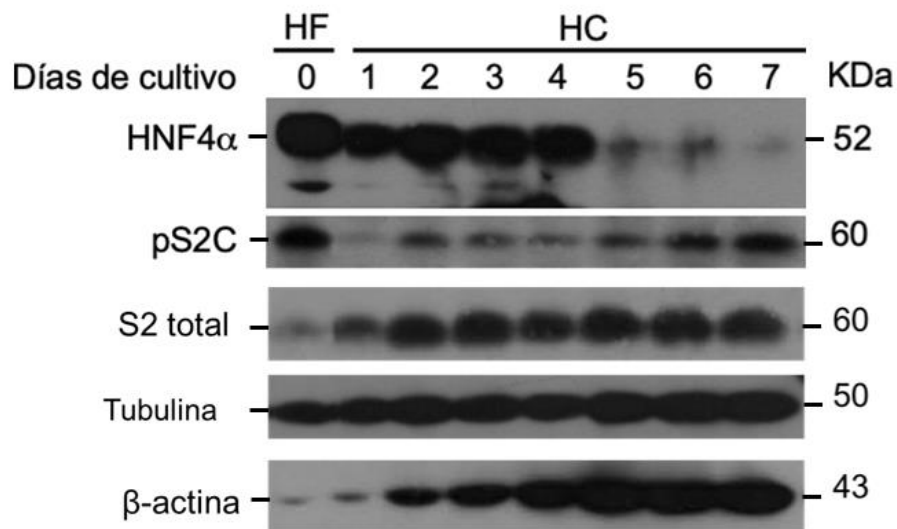


Figura 16. Los niveles de Smad2 aumentan gradualmente en hepatocitos cultivados en monocapa de colágena mientras su fosforilación baja en el primer día de cultivo y luego aumenta gradualmente. HF: hepatocitos frescos, HC: hepatocitos en cultivo.

Los cambios observados en los niveles de la proteína Smad2 fosforilada entre los hepatocitos frescos y los de un día de cultivo nos llevaron a pensar que quizás el método de aislamiento es un estímulo suficiente para activar a la vía, y que la adhesión de las células podría inhibir la vía. Por lo tanto, para evaluar si los hepatocitos recién cultivados de 1 día eran responsivos, se les realizó un tratamiento durante 5 y 30 min con 0.3 nM de TGF- β 1, con el fin de evaluar si los componentes de la vía permanecen funcionales después del aislamiento con colagenasa y del cultivo en monocapa de ColII, de igual forma se utilizó un tratamiento durante 30 min con medio de adhesión (MA) que contiene 10% FBS. En la Figura 17A observamos elevados niveles de fosforilación basal de la proteína efectora Smad2 sin estimulación exógena alguna en hepatocitos frescos, lo que sugiere que el proceso de aislamiento puede ser un estímulo para activar la vía. Se sabe que la citocina TGF- β forma un complejo con el péptido asociado de latencia (LAP) a través de una unión no covalente, y bajo circunstancias específicas este complejo puede interactuar con la proteína de unión al TGF- β (LTBP) que participa en la secreción y almacenamiento de la citocina en la matriz extracelular (Prieto et al., 2002), por esto, cuando se digiere la matriz extracelular del hígado con colagenasa durante el proceso de aislamiento de los hepatocitos, es muy probable que el TGF- β latente almacenado en la matriz extracelular se active y en consecuencia sea capaz de interactuar con los receptores presentes en los hepatocitos y activar la vía. Después de 1 día de cultivo en monocapa de colágena, los hepatocitos presentan bajos niveles de la Smad2 fosforilada, estos niveles aumentan tras el estímulo con TGF- β ; cuando los hepatocitos de 1 día de cultivo en monocapa de colágena son estimulados con MA, los niveles de fosforilación de Smad2 suben ligeramente al compararlos con el control. Si bien la fosforilación de Smad2 indica la activación de la vía del TGF- β , es necesario que esta proteína efectora sea translocada al núcleo para regular la expresión de los genes blanco de la vía, por esto mismo realizamos una inmunofluorescencia en hepatocitos de 1 día de cultivo en monocapa de colágena después de la estimulación durante 30 min con TGF- β exógeno. En la figura 17B se muestra como la proteína efectora Smad2 se localiza en el núcleo de la célula después de la estimulación con TGF- β usando el anticuerpo para Smad2/3 (SC-6032). Esto nos indica que los componentes río debajo de la vía se encuentran funcionales aún después del aislamiento y durante el primer día de cultivo, así como también nos indican que en los hepatocitos son funcionales los componentes principales de la vía del TGF- β .

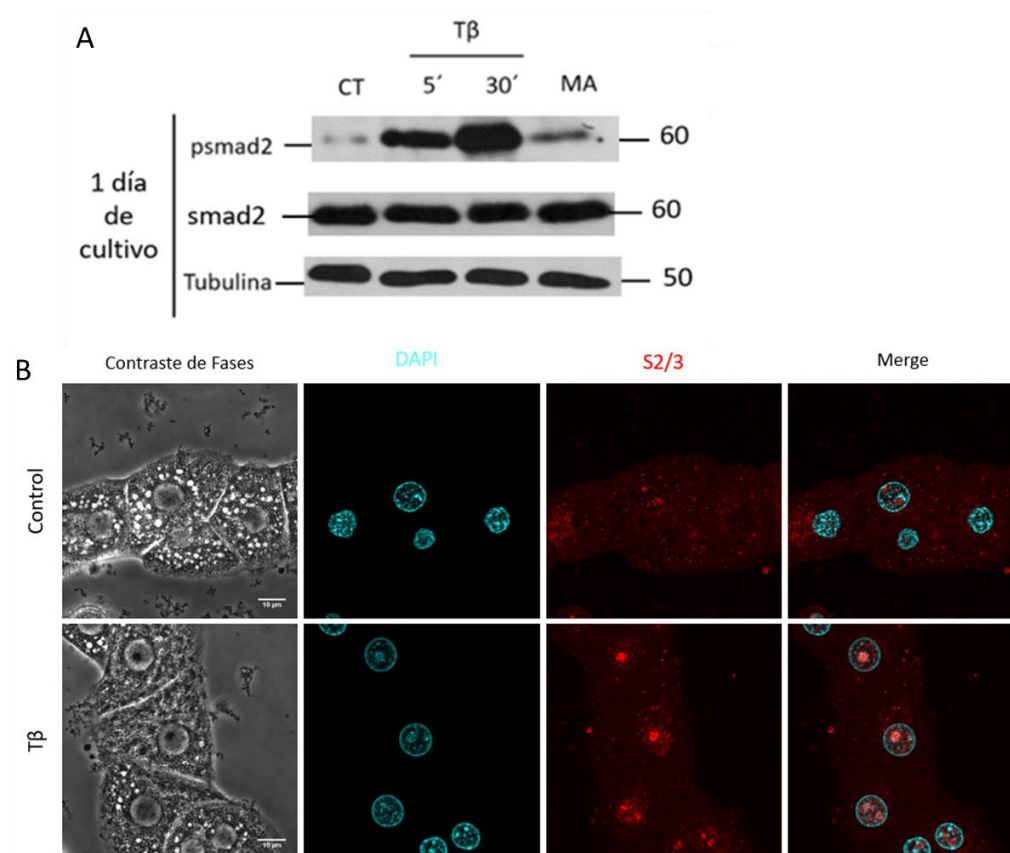


Figura 17. La vía del TGF-β permanece funcional en los hepatocitos tras el aislamiento y el cultivo. A) WB de hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa de colágena durante 1 día. Tratamiento con TGF-β durante 5 y 30 minutos [3nM]. CT: control, MA: estímulo con medio de adhesión durante 30 minutos. B) Inmunofluorescencia para detectar Smad2/3 en hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa de colágena durante 1 día. Tratamiento con TGF-β durante 30 minutos [3nM]. La barra de escala representa 10 μm.

Para que una célula atraviese por un proceso de transdiferenciación debe recibir diferentes estímulos que modifiquen la expresión de su fenotipo, se sabe que el TGF-β es un poderoso inductor de la EMT, pues promueve la transcripción de genes como Snail1/2, ZEB1/2 y Twist1/2 (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014; Moustakas & Heldin, 2016), por lo que nos cuestionamos ¿cuál sería el estado de activación basal de la vía durante el cambio de fenotipo observado en los hepatocitos primarios?, y ¿si el cultivo en sándwich de colágena (debido a la retención de los marcadores epiteliales) tendría algún efecto en la activación de la vía?. Para esto consideramos como principal parámetro los niveles de Smad2 fosforilada. En la figura 18 se observa que en los hepatocitos cultivados en monocapa de colágena, los niveles de Smad2 fosforilada aumentan, probablemente como resultado del método de aislamiento, y disminuyen inicialmente cuando los hepatocitos son cultivados, como se

observó anteriormente en la Figura 16; sin embargo, en el quinto día de cultivo los niveles de Smad2 fosforilada aumentan. Por otro lado, al evaluar los niveles de Smad2 total, observamos que, en ambas condiciones de cultivo, los niveles aumentan gradualmente. Podemos observar una tendencia en la que los niveles de Smad2 fosforilada aumentan en mayor medida en los hepatocitos cultivados en monocapa de ColI que en los que fueron cultivados con el método del sándwich de ColI. Estos resultados nos indican que cuando los hepatocitos son cultivados en monocapa de ColI se presenta una activación gradual de la vía del TGF- β , lo que coincide con el cambio de fenotipo epitelial a mesenquimal, mientras que cuando se emplea el método del sándwich de ColI se aminora la activación de la vía y el cambio fenotípico.

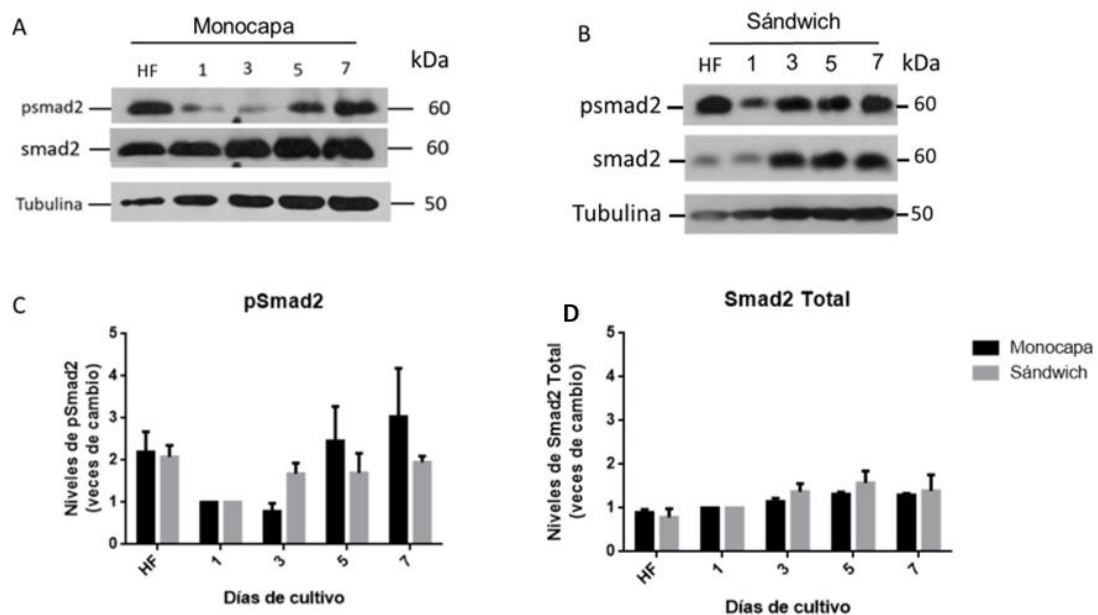


Figura 18. **Los niveles de fosforilación de Smad2 aumentan con los días de cultivo tanto en hepatocitos cultivados en monocapa como en sándwich.** A) y B) Western Blot de hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa o sándwich de colágena. Los niveles de Smad2 total fueron medidos después de realizar un stripping de 25 minutos a 55 °C. C) y D) Análisis por densitometría del inmunoblot para la proteína Smad2 total y fosforilada (pSmad2). Los datos muestran el promedio \pm EEM normalizado al valor obtenido en 1 día de cultivo de 3 experimentos independientes.

Por otro lado, en la figura 19 se muestra la inducción de la expresión del correpressor transcripcional SnoN en los hepatocitos cultivados en monocapa de ColI, desde el tercer día de cultivo, así como un aumento en su interacción con el complejo Smad2/3. Al ser SnoN un

gen blanco del TGF- β , coincide el aumento en los niveles de proteína de SnoN con el aumento en los niveles de Smad2 fosforilada. Se sabe que SnoN es capaz de interactuar con su propio promotor, y así a tiempos cortos de estimulación (45 min) reprimir su transcripción; sin embargo, cuando la estimulación con TGF- β es mayor a 2 h, se induce su expresión (Tecalco-Cruz et al., 2012), este antecedente del laboratorio nos sugiere que los hepatocitos cultivados en monocapa de ColII podrían tener una estimulación autocrina de TGF- β durante el cultivo. Estos datos resultan interesantes pues se ha reportado que SnoN se incrementa cuando las células pierden su polaridad y esto, a su vez, aumenta la estabilidad de TAZ, un cofactor transcripcional que participa en la vía de Hippo (Zhu et al., 2016). La ruta Hippo es conocida por regular el crecimiento de los órganos y algunos de sus componentes son capaces de interactuar con las proteínas Smad (Ben Mimoun & Mauviel, 2018). De igual forma, los cambios observados en los niveles de SnoN pueden darle un papel dual al TGF- β , donde pasa de inducir la apoptosis de células epiteliales a inducir la EMT; Walldén y colaboradores demostraron en 2017 que SnoN aumenta la estabilidad del complejo Smad3/4 activo (Walldén, Nyman, & Hällberg, 2017), aunque se sabe que cuando el complejo Smad2/3 interactúa con SnoN, éste último es marcado por ubiquitinación para su posterior degradación vía el proteosoma (Tecalco-Cruz, Ríos-López, Vázquez-Victorio, Rosales-Alvarez, & Macías-Silva, 2018).

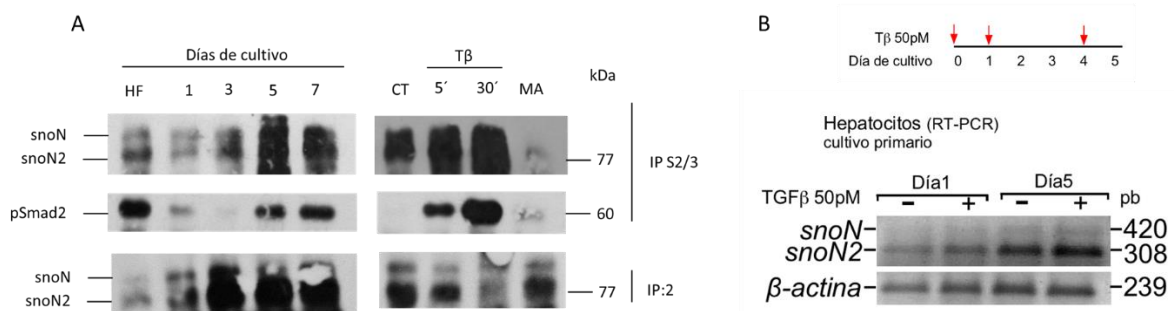


Figura 19. Los niveles de RNA mensajero y proteína de SnoN aumentan con los días de cultivo, así como su interacción con pSmad2 en hepatocitos primarios cultivados en monocapa de colágena. A) Interacción de las proteínas pSmad2 y SnoN en hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa de colágena durante 7 días. IP:2 Inmunoprecipitación de la proteína SnoN en el sobrenadante resultado de la IP de Smad2/3. B) Aumento en los niveles del RNA mensajero de SnoN medido por RT-PCR de hepatocitos primarios de rata de 1 y 5 días cultivados en monocapa de colágena estimulados con TGF- β [50pM] durante 24h.

Para determinar si la vía del TGF- β controla el cambio fenotípico que observamos en los hepatocitos primarios se utilizó el inhibidor SB431542, el cual compete con el ATP en el dominio de cinasa del receptor T β RI, impidiendo la fosforilación de Smad2 y Smad3 (Inman

et al., 2002). Como se observa en la Figura 20, el uso del inhibidor a una concentración de 1 μ M durante los 7 días de cultivo no es suficiente para impedir el cambio fenotípico que presentan los hepatocitos en cultivo, hacia un fenotipo tipo fibroblasto. Esto puede explicarse debido a que el inhibidor SB431542 presenta una alta afinidad para el receptor T β RI, lo que afecta la vía canónica, pero no parece tener ningún efecto en los componentes no canónicos como ERK, JNK y MAPK (Inman et al., 2002). Se sabe que las vías no canónicas del TGF- β controlan en gran medida la EMT en las células, y estas vías son activadas cuando las uniones celulares se ven afectadas (Zhang, 2009). Además de que existen otras vías involucradas en el proceso de EMT tanto en hepatocitos como en otros tipos celulares como la vía de Wnt, Notch, Hippo y Hedgehog (Chen, Shao, & Li, 2015)(Xue, 2013)(Kalluri & Weinberg, 2009). Estos resultados nos indican que, si bien el TGF- β es un poderoso inductor de la EMT, para el caso particular de los hepatocitos primarios, la transdiferenciación que se observa a lo largo de 1 semana de cultivo parece ser independiente a la activación de la vía canónica del TGF- β .

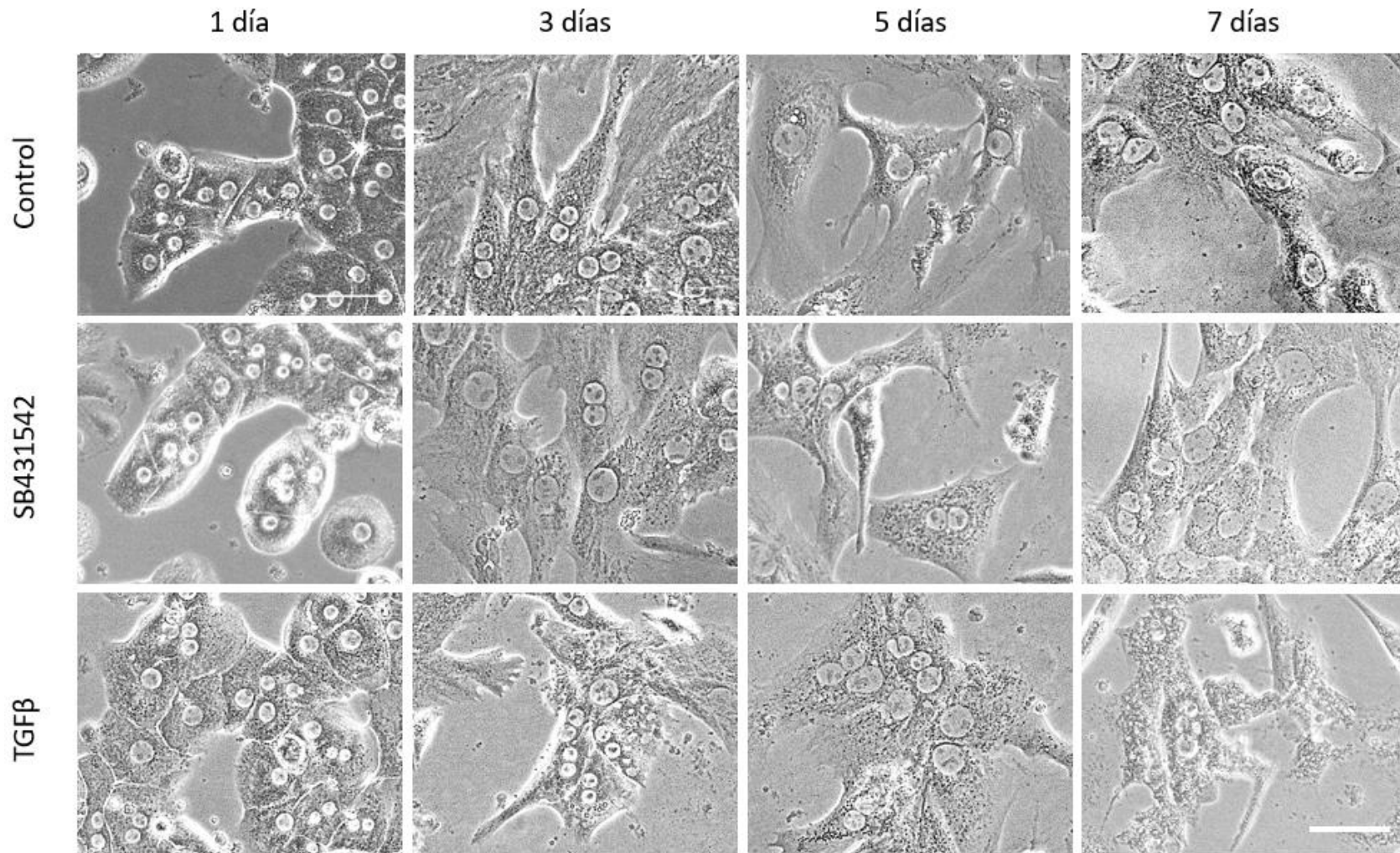


Figura 20. La transdiferenciación en hepatocitos primarios no se afecta con el inhibidor de la vía canónica del TGF- β . Los hepatocitos primarios de rata fueron cultivados en monocapa de colágena durante 7 días con el estímulo de SB431542 (inhibidor del receptor tipo I de la vía del TGF- β) o TGF- β [100pM]. La barra indica 50 μ m.

Discusión

En este trabajo se evaluó el cambio de fenotipo que presentan los hepatocitos primarios cultivados en dos modalidades: monocapa y sándwich de colágena tipo I (ColI). Cuando los hepatocitos son cultivados en monocapa de ColI pierden gradualmente la expresión de sus marcadores epiteliales como la albúmina y al HNF4 α , y a la par, adquieren características mesenquimales, como un aumento en la expresión de vimentina y el rearrreglo de su citoesqueleto de actina. En contraste, en la modalidad de cultivo en sándwich de ColI se observó que los hepatocitos mantienen la expresión de los marcadores epiteliales por más tiempo, aunque es mas lenta la adquisición del marcador vimentina, por lo que, al cultivar a los hepatocitos en sándwich de ColI podemos decir que se retrasa la transdiferenciación parcial por la que atraviesan los hepatocitos. Esto nos resulta interesante, pues la síntesis de albúmina nos indica el estado de funcionalidad que tienen los hepatocitos en cultivo, lo que indica que los hepatocitos dejan de ser funcionales tan pronto como 3 días de cultivo en monocapa de ColI, mientras que en sándwich de ColI, se mantienen funcionales al menos durante 7 días de cultivo, lo que coincide con estudios previos (Wang, Liu, Guo, Wen, & Liu, 2004) (Godoy et al., 2009b), aún cuando adquieren ciertas características mesenquimales.

Resulta interesante notar que en el día 4 de cultivo de los hepatocitos en monocapa de ColI (Figura 16), los niveles de HNF4 α desaparecen casi por completo. Cabe resaltar que esta proteína es un factor nuclear que controla la expresión de diversos genes esenciales para la diferenciación y funcionamiento de los hepatocitos, y para conservar la arquitectura del hígado en general; por ejemplo, se ha demostrado que HNF4 α es el encargado de regular la formación de las uniones celulares para formar un epitelio durante el desarrollo del fetal del hígado, al controlar la expresión de genes como E-cadherina y conexina 32, entre otras proteínas esenciales para la formación de desmosomas, uniones estrechas y uniones adherentes (Sladek et al., 2006).

Es importante mencionar que durante el proceso de aislamiento de los hepatocitos se pierden todas las uniones celulares que poseen *in vivo*; sin embargo, moléculas como la E-cadherina, se pueden observar nuevamente localizadas en la membrana de hepatocitos de un día de cultivo, lo que indica una recuperación de las uniones celulares en el cultivo (Godoy et al.,

2009a), aunque después esta molécula se va perdiendo conforme pasa el tiempo, lo que es una característica importante de la EMT. Así mismo, la expresión ectópica de HNF4 α en fibroblastos es capaz de inducir la transición mesénquima-epitelio (MET) y es indispensable para la organización del endotelio sinusoidal en el hígado (Parviz et al., 2003), reforzando la idea de que HNF4 α es el guardián del genoma de los hepatocitos. De hecho, se ha demostrado un papel “anti-mesénquimal” para HNF4 α , en el cual existe una regulación inversa entre HNF4 α y Snail directamente relacionada con el grado de desdiferenciación de los hepatocitos, en donde, la expresión de HNF4 α mantiene el fenotipo epitelial de los hepatocitos mientras que Snail induce un fenotipo desdiferenciado mediante el desarrollo de la EMT; sin embargo, esta regulación es susceptible a estímulos del microambiente, pues el TGF- β previene que HNF4 pueda llevar a cabo sus funciones, promoviendo así la expresión de Snail y la EMT (Cicchini et al., 2015). Como se mencionó anteriormente, el factor de transcripción *Snail*, es responsable de inducir la EMT en gran parte de los diferentes tipos celulares, y los hepatocitos no son la excepción, e interesantemente, *Snail* es un gen blanco del TGF- β , y es necesario para el desarrollo de la EMT. En hepatocitos se ha demostrado que la inducción de la expresión de *Snail* les brinda resistencia a la apoptosis al activar el programa transcripcional de la EMT (Franco et al., 2010). Dicho esto, al mantener la expresión y ubicación nuclear de HNF4 α (Figura 13) en el cultivo en sándwich de ColI, podemos suponer que se conserva la regulación que este ejerce sobre los genes codificantes para las proteínas involucradas en las uniones celulares, y previene la expresión de Snail y con esto evita la EMT, ayudando así a mantener la funcionalidad de los hepatocitos por más tiempo.

La EMT que ocurre en los hepatocitos en cultivo primario es resultado de la acción en conjunto de diferentes vías de señalización, a través de una intercomunicación entre ellas. Además del TGF- β , resulta de particular importancia la vía de Wnt, responsable de la zonación metabólica de los hepatocitos *in vivo* (Gebhardt & Hovhannisyán, 2010). Un componente importante de la vía de Wnt es la cinasa GSK3 β , encargada de fosforilar a β -catenina, principal efector de la vía de Wnt, marcándola para su degradación; recientemente, se ha determinado que GSK3 es blanco de TGF- β . Así, cuando hay TGF- β en el medio, GSK3 es inactivada, esto ocasiona modificaciones postraduccionales en HNF4 α que le impiden unirse al DNA (Cozzolino et al., 2013), ayudando así a la inducción de Snail y al posterior desarrollo de la EMT. El método de cultivo en sándwich de ColI ha demostrado ser

útil para evitar el cambio de fenotipo en hepatocitos, pues mantiene la localización de HNF4- α dentro del núcleo, promueve la formación de canalículos biliares (Fu et al., 2010), y mantiene el fenotipo y funciones de interés clínico de los hepatocitos, como el metabolismo de xenobióticos (Oorts et al., 2018).

Otra vía relevante para este trabajo es la ruta Hippo, que promueve el crecimiento de los órganos e inhibe la apoptosis mediante los coactivadores transcripcionales YAP y TAZ (Meng, Moroishi, & Guan, 2016). En el hígado, la ruta Hippo controla la diferenciación y proliferación de los diferentes linajes hepáticos, nuevamente a través de un *crosstalk* con la vía del TGF- β ; YAP es capaz de reprimir la transcripción de HNF4 α , lo que impide la diferenciación de los hepatocitos. Además la activación de YAP/TAZ estimula a la vía del TGF- β , creando así un efecto sinérgico que promueve la proliferación de células epiteliales biliares inmaduras e induce la fibrosis en el hígado de ratones adultos (Lee et al., 2016). Esto nos da una idea de porqué los hepatocitos cambian su morfología, aún en la presencia del inhibidor SB431542, es decir, sin los efectos del TGF- β (Figura 20).

La estimulación con TGF- β ha mostrado un efecto diferencial que depende de si los hepatocitos se encuentran cultivados en monocapa o en sándwich de ColI; por un lado, al encontrarse en monocapa los hepatocitos responden al estímulo mediante el cambio de fenotipo, mientras que al estar entre dos capas de ColI recuperan la capacidad de organizarse en una monocapa epitelial, así como de entrar a apoptosis ante la presencia del TGF- β (Godoy et al., 2009b). Existen pocos reportes que mencionan a los mismos hepatocitos en cultivo como fuente de TGF- β bajo ciertas condiciones (Gressner, Lahme, Mannherz, & Polzar, 1997), y esto puede explicar por qué se observa una fosforilación gradual de Smad2 en los hepatocitos. Estudios en otros tejidos epiteliales, como en las células de mama (Boldbaatar et al., 2017) y en el tejido corneal (Saika et al., 2004), muestran que la EMT depende en mayor medida de la proteína Smad3, de manera tal que en ratones KO de Smad3 la EMT tipo II se inhibe totalmente después de una lesión, y la señalización por Smad4 participa en la apoptosis inducida por TGF- β , mientras que en la expresión de Smad2 no tiene efectos (Kretschmer et al., 2003). Si bien en este trabajo no se obtuvieron resultados para los niveles de proteína de Smad4, por los resultados obtenidos para pSmad2 con el anticuerpo #3101 de la compañía Cell Signaling Technology® podría indicarnos indirectamente los niveles de Smad3, pues en su ficha técnica mencionan que es posible que

dicho anticuerpo detecte a Smad3 fosforilada en su sitio equivalente; sin embargo, son necesarios más estudios para determinar si la transdiferenciación observada en los hepatocitos primarios es principalmente consecuencia de la señalización por Smad2 o bien, por Smad3 como mencionan Krestchmer y colaboradores.

Para que el TGF- β lleve a cabo sus funciones es necesario que los componentes de la vía canónica, es decir las Smads, ingresen al núcleo para promover la transcripción de sus genes blanco, estas proteínas pueden interactuar con otros factores tanto en el citoplasma como en el núcleo, un ejemplo de estos cofactores es el co-regulador SnoN, del cual dependen las diversas respuestas que se han observado para la citocina TGF- β , como por ejemplo la preservación de la pluripotencialidad, la senescencia, el desarrollo de fibrosis o cáncer, entre otras (Tecalco-Cruz et al., 2018). SnoN es un importante modulador en la respuesta transcripcional inducida por el TGF- β y en la proliferación celular, ya que al interactuar con las Smads impide el arresto celular producido por el TGF- β , esto en células epiteliales de pulmón, esto nos indica que es importante tener en cuenta que el efecto de un aumento en los niveles de SnoN dependerá del contexto celular (Sarker et al., 2005). Nuestros resultados muestran una inducción en los niveles de la proteína de SnoN conforme pasan los días en los hepatocitos cultivados en monocapa de ColIa, así como un aumento en los niveles de su RNA mensajero, que coincide con la activación gradual de la vía, como se muestra en la Figura 19.

Estudios anteriores han relacionado los altos niveles de SnoN con sus efectos pro-oncogénicos, ya que al interactuar con las Smads se promueve la proliferación celular, y esto se puede observar en diversas líneas celulares provenientes de cáncer (Deheuninck & Luo, 2009). Nosotros observamos que en los hepatocitos cultivados en monocapa aumentan los niveles de la proteína SnoN y de su RNAm, y además aumenta la interacción de SnoN y las Smad2/3 conforme los hepatocitos cambian de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal; lo contrario a lo reportado para las células del túbulo proximal de riñón, donde el silenciamiento de SnoN mediante el uso de un siRNA promueve la EMT (Liu et al., 2013), nuevamente resaltando la importancia del contexto celular en las funciones de SnoN, ya que tanto hepatocitos como las células del túbulo proximal de riñón poseen un fenotipo epitelial.

Este resultado también resultó interesante, pues en el laboratorio se ha reportado que en la línea celular HepG2 los niveles de SnoN normalmente bajan tras la estimulación con TGF- β

por tiempos cortos, mientras que por un periodo más prolongado de 3 h, SnoN aumenta para cumplir como un regulador negativo de la vía del TGF- β (Caligaris et al., 2015). Nuestros hepatocitos cultivados en monocapa de ColI observamos niveles de SnoN altos por un tiempo prolongado, lo que resulta interesante pues altos niveles de SnoN se encuentran en varias líneas celulares humanas derivadas de tumores (Luo, 2004) a pesar de que nuestros hepatocitos representan un contexto celular normal, por lo que pensamos que SnoN podría tener funciones adicionales a las ya conocidas como regulador negativo de la vía. En este trabajo observamos que los niveles de SnoN aumentan y la vía de señalización se activa de manera gradual, sin estimulación exógena alguna, a la par del cambio de marcadores de fenotipo.

Hasta la fecha se conocen tres ligasas de ubiquitina que interactúan con SnoN para que este se degrade vía el proteosoma: APC, Smuf2 y Arkadia, todas estas requieren de la previa interacción de SnoN con Smad2 para que la degradación suceda (Tecalco-Cruz et al., 2018); sin embargo, en los hepatocitos cultivados en monocapa de colágena, a pesar de que la interacción entre Smad2 y SnoN aumenta, no observamos la degradación de este complejo. Esto nos sugiere que podría haber otro mecanismo implicado en la estabilidad de SnoN, al menos en el contexto hepático. Esto nos lleva a otra característica importante de las células que cambian su fenotipo epitelial por uno mesenquimal: el rearrreglo de su citoesqueleto. En los hepatocitos cultivados en monocapa de ColI pudimos observar el incremento en los niveles de vimentina y actina, así como la formación de fibras de estrés que asocian a la proteína α -SMA; estos cambios se atenúan cuando los hepatocitos son cultivados con el método del sándwich de ColI. Cuando una célula cambia su fenotipo de epitelial a mesenquimal atraviesa por una serie de pasos, uno de ellos es el rearrreglo del citoesqueleto; en el caso particular de los hepatocitos Kimata y colaboradores demostraron una correlación negativa entre los niveles de mRNA de actina con los de albúmina y HNF4 α , por un lado, los niveles de mRNA de actina aumentan en hepatocitos cultivados en monocapa de ColI el tiempo que los de albúmina y HNF4 α disminuyen, por lo que llegaron a la conclusión de que la organización del citoesqueleto de actina mantiene el fenotipo diferenciado de los hepatocitos primarios en cultivo regulando la expresión de HNF4 α (Kimata et al., 2006). En el laboratorio se demostró que para las células hepáticas C9 la polimerización de actina incrementa la estabilidad de SnoN de manera independiente a las Smads (Caligaris et al., 2015), así que es posible que la dinámica del citoesqueleto en los hepatocitos primarios

cultivados en monocapa de ColI regule la estabilidad del complejo SnoN/Smad2/3 así como la interacción con Smad4, la cual controla la regulación negativa del gen de SnoN, *SKIL* (Tecalco-Cruz et al., 2012), y es por esto que a pesar de estar formando un complejo con Smad2/3 no observamos degradación de SnoN; sin embargo, es necesario investigar más a fondo para determinar si este es el mecanismo de regulación que ocurre en los hepatocitos primarios en cultivo, pues en otros contextos celulares, por ejemplo, en un modelo de diabetes se observa que al sobreexpresar SnoN en las células del túbulo proximal de riñón se reducen los niveles de α -SMA y aumentan los niveles de E-cadherina, evitando la EMT (Liu et al., 2013). De igual forma los resultados obtenidos en este trabajo nos hacen pensar que la interacción de SnoN con Smad2/3 podría aumentar la estabilidad del complejo, pues de acuerdo con el análisis bioquímico y biofísico realizado por Walldén y colaboradores, quedó demostrado que cuando SnoN interactúa con el complejo Smad3/4 este incrementa su estabilidad (Walldén et al., 2017); sin embargo, nosotros no pudimos observar a la proteína Smad4 por problemas con el anticuerpo comercial disponible. De igual forma queda la posibilidad de que SnoN este interactuando con otra proteína que no sea de la familia de las Smads, aunque para esto sería necesarios más experimentos para demostrarlo.

Conclusiones

Los hepatocitos primarios de rata cultivados en monocapa de colágena pierden paulatinamente su fenotipo epitelial y adquieren características mesenquimales en un proceso conocido como transdiferenciación parcial; además la vía del TGF- β se activa de manera gradual, observando un aumento en la fosforilación de Smad2, lo que entonces lleva a la interacción del correpresor transcripcional SnoN con el complejo Smad2/3, posiblemente participando en el cambio de fenotipo. De igual forma, esta activación de la vía probablemente inhibe la expresión del receptor nuclear HNF4- α , lo que ayuda a la pérdida del fenotipo epitelial de los hepatocitos; finalmente, podemos decir que con el método de cultivo en sándwich de ColI es posible frenar parcialmente la transdiferenciación de los hepatocitos pero no así la activación gradual de la vía del TGF- β .

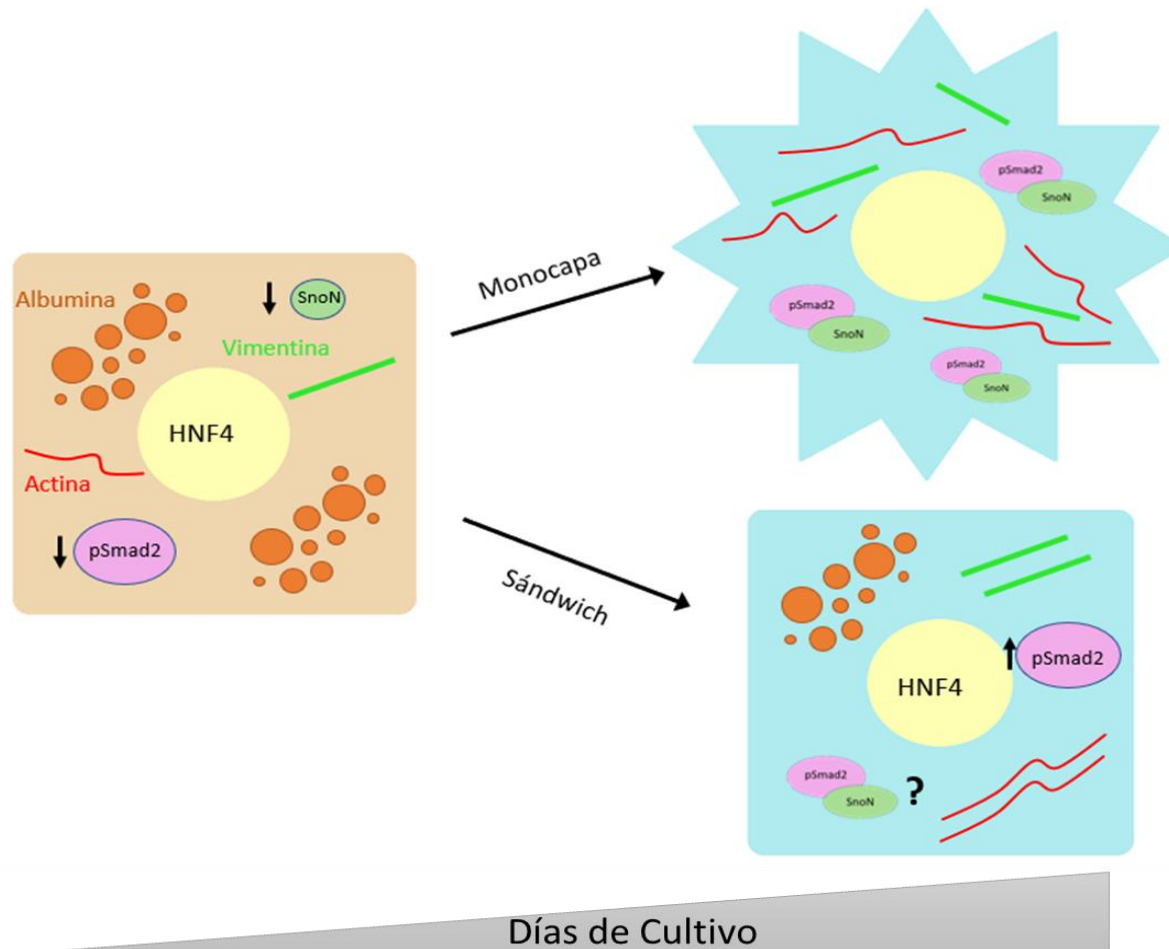


Figura 21. La transdiferenciación de los hepatocitos primarios de rata se retrasa con el cultivo en sándwich. Los hepatocitos cultivados en monocapa de colágena aumentan los niveles de fosforilación de Smad2, a su vez incrementando su interacción con SnoN. Por otro lado, cuando los hepatocitos se cultivan en sándwich de colágena se previene la pérdida de marcadores epiteliales como albumina y HNF4 pero no evita la aparición de marcadores mesenquimales. Los niveles de fosforilación de Smad2 aumentan en menor medida con esta forma de cultivo.

Perspectivas

Diversos investigadores reportan el uso del cultivo en sándwich de ColI, como un método para preservar el fenotipo funcional de los hepatocitos por periodos de hasta 15 días o más. Por lo tanto, es de interés para la continuidad de este proyecto que se puedan replicar las condiciones de cultivo bajo las cuales los hepatocitos retrasan su entrada a la EMT y así analizar los componentes de la vía del TGF- β , principalmente la fosforilación de Smad2, pero también evaluar la expresión de algunos genes blanco de la vía, como por ejemplo Smad7, mediante otras técnicas como la de RT-PCR; así como evaluar alguno de los factores de transcripción reportados como responsables de la EMT, tales como Snail o Twist, y así poder asociar la activación de la vía con el transcurso de la EMT. Por otro lado, se ha reportado que la activación de la vía del TGF- β induce apoptosis en los hepatocitos; sin embargo, se desconoce si en un cultivo primario de hepatocitos todos los hepatocitos son capaces de llevar a cabo la EMT o si bien un porcentaje de la población activa una respuesta apoptótica, y también se desconoce el mecanismo mediante el cuál los hepatocitos se deciden por uno u otro camino.

También queda por determinar si al inhibir la vía canónica del TGF- β mediante el uso del SB431542, hay algún impacto en el desarrollo de la EMT, ya que durante este proyecto se utilizó solamente una concentración de 1 μ M de SB431542; sin embargo, vale la pena preguntarnos si una concentración mayor hubiera tenido un efecto más evidente en la morfología de los hepatocitos. De igual manera, el combinar dicho inhibidor con la técnica de cultivo en sándwich de ColI podría mantener el fenotipo y funcionalidad de las células, no solo por mayor tiempo, sino también de una manera técnicamente más sencilla, ya que existen numerosos protocolos para realizar el sándwich de ColI, pero no logramos totalmente replicar la preservación del fenotipo ya reportada.

Por último, se sabe que la EMT es un proceso en el cual participan diversas vías de señalización, por lo que podemos asumir que, por ejemplo, la vía de Wnt, también debería activarse de manera gradual, es por esto que es de nuestro interés analizar otras vías de señalización y averiguar si existe o no una intercomunicación importante para el desarrollo de la EMT en hepatocitos primarios.

Bibliografía

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1438–1449. <https://doi.org/10.1172/JCI38019>
- Artigas, A., Wernerman, J., Arroyo, V., Vincent, J. L., & Levy, M. (2016). Role of albumin in diseases associated with severe systemic inflammation: Pathophysiologic and clinical evidence in sepsis and in decompensated cirrhosis. *Journal of Critical Care*, *33*, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.12.019>
- Babeu, J., & Boudreau, F. (2014). Hepatocyte nuclear factor 4-alpha involvement in liver and intestinal inflammatory networks, *20*(1), 22–30. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i1.22>
- Baiocchi, A., Montaldo, C., Conigliaro, A., Grimaldi, A., Correani, V., Mura, F., ... Mancone, C. (2016). Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. *PLoS ONE*, *11*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151736>
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Ben Mimoun, S., & Mauviel, A. (2018). Molecular mechanisms underlying TGF- β /Hippo signaling crosstalks – Role of baso-apical epithelial cell polarity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *98*(January), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.006>
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D. S., Moinard, C., ... Colnot, S. (2006). Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Developmental Cell*, *10*(6), 759–770. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.015>
- Boldbaatar, A., Lee, S., Han, S., Jeong, A., Ka, H., Buyanravjikh, S., ... Yang, Y. (2017). Eupatolide inhibits the TGF- β 1-induced migration of breast cancer cells via downregulation of SMAD3 phosphorylation and transcriptional repression of ALK5. *Oncology Letters*, 6031–6039. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6957>
- Bordés González, R. P. T. de B. de la E. U. C. ., , Martínez Beltrán, M. P. A. de A. de la E. U. C. S., García Olivares, E. P. T. de I. de la F. de M., & Guisado Barrilao, R. C. de A. de la E. U. C. S. (2010). El Proceso Inflamatorio, 9–12. Retrieved from http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero_4/pinflamatorio4.htm[18/02/2010 11:54:21]
- Bruce, D. L., & Sapkota, G. P. (2012). Phosphatases in SMAD regulation. *FEBS Letters*, *586*(14), 1897–1905. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.001>
- Calderón, R. V. (2007). *Inmunoquímica*.
- Caligaris, C., Vázquez-Victorio, G., Sosa-Garrocho, M., Ríos-López, D. G., Marín-Hernández, A., & Macías-Silva, M. (2015). Actin-cytoskeleton polymerization

- differentially controls the stability of Ski and SnoN co-repressors in normal but not in transformed hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(9), 1832–1841. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.012>
- Chen, Z., Shao, Y., & Li, X. (2015). The roles of signaling pathways in epithelial-to-mesenchymal transition of PVR. *Molecular Vision*, 21(January), 706–710. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4478053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cherng, S., Young, J., & Ma, H. (2008). Alpha-Smooth Muscle Actin (a-SMA). *The Journal of American Science*, 4(4), 7–9. Retrieved from http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/0404/02_0405_mahongbao-sma_am.pdf
- Chinnici, C. M., Miceli, V., Pampalone, M., Lo Nigro, A., Amico, G., & Conaldi, P. G. (2017). In vitro evidences of epithelial to mesenchymal transition in low cell-density cultured human fetal hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(2), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.065>
- Cicchini, C., Amicone, L., Alonzi, T., Marchetti, A., Mancone, C., & Tripodi, M. (2015). Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte. *Liver International*, 35(2), 302–310. <https://doi.org/10.1111/liv.12577>
- Coulouarn, C., Factor, V. M., & Thorgeirsson, S. S. (2008). Transforming growth factor- β gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology*, 47(6), 2059–2067. <https://doi.org/10.1002/hep.22283>
- Cozzolino, A. M., Alonzi, T., Santangelo, L., Mancone, C., Conti, B., Steindler, C., ... Marchetti, A. (2013). TGF β overrides HNF4 a tumor suppressing activity through GSK3 β inactivation : implication for hepatocellular carcinoma gene therapy. *Journal of Hepatology*, 58(1), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.08.023>
- Deheuninck, J., & Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signaling, 19(1), 47–57. <https://doi.org/10.1080/10810730902873927>. Testing
- Eriksson, J. E., Pallari, H., Robert, D., Eriksson, J. E., Dechat, T., Grin, B., ... Goldman, R. D. (2009). Introducing intermediate filaments : from discovery to disease Find the latest version : Review series Introducing intermediate filaments : from discovery to disease, 119(7), 1763–1771. <https://doi.org/10.1172/JCI38339>. cells
- Franco, D. L., Mainez, J., Vega, S., Sancho, P., Murillo, M. M., de Frutos, C. A., ... Nieto, M. A. (2010). Snail1 suppresses TGF- β -induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *Journal of Cell Science*, 123(20), 3467–3477. <https://doi.org/10.1242/jcs.068692>
- Fu, D., Wakabayashi, Y., Ido, Y., Lippincott-Schwartz, J., & Arias, I. M. (2010). Regulation of bile canalicular network formation and maintenance by AMP-activated protein kinase and LKB1. *Journal of Cell Science*, 123(19), 3294–3302. <https://doi.org/10.1242/jcs.068098>
- Gebhardt, R., & Hovhannisyanyan, A. (2010). Organ patterning in the adult stage: The role of

- Wnt/b-catenin signaling in liver zonation and beyond. *Developmental Dynamics*, 239(1), 45–55. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22041>
- Giannelli, G., Mikulits, W., Dooley, S., Fabregat, I., Moustakas, A., ten Dijke, P., ... Sanchez, A. (2016). The rationale for targeting TGF- β in chronic liver diseases. *European Journal of Clinical Investigation*, 46(4), 349–361. <https://doi.org/10.1111/eci.12596>
- Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology*, 63(4), 1023–1037. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015>
- Godoy, P., Hengstler, J. G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Müller, A., ... Dooley, S. (2009a). Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor β -induced apoptosis. *Hepatology*, 49(6), 2031–2043. <https://doi.org/10.1002/hep.22880>
- Godoy, P., Hengstler, J. G., Ilkavets, I., Meyer, C., Bachmann, A., Müller, A., ... Dooley, S. (2009b). Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor β -induced apoptosis. *Hepatology*, 49(6), 2031–2043. <https://doi.org/10.1002/hep.22880>
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., ... Hengstler, J. G. (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 mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME*. *Archives of Toxicology* (Vol. 87). <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>
- Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1776–1784. <https://doi.org/10.1172/JCI200320530>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. a. (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*, 25(1), 76–84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>
- Kim, J., Hyun, J., Wang, S., Lee, C., & Jung, Y. (2018). MicroRNA-378 is involved in hedgehog- driven epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocytes of regenerating liver. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0762-z>
- Kimata, T., Nagaki, M., Ogiso, T., Naiki, T., Kato, T., & Moriwaki, H. (2006). Actin organization and hepatocyte differentiation are regulated by extracellular matrix via PI-4,5-bisphosphate in the rat. *Hepatology*, 44(1), 140–151. <https://doi.org/10.1002/hep.21215>
- Kretschmer, A., Moepert, K., Dames, S., Sternberger, M., Kaufmann, J., & Klippel, A. (2003). Differential regulation of TGF- β signaling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Oncogene*, 22(43), 6748–6763. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206791>

- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *National Review Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>.Molecular
- Lecluyse, E. L., & Alexandre, E. (2010). Isolation and Culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue, *640*, 57–81. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-688-7>
- Lee, D.-H., Park, J. O., Kim, T.-S., Kim, S.-K., Kim, T.-H., Kim, M.-C., ... Lim, D.-S. (2016). LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGF β signaling and Hnf4 α expression during liver development. *Nature Communications*, *7*(May), 11961. <https://doi.org/10.1038/ncomms11961>
- Li, Y., Turck, C. M., Teumer, J. K., & Stavnezer, E. (1986). Unique sequence, ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *Journal of Virology*, *57*(3), 1065–1072. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=252840&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B. K., & Lu, J. (2010). Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, *29*(35), 4896–4904. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.234>
- Liu, R., Wang, Y., Xiao, Y., Shi, M., Zhang, G., & Guo, B. (2013). SnoN as a key regulator of the high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in cells of the proximal tubule. *Kidney and Blood Pressure Research*, *35*(6), 517–528. <https://doi.org/10.1159/000339172>
- Lomonte, B. (2008). Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. In *Inmunología General: Manual de Laboratorio* (pp. 92–101).
- Luo, K. (2004). Ski and SnoN: Negative regulators of TGF- β signaling. *Current Opinion in Genetics and Development*, *14*(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2003.11.003>
- Macías-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A. S., & Taub, R. (2002). Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind smad proteins to antagonize transforming growth factor- β signals during liver regeneration. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 28483–28490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202403200>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, *133*(4), 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, *13*(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>.TGF
- Massague, J., & Lo, R. S. (2000). TGF- β Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. *Cell*, *103*, 295–309.
- Mehta, A., Comunale, M. A., Rawat, S., Casciano, J. C., Lamontagne, J., Herrera, H., ... Bouchard, M. J. (2016). Intrinsic hepatocyte dedifferentiation is accompanied by upregulation of mesenchymal markers, protein sialylation and core alpha 1,6 linked fucosylation. *Scientific Reports*, *6*(1), 27965. <https://doi.org/10.1038/srep27965>

- Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes and Development*, *30*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1101/gad.274027.115.1/2>
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2016). *Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition*. *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 5). <https://doi.org/10.3390/jcm5070063>
- Nieto, M. A., Huang, R. Y. Y. J., Jackson, R. A. A., & Thiery, J. P. P. (2016). Emt: 2016. *Cell*, *166*(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028>
- Novik, E., Maguire, T. J., Chao, P., Cheng, K. C., & Yarmush, M. L. (2010). A microfluidic hepatic coculture platform for cell-based drug metabolism studies. *Biochemical Pharmacology*, *79*(7), 1036–1044. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.11.010>
- Novikova, M. V., Khromova, N. V., & Kopnin, P. B. (2017). Components of the Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and Their Role in Tumor Progression., *82*(8). <https://doi.org/10.1134/S0006297917080016>
- Oorts, M., Keemink, J., Deferm, N., Adriaensen, R., Richert, L., Augustijns, P., & Annaert, P. (2018). Extra collagen overlay prolongs the differentiated phenotype in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *90*(September 2017), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.10.007>
- Pardali, E., Goumans, M.-J., & ten Dijke, P. (2010). Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*, *20*(9), 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.06.006>
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., ... Duncan, S. A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nature Genetics*, *34*(3), 292–296. <https://doi.org/10.1038/ng1175>
- Prieto, M., Rivas, J. V., & Pérez-barriocanal, J. M. L. N. F. (2002). El TGF- β : síntesis y mecanismo de acción, *XXII*, 135–143.
- Saika, S., Kono-Saika, S., Ohnishi, Y., Sato, M., Muragaki, Y., Ooshima, A., ... Roberts, A. B. (2004). Smad3 Signaling Is Required for Epithelial-Mesenchymal Transition of Lens Epithelium after Injury. *American Journal of Pathology*, *164*(2), 651–663. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63153-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63153-7)
- Santangelo, L., Marchetti, A., Cicchini, C., Conigliaro, A., Conti, B., Mancone, C., ... Tripodi, M. (2012). The Stable Repression of Mesenchymal Program Is Required for Hepatocyte Identity: A Novel Role for Hepatocyte Nuclear Factor 4a, 2063–2074. <https://doi.org/10.1002/hep.24280>
- Sarker, K. P., Wilson, S. M., & Bonni, S. (2005). SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor- β responses. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 13037–13046. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409367200>

- Schaub, J. R., Huppert, K. A., Kurial, S. N. T., Hsu, B. Y., Cast, A. E., Donnelly, B., ... Rosenthal, P. (2018). Mediated Hepatocyte Transdifferentiation. *Nature*.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0075-5>
- Shi, Y., Massague, J., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, *113*(6), 685–700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X)
- Shulman, M., & Nahmias, Y. (2013). Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes. *Epithelial Cell Culture Protocols*, *945*(3), 287–302.
<https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7>
- Sladek, F. M., Battle, M. A., Parviz, F., Gaggl, A. L., Konopka, G., Duncan, S. A., & Yang, C. (2006). Hepatocyte nuclear factor 4 orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial transformation of the developing liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(22), 8419–8424.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0600246103>
- Sosa-Garrocho, M., & Macías-Silva, M. (2004). El factor de crecimiento transformante beta (TGF-?): Funciones y vías de transducción. *Departamento de Biología Celular. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México*, *23*(1), 3–11.
- Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., & Luo, K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science (New York, N.Y.)*, *286*(5440), 771–774. <https://doi.org/7926> [pii]
- Tan, A. K. Y., Loh, K. M., & Ang, L. T. (2017). Evaluating the regenerative potential and functionality of human liver cells in mice. *Differentiation*, *98*, 25–34.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2017.09.003>
- Tecalco-Cruz, A. C., Ríos-López, D. G., Vázquez-Victorio, G., Rosales-Alvarez, R. E., & Macías-Silva, M. (2018). Transcriptional cofactors Ski and SnoN are major regulators of the TGF-β/Smad signaling pathway in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *3*(1), 15. <https://doi.org/10.1080/10495142.2017.1326336>
- Tecalco-Cruz, A. C., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Victorio, G., Ortiz-García, L., Domínguez-Hüttinger, E., & Macías-Silva, M. (2012). Transforming growth factor-β/SMAD target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(32), 26764–26776.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386599>
- Torre, C., Perret, C., & Colnot, S. (2010). Molecular determinants of liver zonation. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *97*(C), 127–150.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385233-5.00005-2>
- TUSCHL, G., & MUELLER, S. (2006). Effects of cell culture conditions on primary rat hepatocytes—Cell morphology and differential gene expression. *Toxicology*, *218*(2–3), 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.017>
- Usta, O. B., Mccarty, W. J., Bale, S., Hegde, M., Jindal, R., Bhushan, A., ... Yarmush, M. L. (2015). Microengineered cell and tissue systems for drug screening and toxicology applications : Evolution of in-vitro liver technologies. *Technology*, *3*(1), 1–26.

<https://doi.org/10.1142/S2339547815300012>

- Vera Gómez, E. (2013). *LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA 3 (TGF- β 3) DURANTE LA REPARACIÓN DE UNA HERIDA DE ESPESOR TOTAL EN LA OREJA DEL RATÓN*. Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza.
- Vincent, J. L. (2009). Relevance of albumin in modern critical care medicine. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 23(2), 183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2008.11.004>
- Vincent, T., Neve, E. P. A., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., ... Fuxe, J. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 11(8), 943–950.
<https://doi.org/10.1038/ncb1905>
- Walldén, K., Nyman, T., & Hällberg, B. M. (2017). SnoN Stabilizes the SMAD3/SMAD4 Protein Complex. *Scientific Reports*, 7(April), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46370>
- Wang, Y. J., Liu, H. L., Guo, H. T., Wen, H. W., & Liu, J. (2004). Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *World Journal of Gastroenterology*, 10(5), 699–702. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wrighton, K. H., Lin, X., & Feng, X. H. (2009). Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Research*, 19(1), 8–20. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.327>
- Xue, Z.-F. (2013). Hepatic regeneration and the epithelial to mesenchymal transition. *World Journal of Gastroenterology*, 19(9), 1380. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i9.1380>
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818–829.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009>
- Yue, H. Y., Yin, C., Hou, J. L., Zeng, X., Chen, Y. X., Zhong, W., ... Xie, W. F. (2010). Hepatocyte nuclear factor 4 α attenuates hepatic fibrosis in rats. *Gut*, 59(2), 236–246.
<https://doi.org/10.1136/gut.2008.174904>
- Zeigerer, A., Wuttke, A., Marsico, G., Seifert, S., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2017). Functional properties of hepatocytes in vitro are correlated with cell polarity maintenance. *Experimental Cell Research*, 350(1), 242–252.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.027>
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions Find the latest version : Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.*, 119(6), 1429–1437.
<https://doi.org/10.1172/JCI36183.protected>
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H., & Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23337–23347.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700194200>
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research*, 19(1), 128–

139. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>

Zhu, Q., Le Scolan, E., Jahchan, N., Ji, X., Xu, A., & Luo, K. (2016). SnoN Antagonizes the Hippo Kinase Complex to Promote TAZ Signaling during Breast Carcinogenesis. *Developmental Cell*, 37(5), 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.05.002>

ANEXO

Krebs Ringer (1L)

NaCl.....7.5g
KH₂PO₄ (10.55%).....1.63ml
MgSO₄ (19.1%).....1.63ml
KCl (5.75%).....6.51ml
NaHCO₃ (6%).....13-18ml

Para preparar el buffer Krebs Ringer con calcio agregar 800µl de CaCl₂ a 300ml del Krebs Ringer

Azul Tripano

0.04g de Azul tripano disolverlos en 10 ml de Krebs Ringer con calcio

TN (100ml al 10X)

Tris (1M).....50ml
NaCl (5M).....30ml
ddH₂O.....20ml

TNTE

TN (10X).....10ml
EDTA (0.5M).....0.2ml
Triton (10%).....5ml
ddH₂O.....85ml

RIPA

Complementar buffer TNTE con 0.1% de SDS y 0.5% de desoxicolato de sodio

PBS (1L)

NaCl.....8.06g
KCl.....0.22g
Na₂HPO₄.....1.15g
KH₂PO₄.....0.2g

PFA 4%

Paraformaldedído.....4g
PBS.....100ml

Percoll (Amersham)

TBS 10X

Tris base.....24.2g
NaCl.....80g

HCl.....14ml

Ajustar pH a 7.6

TBST

TBS 10X.....100ml

Tween 20.....1ml

ddH₂O.....899ml

Buffer de corrida 10X pH 8.3

Tris Base.....30.2g

Glicina.....144g

SDS 10%.....100ml

Se diluye a 1X antes de usarse, no es necesario ajustar el pH.

Buffer de transferencia 10X

Tris Base.....30.2g

Glicina.....144g

Diluir 800ml a 1X y agregar 200ml de metanol para completar 1L

Laemli

4% SDS

20% glycerol

10% 2-mercaptoethanol

0.004% bromphenol blue

0.125 M Tris HCl

Medio de adhesión

DMEM.....500ml

BSA.....100mg

Hepes (1M).....1.5ml

Piruvato de sodio (100mM).....5ml

NaH₂CO₃255mg

Galactosa.....500mg

Prolina.....15mg

Glutamina (200mM).....10ml

Gentamicina (50mg/ml).....0.5ml

Penicilina/Estreptomicina 100X....5ml

ITS (+).....5ml

Suero bovino fetal.....50ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

Medio de mantenimiento

Igual que el medio adhesión, pero sin suero bovino fetal

Tripsina 0.25%

HBSS.....50ml
Rojo fenol.....5mg
EDTA [0.5M].....1ml
Tripsina.....1.25g

Colágena tipo 1

Ácido acético (0.02M).....50ml
Colágena (3.48mg/ml).....20ml

Inhibidores de fosfatasa (cantidad calculada para 1ml de buffer)

NaF 1M.....25µl
NaPPi 100mM.....10µl
NaVO₄ 100mM.....10µl

Inhibidores de proteasas (cantidad calculada para 1ml de buffer)

PMSF.....5µl
Pepstatin A (5mg/ml).....2µl
Trypsin inhibitor (50mg/ml)...2µl
Leupeptin (5mg/ml).....2µl
Antipain (5mg/ml).....2µl
Benzamidine (50mg/ml).....2µl
Aprotinin (10mg/ml).....2µl
B-glicerofosfato..... 2µl

Medio Williams

Se utiliza el medio de SIGMA W-4125
Bicarbonato de sodio.....1.5g

Geles de acrilamida

	CONCENTRADOR	SEPARADOR
H ₂ O	11.9ml	21.7ml
TRIS [0.5M] PH 6.8	4.9ml	-
TRIS [1.5M] PH 8.8	-	11.25ml
ACRILAMIDA/BISACRILAMIDA (30%:0.8%)	2.2ml	11.25ml
SDS (10%)	200µl	450µl
APS (10%)	220µl	350µl
TEMED	15µl	25µl
AZUL DE BROMOFENOL	25µl	-

Anticuerpos

Smad2 total, Cell signaling Technology #5339S

pSmad2, Cell Signaling Technology #3101

Smad2/3, Santa Cruz Biotechnology INC SC-6032

SnoN, Santa Cruz Biotechnology INC SC-136958

Tubulina, Sigma T5293

Actina, Santa Cruz Biotechnology INC SC-47778

Vimentina, Sigma V6630

HNF4- α , Santa Cruz Biotechnology INC Sc-6556

Albumina, Santa Cruz Biotechnology INC SC-46293

α -SMA, Sigma A2547