



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES P2Y EN HEPATOCITOS DURANTE
LA FIBROSIS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. ERANDI VELÁZQUEZ MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS
DR. FRANCISCO G. VÁZQUEZ CUEVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
COMITÉ TUTOR
DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

JURIQUILLA, QUERÉTARO. AGOSTO DE 2021



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.

Esta tesis se realizó en el laboratorio B11 “Fisiología Celular” del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro, bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas. El comité tutorial estuvo conformado por la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y el Dr. Rafael Villalobos Molina. El trabajo fue financiado por los donativos de PAPIIT-DGAPA-UNAM IN202620 e IN202121. La M. en C. Erandi Velázquez Miranda contó con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número 473519) para estudios doctorales. Agradecemos el apoyo del personal técnico del laboratorio B11, de la Unidad de Microscopía, de la Unidad de Proteogenómica, de la Unidad de Cómputo y del Bioterio del INB.

Resumen

Durante un daño hepático se llevan a cabo respuestas inflamatorias y de reparación del tejido, principalmente en el parénquima. Está descrito que el daño celular genera la activación de la señalización purinérgica, principalmente a través del receptor P2X7; sin embargo, el papel de los receptores P2Y en el inicio de la enfermedad crónica hepática como la fibrosis no ha sido estudiado. Para ello, en este trabajo se utilizaron ratones a los que se les administró el hepatotóxico tetracloruro de carbono (CCl₄), para implementar un modelo reversible de fibrosis hepática, con el objetivo de evaluar la expresión y función del receptor P2Y2 (P2Y2R). Los hígados fibróticos mostraron un incremento en la expresión de P2Y2R, lo cual eliminó la zonación perivascular de su expresión, presentada en animales control. Los hepatocitos de ratones a los que se les administró CCl₄ manifestaron una respuesta exacerbada de fosforilación de ERK al agonista específico para P2Y2R, UTP. La proliferación celular también incrementó en las células de hígados fibróticos. Un análisis transcripcional hepático por microarreglos, posterior a la administración de CCl₄, demostró que la activación de P2Y2R puede regular diversas vías de señalización poniendo de manifiesto mecanismos de reparación del DNA, cuya actividad se evaluó a través de la fosforilación de la histona H2AX. En conclusión, nuestros datos indican que la activación del receptor P2Y2 está involucrado en el inicio del daño fibrótico asociado a la fase reversible del daño hepático promovido por CCl₄.

Summary:

Inflammatory and wound healing responses take place during liver damage, initially in the parenchymal tissue. It is known that cellular injury elicits an activation of the purinergic signaling, mainly by the P2X7 receptor; however, the role of P2Y receptors in the onset of liver pathology such as fibrosis has not been explored. Hence, we used mice treated with the hepatotoxic CCl₄ to implement a reversible model of liver fibrosis to evaluate the expression and function of the P2Y2 receptor (P2Y2R). Fibrotic livers showed an enhanced expression of P2Y2R that eliminated its perivascular zonal distribution, observed in control animals. Hepatocytes from CCl₄-treated mice showed an exacerbated ERK-phosphorylated response to the P2Y2R-specific agonist, UTP. Cell proliferation was also enhanced in the fibrotic livers. Hepatic transcriptional analysis by microarrays, upon CCl₄ administration, showed that the activation of P2Y2R regulated diverse pathways, revealing DNA repair mechanisms, which was evaluated through the phosphorylation of H2AX histone. In conclusion, our data indicate that P2Y2R activation is involved in the onset of the fibrotic damage associated with the reversible phase of the hepatic damage induced by CCl₄.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Becaria No. 473519), así como a la dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No. 306625770) por el apoyo económico otorgado en la realización de este proyecto.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Al Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas por su tutoría y apoyo en la realización de este proyecto y durante mi estancia en el posgrado, por todos sus consejos y enseñanzas.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por el gran y valioso apoyo brindado en su laboratorio para completar el presente trabajo, así como a la Dra. Eva Olivia Vázquez Martínez, por el apoyo técnico.

Al Dr. Francesco Di Virgilio por permitirme realizar una estancia en su laboratorio para el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y al Dr. Rafael Villalobos Molina, miembros del comité tutor por los valiosos comentarios realizados a lo largo de las evaluaciones durante el doctorado.

A los miembros del jurado por la revisión, corrección y comentarios al presente escrito.

A los compañeros y amigos del laboratorio B-11.

Agradezco también el apoyo técnico de la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos por su ayuda con las imágenes de microscopía.

A la Dra. Nuri Aranda López y a la secretaria Ma. Carmen Mendoza López por su valiosa ayuda en los trámites administrativos.

A la M. en C. Adriana González Gallardo y la Unidad de Proteogenómica por el apoyo en biología molecular.

Al personal del bioterio, el M.V.Z. José Martín García Servín, responsable del Bioterio y a la Dra. Alejandra Castilla León.

A la Unidad de Cómputo

Índice

Índice	6
Introducción	8
<i>Organización celular del hígado</i>	8
<i>Enfermedad hepática crónica y fibrosis</i>	9
<i>El ATP como patrón molecular asociado al daño (DAMPs)</i>	13
<i>El sistema purinérgico</i>	14
<i>Sistema purinérgico en el hígado</i>	17
Antecedentes	18
Justificación	21
Hipótesis	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos	21
Materiales y métodos	22
<i>Animales de experimentación</i>	22
<i>Materiales</i>	22
<i>Inducción de fibrosis hepática por la administración de CCl₄</i>	22
<i>Análisis histológico</i>	23
<i>Índice mitótico</i>	23
<i>Aislamiento y cultivo de hepatocitos</i>	25
<i>Western Blot</i>	26
<i>Ensayo de viabilidad celular</i>	27
<i>Análisis de microarreglo de cDNA</i>	27
<i>Inducción de daño al DNA y evaluación por inmunofluorescencia</i>	28
<i>Análisis estadístico</i>	29
Resultados	30
<i>Fibrosis hepática inducida por CCl₄</i>	30
<i>El estado fibrótico inducido por el CCl₄ altera la distribución y abundancia del P2Y₂R</i> . 31	
<i>La función de P2Y₂R está exacerbada en hepatocitos de animales fibróticos</i>	34
<i>Análisis de la expresión génica en respuesta a UTP en hepatocitos de animales fibróticos</i>	35
<i>Incremento de la respuesta proliferativa en los hepatocitos del grupo CCl₄</i>	37
<i>Visualización de datos a través de redes de interacción</i>	40

.....	41
<i>Papel del P2Y2R en la reparación del daño al DNA.....</i>	41
<i>Participación de HIF-1 en la respuesta de reparación del daño al DNA</i>	43
<i>Comunicación cruzada entre las vías de HIF-1 y la señalización purinérgica.....</i>	48
Discusión.....	51
Conclusiones.....	58
Perspectivas	59
Referencias	60
Anexos	71

Introducción

Organización celular del hígado

El hígado está compuesto de diversos tipos celulares en los que se incluyen los hepatocitos, las células epiteliales biliares (colangiocitos), células estelares (HSCs), células de Kupffer y las células sinusoidales epiteliales hepáticas. Cada uno de estos tipos celulares posee funciones únicas que regulan la función hepática de forma cooperativa a múltiples niveles (Trefts et al., 2017).

Los hepatocitos son la principal población epitelial del hígado, conforman la mayor parte del volumen hepático y llevan a cabo muchas de las funciones atribuidas al hígado. Los colangiocitos son la segunda población epitelial más abundante del hígado y recubren el lumen de los ductos biliares. Las células estelares hepáticas representan una población celular dinámica que puede presentar un estado quiescente o activado; en estado quiescente las células estelares almacenan vitamina A en vesículas lipídicas, mientras que un daño al hígado lleva a la activación de estas células. Tras su activación, las células estelares proliferan y pierden la vitamina A almacenada; además, estas células son responsables del establecimiento y la organización de matriz extracelular en el tejido dañado. Este proceso contribuye a la cicatrización y posterior del tejido hepático, que en una condición crónica puede progresar a la patología cirrótica (Campana et al., 2021).

Las células de Kupffer son la población de macrófagos residentes del hígado, las cuales reconocen muchos estímulos patogénicos introducidos a través de la circulación portal y pueden adquirir roles tanto pro- como antiinflamatorios en la reparación del daño hepático dependiendo de los factores presentes.

Por último, las células sinusoidales son una población endotelial especializada que gracias a sus fenestraciones forman una especie de filtro en el lumen del sinusoides, lo cual es crítico para el intercambio de proteínas o partículas de cierto tamaño entre el plasma y los diferentes tipos celulares del hígado, mientras mantienen ciertas funciones de barrera (Trefts et al., 2017).

En el hígado, las células están organizadas alrededor de la unidad funcional estructural hepática, que es el lóbulo hepático (Figura 1). El lóbulo consiste en cordones de hepatocitos organizados típicamente en forma hexagonal alrededor de la vena central (Figura 1A). En los vértices de este hexágono se encuentran las triadas portales que consisten en ramificaciones agrupadas de la arteria hepática, la vena portal y los conductos biliares. El sistema circulatorio sobre el que se encuentran los cordones de hepatocitos no posee una membrana basal típica, lo que favorece el intercambio entre los hepatocitos y el sinusoides (Figura 1B). La sangre rica en oxígeno (de la arteria hepática) y la rica en nutrientes (de la circulación portal) entran al sinusoides desde las triadas portales fluyendo hacia la vena central; sin embargo, conforme avanza la sangre a través del lóbulo, las células utilizan el oxígeno y procesan los nutrientes generando gradientes de oxígeno y metabolitos, productos del uso de nutrientes de las células periportales (Figura 1B) (Trefts et al., 2017).

Estos y otros gradientes presentes a lo largo del cordón de hepatocitos, junto con una regulación diferencial de sistemas de transducción de señales, resultan en una partición y especialización de funciones, basado en la localización dentro del lóbulo, que dependerá de la disponibilidad de sustancias. Lo anterior es lo que se denomina zonación metabólica que poseen los hepatocitos, separándolos en tres zonas con espectro flexible (Trefts et al., 2017), esto es debido a que los gradientes no determinan una zona rígida (donde no haya alguna molécula o nutriente) sino que solamente bajan o suben su disponibilidad de manera gradual.

Enfermedad hepática crónica y fibrosis

La enfermedad hepática crónica es un deterioro progresivo de las funciones del hígado, que incluyen la producción de factores coagulantes y otras proteínas, la excreción de bilis y la detoxificación de sustancias dañinas provenientes del metabolismo. Éste es un proceso continuo de inflamación, destrucción y regeneración del parénquima hepático que lleva a fibrosis y cirrosis. La cirrosis es de las etapas finales de la enfermedad crónica hepática que resulta en la disrupción de la arquitectura del hígado y síntesis y deposición irreversible de matriz extracelular (ME) (Sharma & Nagalli, 2021).

Las primeras etapas de la enfermedad hepática crónica son la esteatosis, la esteatohepatitis y la fibrosis, la cual cobra especial importancia debido a que todavía es una etapa reversible que le permite al tejido recobrar la homeostasis, regenerando la arquitectura del hígado, si se elimina la fuente del daño.

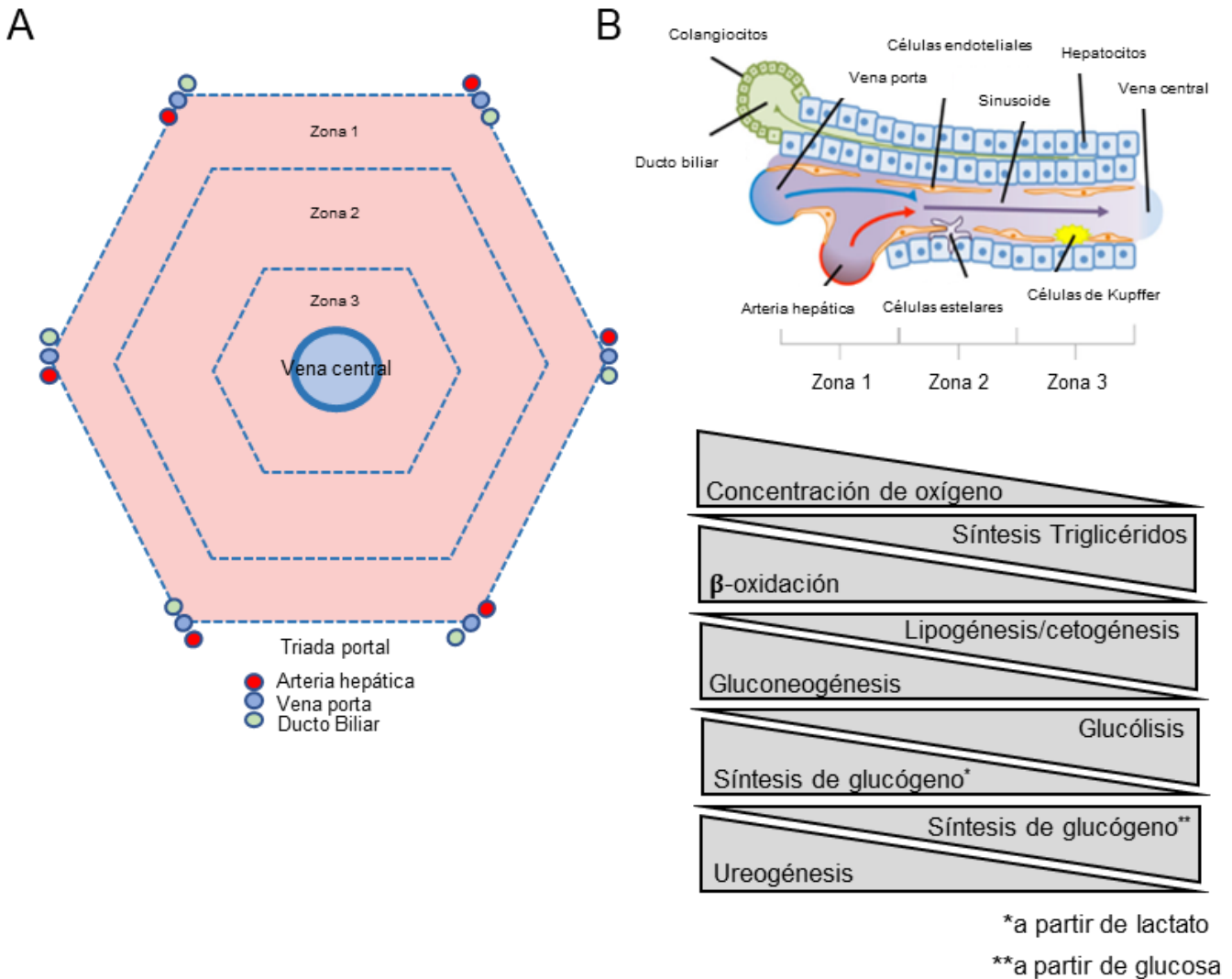


Figura 1. Organización celular del hígado. Representación geométrica de un lóbulo hepático. En los vértices se encuentra la triada portal compuesta por ramificaciones de la arteria hepática, la vena porta y el ducto biliar. La sangre rica en oxígeno proveniente de la arteria hepática se mezcla con sangre rica en nutrientes proveniente del intestino. Posteriormente, esta sangre fluye a través del lóbulo hacia los sinusoides vasculares que conducen a las ramificaciones de la vena central. B) Representación esquemática de un sinusoide hepático donde la sangre fluye a través del sinusoide dando paso al establecimiento de gradientes a lo largo de su estructura. Los gradientes se muestran abajo y corresponden a los formados por moléculas esenciales (oxígeno) y diversos procesos metabólicos fundamentales para el adecuado funcionamiento del hígado (Bravo-Manríquez, 2020).

La fibrosis hepática es un proceso fisiopatológico causada por una variedad de factores patogénicos, que induce una proliferación anormal de tejido conectivo en el tejido hepático (Bao et al., 2021). Los procesos de reparación de herida después de un daño hepático pueden estar acompañados por el desarrollo de fibrosis, y si los factores que subyacen al daño no son atendidos, el proceso de fibrosis continua, eventualmente favoreciendo el establecimiento de cirrosis (Parola & Pinzani, 2019).

Hay dos tipos generales de enfermedades crónicas del hígado, hepatocelular (daño a los hepatocitos, como hepatitis crónica viral y esteatohepatitis no-alcohólica) y colestásica (obstrucción al flujo biliar, como cirrosis biliar primaria) (Bataller & Brenner, 2005). Se han desarrollado modelos experimentales de fibrosis hepática en roedores para estudiar estos dos tipos de enfermedades crónicas del hígado: la administración repetida de tetracloruro de carbono (CCl₄) produce daño hepatocelular y la ligación del conducto biliar induce daño colestásico (Bao et al., 2021).

Dentro de un cuadro fibrótico hay un desbalance entre la síntesis y la degradación de ME, a lo que se aúna la necrosis hepatocelular. Además, la ME endógena experimenta cambios: su abundancia aumenta de tres a cinco veces y pasa a ser de baja densidad a tipo intersticial, también llamada colágena fibrilar, la cual es rica en colágena tipo I, fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronato y proteoglicanos (Iredale et al., 2013), generando una estructura más rígida.

En el espacio extracelular, la degradación de la ME ocurre normal y predominantemente como consecuencia de la acción de la familia de enzimas metaloproteasas de la matriz (MMPs), estas son secretadas por las células como proenzimas que son activadas por un número de mecanismos específicos de escisión, usualmente asociados a la superficie de la célula (Parola & Pinzani, 2019).

Las enzimas activas son, a su vez, inhibidas por una familia de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP-1 a -4). A través de estos mecanismos la síntesis y degradación de la ME está altamente regulada; sin embargo, durante un cuadro fibrótico la ME depositada es parcialmente resistente a la actividad de las MMPs. Además, aumenta la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 (Iredale et al., 2013).

La distribución de este material fibroso depende del origen del daño hepático. En la hepatitis viral crónica y los trastornos colestáticos crónicos el tejido fibrótico se localiza inicialmente alrededor de los tractos portales, mientras que en la enfermedad hepática inducida por alcohol se localiza en las áreas pericentrales y perisinusoidales (Bao et al., 2021).

Los macrófagos residentes, por su parte, participan en la iniciación de las respuestas inflamatorias durante un daño, y la posterior infiltración de macrófagos derivados de monocitos llevan a una inflamación crónica del hígado. Durante un proceso de inflamación, la cantidad de macrófagos hepáticos se expande, los cuales secretan rápidamente citocinas proinflamatorias y quimiocinas, como la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF), resultando tanto en una activación parácrina de vías de señalización de hepatocitos, como en el reclutamiento de células del sistema inmunológico adicionales que amplificarán el daño hepático, liberando factores pro-fibróticos, como TGF- β , que resultan en la activación de HSCs (Cheng et al., 2021).

Las HSC quiescentes están localizadas en el espacio de Disse y almacenan retinoides en vesículas lipídicas; también expresan marcadores gliales como la proteína ácido gliofibrilar (GFAP). Existe evidencia que les atribuye un papel relevante en la inducción y el mantenimiento de la fibrosis, al sufrir una transdiferenciación a miofibroblastos, proceso conocido como activación (Campana et al., 2021). Como consecuencia de esta transdiferenciación, las HSCs promueven el aumento de la secreción de colágena, fibronectina y otras proteínas estructurales, además de adquirir una alta capacidad de contracción. Una vez activadas, son las principales células que producen colágena en el hígado afectado (Khanam et al., 2021).

Además de las HSCs, los miofibroblastos portales y los fibrocitos también exhiben potencial fibrogénico y pueden llegar a ser la principal fuente de miofibroblastos productores de colágena dependiendo del tipo de daño. Las HSCs quiescentes se activan principalmente en un cuadro hepatocelular, mientras que los miofibroblastos portales son los principales productores de colágena en un daño de tipo colestático (Iwaisako et al., 2014; Xu et al., 2014).

Dentro del contexto de la Enfermedad Crónica Hepática se pueden distinguir dos procesos principales que pueden estar llevándose a cabo a la par, que son por un lado un estado de inflamación y por el otro la regeneración del tejido dañado. El contexto inflamatorio en la fibrosis está ampliamente descrito e incluye la liberación de citocinas proinflamatorias y el reclutamiento de células del sistema inmune. Además, el grado de inflamación es uno de los principales componentes que regulan la transición de daño hepático al establecimiento de la enfermedad crónica (Perez et al., 2021).

Por otro lado, el hígado posee gran capacidad regenerativa, a pesar de que existe una tasa proliferativa muy baja que es responsable del recambio de hepatocitos que ocurre en un hígado sano. Sin embargo, se ha reportado que en una condición de daño agudo, los hepatocitos, colangiocitos y células endoteliales comienzan a proliferar para restaurar la arquitectura y la función del parénquima hepático (Campana et al., 2021).

El ATP como patrón molecular asociado al daño (DAMPs)

Durante un proceso de daño tisular, las primeras manifestaciones de estrés celular dan como resultado la liberación de diferentes moléculas, denominadas *patrones moleculares asociados al daño* (DAMPs). Ésas son moléculas endógenas que sirven como potentes activadores del sistemas de alarma y daño que normalmente residen dentro de la célula, desempeñando diversos roles fisiológicos, pero que son liberados al espacio extracelular cuando las células son expuestas a un estrés o daño (Murao et al., 2021).

Una vez que estas señales se difunden alrededor del tejido involucrado, se inician eventos celulares inmediatos incluyendo cambios en la forma celular, formación de actomiosina y reclutamiento de células inmunes (Cordeiro & Jacinto, 2013).

Los DAMPs pueden activar complejos multiproteicos intracelulares que detectan la presencia de patógenos y células dañadas, llamados inflamomas. Estos complejos inducen la activación de la caspasa-1, lo que resulta en la escisión, y por ende la activación, de las citocinas proinflamatorias interleucina (IL)-1 β e IL-18 (Zheng et al., 2020). Estas citocinas inducen fiebre, vasodilatación y el reclutamiento de células inmunes innatas hacia el sitio de la infección, llevando a la resolución del daño y la reparación del tejido (Santana et al., 2016).

Los DAMPs liberados de células dañadas son reconocidos por diversos receptores, entre éstos los receptores purinérgicos como el P2X7, lo que lleva al ensamblaje del inflamasoma y a la activación de caspasa-1 que permite la secreción de las citocinas maduras (Chaves et al., 2019). Uno los principales DAMPs descritos es el ATP que, después de un daño celular, es liberado de las células (Murao et al., 2021).

El papel del ATP como señalizador de daño está evolutivamente conservado en varios sistemas de defensa biológica (Burnstock & Verkhratsky, 2010). La señalización purinérgica está íntimamente involucrada en la activación de la respuesta inmune periférica, siendo no sólo un estimulador sino un regulador preciso de la diferenciación y función de las células inmunocompetentes, así como una guía para la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y mastocitos (Campos-Contreras et al., 2020; Kepp et al., 2021). El ATP y sus análogos están directamente implicados en la remodelación tisular en respuesta a un daño (Burnstock & Verkhratsky, 2010).

Las concentraciones extracelulares de ATP son muy bajas en condiciones fisiológicas (en el rango nM), ya que están altamente reguladas por desfosforilación en sus diversos metabolitos. Sin embargo, las concentraciones extracelulares del nucleótido pueden aumentar notablemente en condiciones de estrés celular como inflamación, infección, hipoxia o trauma, debido a la liberación activa o pasiva por diferentes tipos celulares (Kepp et al., 2021).

El sistema purinérgico

El papel central del ATP y sus metabolitos en los procesos energéticos celulares está bien documentado; no obstante, sus acciones no se limitan a la bioenergética sino también son elementos importantes en la comunicación intercelular. En 1929, Drury y Szent-Györgyi describieron por primera vez las acciones extracelulares de los nucleótidos y los nucleósidos purinérgicos en el sistema cardiovascular; en su trabajo, reportaron que las purinas extracelulares eran responsables de la dilatación de vasos coronarios y de la inhibición de la actividad espontánea del músculo liso del intestino (Drury & Szent-Györgyi, 1929).

La primera evidencia de que el ATP podría ser un transmisor en el sistema nervioso autónomo surgió cuando se observó que el ATP, liberado de los nervios sensoriales durante una estimulación nerviosa antidrómica, provocaba vasodilatación en la arteria del oído del conejo (Holton & Holton, 1954).

En 1972, Burnstock propuso la hipótesis del nervio purinérgico, con el ATP como la molécula responsable de la transmisión no-adrenérgica no-colinérgica en el músculo liso de las vísceras y la vejiga (Burnstock, 1972). Actualmente, se ha identificado que el ATP actúa tanto como neurotransmisor como un co-transmisor en la mayoría de los nervios tanto del sistema nervioso periférico como del central (Burnstock, 2007).

Inicialmente, la investigación se centró en la señalización purinérgica a corto plazo en la neurotransmisión, neuromodulación y la secreción; sin embargo, estudios posteriores establecieron también el papel de esta señalización en efectos de largo plazo como la proliferación celular, la diferenciación, la movilidad y la muerte celular durante el desarrollo y la regeneración (Burnstock & Verkhratsky, 2010).

Actualmente se sabe que el ATP se libera al espacio extracelular a través de varios mecanismos que pueden ser tanto sistémicos como locales y en respuesta a diferentes estímulos ya sean mecánicos, cambios en el pH o estrés hipotónico. Dos principales mecanismos de liberación han sido propuestos, que son de forma vesicular y difusiva (Verkhratsky & Burnstock, 2014).

Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la liberación de ATP aún no están completamente descritos, en parte debido a que parecen ser muy diversos además de específicos dependiendo del tipo celular. Asimismo, se requiere de la maquinaria para algunas formas de liberación, por ejemplo, la liberación vesicular que se observa en las neuronas que se encuentra también en neutrófilos y células β -pancreáticas (Sakamoto et al., 2014).

Dentro de lo que se conoce de la maquinaria de secreción, una de las moléculas más relevantes es el transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) que juega un papel crucial en regular el almacenamiento y posterior liberación de ATP (Wei et al., 2019). Además de la secreción, se han descrito otros mecanismos de liberación de ATP como el canal aniónico regulado por volumen, los hemi-canales conformados por panexinas, el modulador de homeostasis de calcio (CALHM₁), el canal maxi-anión (Verkhratsky & Burnstock, 2014), y el mecanismo, ya ampliamente descrito, que involucra al receptor purinérgico P2X₇, el cual tras su activación repetida con ATP en concentraciones mayores a las de la homeostasis (0.5-1 mM), forma parte de la activación del inflamasoma NLRP-3, que induce muerte celular, daño tisular y la liberación de más ATP en un bucle de retroalimentación positiva (Oliveira-Giacomelli et al., 2021).

Después de su liberación, el ATP y otros nucleótidos experimentan una degradación enzimática por acción de las ectonucleotidasas, lo que es funcionalmente importante ya que los metabolitos del ATP funcionan como ligandos fisiológicos para varios receptores purinérgicos. Las ectonucleotidasas incluyen las E-NTPasas (ectonucleósidos trifosfato difosfohidrolasas), E-NPPs (ectonucleótido pirofosfatasa y/o fosfodiesterasas), las fosfatasas alcalinas y la ecto-5'-nucleotidasa (Zimmermann et al., 2007). Conjuntamente, la liberación de ATP y su transformación por ectonucleotidasas establece condiciones particulares de mensajeros purinérgicos en el espacio extracelular, que actúan a través de receptores específicos.

Se han descrito dos grandes familias de receptores purinérgicos: los receptores P1 que son activados por nucleósidos y los receptores P2 que son activados por nucleótidos. Los receptores P2, a su vez, se han subdividido en receptores P2X y receptores P2Y (Pietrowski et al., 2021). Los receptores P2X son canales catiónicos dependientes de ligando permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Son canales triméricos formados de subunidades individuales codificadas por siete genes diferentes (designados P2X1 al 7, de acuerdo con orden histórico de su clonación). Las subunidades de los receptores P2X se asocian formando homo y heterotrimeros, que son diferentes en propiedades electrofisiológicas y/o farmacológicas (Kanellopoulos et al., 2021).

Por otro lado, los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) de 308 a 377 aminoácidos con una masa molecular de 41 a 53 kDa y a la fecha se han clonado 8 subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11-14. Los receptores P2Y se pueden clasificar en dos subgrupos, de acuerdo con la subunidad $G\alpha$ a la que están acoplados. Los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 activan $G\alpha_q$ y por lo tanto promueven respuestas robustas de la señalización de IP_3 y DAG, mientras que los receptores P2Y12-14 activan $G\alpha_i$ llevando a la disminución de la concentración citoplasmática de AMPc (Figura 2).

Asimismo, ambos subgrupos son capaces de activar otras cascadas de señalización llevadas a cabo por las subunidades $\beta\gamma$ (von Kügelgen & Harden, 2011). La activación de varios de los receptores P2Y está comúnmente asociada con vías proliferativas, como la estimulación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en particular la cinasa regulada extracelularmente (ERK) 1/2 también llamadas p42/p44 ERK, que puede ser activada por la proteína cinasa C (PKC); o la vía de PI3-K/AKT (Abbracchio et al., 2009).

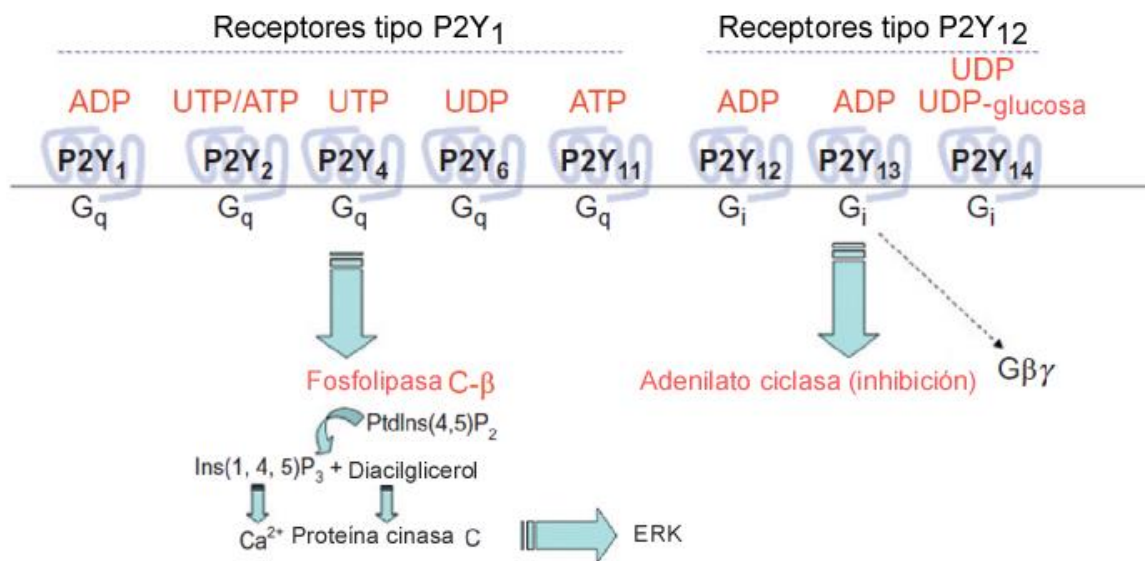


Figura 1. Principales vías de señalización de los receptores P2Y. Los receptores P2Y pueden ser activados por ATP/UTP o sus metabolitos y pueden ser clasificados de acuerdo con la subunidad α de la proteína G a la que están acoplados. Los receptores tipo P2Y₁ están acoplados a la subunidad α_q activando a la cinasa fosfolipasa C- β , la cual promoverá la activación tanto del inositol trifosfato (IP₃), que actuará sobre sus receptores en el retículo endoplasmático liberando Ca²⁺ intracelular, como del diacilglicerol activando a la proteína cinasa C la cual es capaz de fosforilar a la proteína p42/p44 ERK. Por otro lado, la subunidad α_i de la proteína G a la que están acoplados los receptores tipo P2Y₁₂ promoverá la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, lo que reducirá la cantidad de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular y activará vías de señalización que son reguladas por el complejo formado por las subunidades β y γ de la proteína G (Velázquez-Miranda, 2017).

Sistema purinérgico en el hígado

El hígado sintetiza la mayoría de los nucleótidos del cuerpo (ATP, ADP, UTP y UDP) (Daré et al., 2021) y está descrito que el ATP extracelular es un factor que tiene influencia sobre múltiples funciones hepáticas de forma autócrina y parácrina (Woo et al., 2010). Se ha reportado la expresión de diferentes subtipos de receptores purinérgicos en hepatocitos humanos y de rata, cuya activación ha sido asociada a diferentes funciones celulares como la regulación del metabolismo y la proliferación, así como la regulación de la secreción de bilis (Daré et al., 2021).

Además, se ha propuesto que la expresión diferencial de receptores P2Y tiene un papel en la activación de HSCs, pues las HSCs quiescentes de rata expresan los receptores P2Y2 y P2Y4, mientras que una vez activadas expresan al receptor P2Y6; y se ha relacionado la actividad del receptor con la regulación positiva de la transcripción del gen que codifica para la pro-colágena-1 (Dranoff et al., 2004).

Por otro lado, el balance de nucleótidos/nucleósidos, generado por las ectonucleotidasas, también juega un papel en la regulación de la comunicación de las células residentes del hígado y aquellas del sistema inmune (Wang et al., 2020). Durante la inflamación que ocurre en la fibrosis hay una regulación a la alta de los receptores purinérgicos P2X, en particular del receptor P2X7 (Burnstock, 2016). El ATP liberado de las células dañadas aumenta la respuesta inflamatoria a través de la liberación de IL-1 β y TNF- α (Daré et al., 2021).

El receptor P2X7, al activarse en condiciones patológicas debido a la amplia liberación de ATP, induce la activación de vías proinflamatorias que conllevan el ensamblaje del inflamasoma NLRP-3 y la liberación de citocinas (Oliveira-Giacomelli et al., 2021). También el receptor P2Y2 ha sido reconocido como un receptor con función de quimiotaxis para la atracción de neutrófilos durante la inflamación (Ayata et al., 2012).

Por otra parte, se ha descrito que otro elemento del sistema purinérgico, la adenosina, tiene un papel importante en la inducción de la fibrosis promoviendo la activación de las HSCs y la acumulación de ME (Ezhilarasan, 2021). Sin embargo, existe evidencia que, de manera sistémica, la adenosina puede revertir la fibrosis hepática inducida por CCl₄ (Hernández-Muñoz et al., 2001).

Antecedentes

Existen un buen número de evidencias que sugieren que el P2Y2R es la isoforma más abundante de los P2Y encontrada en los hepatocitos y que su activación fisiológica favorece la sobrevivencia celular (Ayata et al., 2012); sin embargo también se ha encontrado evidencia de la presencia de este receptor en diferentes tipos celulares hepáticos como colangiocitos, células endoteliales, células de músculo liso vascular, HSCs, fibroblastos portales, células de Kupffer, y linfocitos y neutrófilos asociados al hígado.

Por ello, al P2Y2R se le ha atribuido un papel importante en la regulación de actividades fisiológicas de varios tipos celulares hepáticos como la regulación del metabolismo del glucógeno en hepatocitos, la secreción de la bilis y la interacción entre hepatocitos y colangiocitos, y la secreción de la prostaglandina E2 en células endoteliales (Burnstock et al., 2014).

En el modelo de hepatectomía parcial, con fines de evaluar los mecanismos que subyacen al crecimiento hepático, se observó que usando un agonista no hidrolizable de receptores purinérgicos se activaba la vía proliferativa de JNK, involucrando a las cinasas c-jun y c-fos (Thevananther et al., 2004) y está reportado que en este modelo incrementa el ATP extracelular (Graubardt et al., 2013). Además, se ha demostrado que el P2Y2R juega un papel crucial en la fase de proliferación de la respuesta regenerativa del tejido, posterior a la hepatectomía (Tackett et al., 2014).

En la patología hepática, se ha reportado que en células de hepatocarcinoma (HCC) humano aumenta la expresión del P2Y2R comparado con hepatocitos de humanos sanos y que la actividad de este receptor promueve la proliferación y migración celular (Xie et al., 2014). Asimismo, en otras líneas celulares de HCC, el P2Y2R promueve la proliferación y la sobrevivencia ante un reto de hipoxia (Carini et al., 2006; Tak et al., 2016).

De la misma forma, en un modelo de hepatitis aguda se reportó la liberación de grandes cantidades de ATP además de la inducción de la expresión del P2Y2R. En este mismo trabajo, los autores describieron una reducción de daño hepático y necrosis en animales deficientes del P2Y2R o bloqueándolo farmacológicamente, después de la inducción de daño hepático por acetaminofén. Además, se demostró que la expresión de este receptor en células derivadas de la médula ósea era necesaria para su infiltración en el hígado (Ayata et al., 2012).

Recientemente se demostró que el P2Y2R juega un papel relevante en la inducción de carcinogénesis hepática, ya que en los ratones nulos para este receptor los autores observaron una menor incidencia y un menor número de tumores hepáticos en respuesta a la inyección del agente carcinogénico dietilnitrosamina (DEN). Con respecto al mecanismo, el efecto en los animales deficientes del receptor fue correlacionado con una disminución en la proliferación celular, que correspondió con una reducción del factor de transcripción c-JUN y su gen blanco la ciclina D1 (CCND1) en las etapas tempranas de respuesta al hepatotóxico (Schulien et al., 2019).

En otro estudio, se reportó que el P2Y2R podría participar en la esteatosis hepática, ya que una deficiencia de éste tiene un efecto protector en un modelo de hígado graso no alcohólico. En este trabajo, observaron que los animales deficientes del P2Y2R presentaban una regulación más eficiente del metabolismo de lípidos, a través del aumento en la actividad de la cinasa activada por AMP (Dusabimana et al., 2021).

En un estudio previo, utilizamos el modelo de administración de CCl₄ durante 4 semanas para el establecimiento de fibrosis hepática temprana en ratones y analizamos en homogenados de hígado de animales controles y fibróticos la expresión de los transcritos de los diferentes P2Y. Observamos que existe un aumento significativo del *P2ry2* y *P2ry6*, mientras que el *P2ry13* disminuyó en su expresión. No detectamos expresión del transcrito del *P2ry4* en ninguna de las condiciones y no observamos cambios significativos en la expresión de los transcritos *P2ry12* y *P2ry14* (Velázquez-Miranda, 2017). Tomando estas evidencias fue de interés ahondar en la descripción del posible rol del P2Y2R en el contexto fibrótico.

Justificación

Actualmente existe un creciente interés en conocer los procesos celulares en los que se encuentra involucrada la señalización purinérgica en condiciones patológicas, con el fin de encontrar herramientas terapéuticas para coadyuvar en el tratamiento de enfermedades crónicas. Para la enfermedad hepática crónica, el estado fibrótico, como una de primeras etapas de la enfermedad, es de especial relevancia por ser reversible y, por lo tanto, es el periodo ideal para la intervención terapéutica. Entender los elementos que participan en esta etapa y su mecanismo puede ser la clave para prevenir el desarrollo de un contexto patológico de gravedad como la cirrosis y el hepatocarcinoma.

Hipótesis

Dado que, en el tejido hepático de ratones con fibrosis hepática, inducida por daño hepatocelular, la expresión del P2Y2R se encuentra incrementada, proponemos que este receptor desempeña un papel pro-fibrótico en los hepatocitos.

Objetivo general

Analizar el papel de la señalización mediada por el P2Y2R en hepatocitos en un contexto fibrótico.

Objetivos específicos

1. Comparar los niveles de expresión del P2Y2R en condiciones control y fibróticas.
2. Analizar la fosforilación de ERK como un indicador de actividad en hepatocitos sanos y fibróticos.
3. Evaluar si en hepatocitos sanos o fibróticos la activación de receptores P2Y, específicamente el P2Y2R, modula de manera diferencial la proliferación celular.
4. Analizar el patrón de expresión génica en respuesta a la activación del P2Y2R con UTP en hepatocitos sanos o fibróticos.
5. Comprobar de manera experimental la activación de las vías reguladas a la alta en el análisis de expresión génica posterior a la estimulación purinérgica.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 con un peso de 20-25 g obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología (INB), los cuales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. Los ratones se alojaron en cajas de acrílico en las cuales tuvieron acceso sin restricción a comida y agua. Todos los procedimientos descritos en el presente estudio están de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, emitida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por el Comité de Bioética del INB.

Materiales

Los compuestos ATP (#A2383), UTP (#U6625) y UDP (#94330) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, así como el anticuerpo anti β -actina (#A2066) y el medio William's E (#W4125); los anticuerpos anti phospho-ERK (#4370) y ERK total (#4695), así como el de la histona γ -H2AX (#97185) fueron de Cell Signalling Technology, el anticuerpo anti P2Y2R fue de Alomone (#APR-010), el anticuerpo primario anti HIF-1 α (#216842) y el anticuerpo secundario Cy3 fueron de Abcam, la la *Taq* polimerasa (#11615) fue de Invitrogen, el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F-12* (DMEM F-12) (#12500), el suero fetal bovino (SFB) (#16000) y el antibiótico antimicótico (Anti-anti) (#15240) fueron de Life Technologies; la colágena tipo I de cola de rata (#354236) fue de Corning.

Inducción de fibrosis hepática por la administración de CCl₄

Con el fin de estudiar la expresión funcional de los receptores P2Y en la fibrosis temprana, se utilizó un modelo de daño hepatotóxico bien caracterizado (Hernández-Muñoz et al., 2001; Mortezaee et al., 2016). Los animales se inyectaron de manera intraperitoneal con CCl₄ (0.5 ml/kg) tres veces por semana, durante 4 semanas. Como vehículo se utilizó aceite de maíz, el cual es un agente emulsionante que permite la dilución del CCl₄ y no presenta toxicidad u otra actividad biológica o farmacológica con respecto al daño hepático.

Este protocolo modela el curso natural de la enfermedad hepática crónica. Inicialmente se observa hepatitis crónica que conduce a fibrosis para posteriormente desarrollarse el proceso canceroso (Novo et al., 2015); sin embargo, para fines de este proyecto sólo se administró durante cuatro semanas para evaluar etapa de fibrosis.

Para analizar la presencia de los indicadores de fibrosis como son los transcritos que codifican para la proteína COL-1 y α -Actina de músculo liso (α -SMA), esta último como un indicador de HSCs activadas o células con fenotipo miofibroblástico, se llevó a cabo una RT-PCR de punto final. Para este análisis se utilizó el transcrito que codifica para la proteína GAPDH como transcrito constitutivo.

Análisis histológico

Para confirmar que el modelo de CCl₄ induce fibrosis hepática en los animales, se tomaron muestras de tejido de ambos grupos experimentales, se fijaron en formalina al 10% y posteriormente se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes del tejido de 5 μ m de grosor para posteriormente ser teñidos mediante la técnica de hematoxilina y eosina, así como la tinción *Tricrómica de Masson* (Lee L, 1968).

La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) fue utilizada para evaluar la integridad del tejido, su arquitectura, citología e infiltración de células del sistema inmune (un indicador de inflamación). Después, se llevó a cabo la técnica de *Tricrómica de Masson*, la cual permite visualizar claramente las fibras de colágena tipo I. Brevemente, después de teñir con H&E, se trata al tejido con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico y azul de anilina, ya que estos ácidos proveen de medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, por lo que las fibras de colágena se teñirán de dicho color (McGavin MD et al., 2001; Nayagam et al., 2013).

Índice mitótico

Muestras de hígado fueron fijadas en formalina y se obtuvieron rebanadas de 5 μ m de grosor. Las rebanadas fueron teñidas con H&E. Se contaron los eventos mitóticos en 72 campos de tres hígados por grupo (control o CCl₄) utilizando un objetivo de 40X. El índice mitótico se definió como el promedio de mitosis encontrado por campo (Hernández-Muñoz et al., 2001).

Análisis de la expresión del receptor P2Y2 por inmunofluorescencia

Para la detección de la expresión del P2Y2R en tejidos de animales inyectados con vehículo o CCl₄ se llevó a cabo una inmunofluorescencia. Brevemente, todos los animales fueron perfundidos con solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) a través de la vena porta hepática. Se disecaron los hígados y se fijaron en solución de formalina al 10%. Después se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor con un microtomo (RM 2150, Leica). Los cortes obtenidos se montaron en portaobjetos de vidrio gelatinizados.

Posteriormente las muestras fueron desparafinadas colocándolas en un horno a 60°C por 20 min. A continuación, los cortes fueron lavados y rehidratados pasándolos por un tren de xilol, una mezcla de alcohol-xilol (50 y 50%), alcohol en diferentes concentraciones diluido en agua (desde 100 hasta 70%) y agua, tras lo cual fueron lavados con TBS-T (Tris 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.05%) y hervidos en solución amortiguadora de citratos (Citrato de Na 0.3mM, Tween 20 0.1%, ddH₂O). Para realizar el marcaje, el tejido fue incubado a temperatura ambiente en una solución TBS-T con 5% de leche descremada por 1 h con el fin de bloquear los sitios de unión inespecífica.

El tejido fue incubado con el anticuerpo primario (anti P2Y2R, Alomone, Jerusalem; en una dilución de 1:50, desarrollado en conejo) durante toda la noche a 4°C y posteriormente por 2 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a la molécula fluorescente Cy3 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) en dilución 1:300 a temperatura ambiente. El control negativo se realizó omitiendo el anticuerpo primario.

El análisis y cuantificación de la fluorescencia se realizó a través de la medición de la fluorescencia fija en imágenes capturadas en un microscopio confocal LSM510 (Zeiss, Alemania); las condiciones de captura se mantuvieron constantes para todas las condiciones experimentales. El programa ImageJ permite la comparación en escala de grises, lo que permite la identificación de áreas (o ROIs) que se comparan contra el áreas en el negativo. Para obtener datos representativos, se utilizó el método estratificado; se obtuvieron tres mediciones citoplásmicas del mismo tamaño por hepatocito, analizando 10 hepatocitos de la primera línea alrededor de las áreas central o portal del acino hepático.

Este procedimiento se repitió en cinco imágenes por área por cada negativo y cinco por cada positivo, tanto en las zonas central como portal. Al finalizar, la cuantificación de la señal involucró 150 mediciones de muestras negativas y positivas. Los niveles relativos de fluorescencia por área central y portal se obtuvieron sustrayendo el valor del negativo a la señal del positivo. Las gráficas representan un promedio de tres ratones por grupo (Control y CCl₄).

Aislamiento y cultivo de hepatocitos

El aislamiento de hepatocitos de hígado de ratón utilizado en este trabajo está basada en un protocolo previamente establecido para la extracción y el aislamiento de HSCs (Mederacke et al., 2015), con algunas modificaciones, introducidas para este trabajo.

El protocolo se divide en dos etapas principales secuenciales: 1) perfusión del hígado *in situ* con colagenasa a través de la vena porta hepática, lo que permite que la solución salga a través de la vena cava y 2) separación basada en gradiente de densidad de los hepatocitos de otras poblaciones hepáticas; el principio que subyace es que el parénquima hepático puede ser separado fácilmente de otras células basado en su peso considerablemente mayor con respecto a otros tipos celulares en el hígado (Mederacke et al., 2015).

Brevemente, los ratones fueron anestesiados con xilacina/ketamina (1:25 mg/kg de peso corporal). Una vez que los reflejos nociceptivos desaparecieron, se realizó una incisión ventral y se localizó el hígado, la vena porta hepática y la vena cava. Utilizando un catéter se canuló la vena porta y se perfundieron 50 ml de una solución anticoagulante, "EGTA" (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄-H₂O 500 μM, Na₂HPO₄ 800 μM, HEPES 9.9 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, EGTA 500 μM, Glucosa 5 mM, pH 7.4) a 37°C.

Posteriormente se perfundieron 50 ml de una solución de colagenasa (1 mg/ml) (# 4189, Worthington) disuelta en "Solución de enzimas" (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄-H₂O 500 μM, Na₂HPO₄ 800 μM, HEPES 9.9 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, CaCl₂ 3.8 mM pH 7.4). El hígado fue disecado y dispersado en medio de William's E, la suspensión celular obtenida fue separada en un gradiente de Percoll al 10% en solución de Hanks pH 7.4.

Los hepatocitos vivos, acumulados en el botón celular fueron disgregados utilizando una pipeta serológica para ser cultivados. Una vez aislados, se cuantificó el número de células viables a través del método de permeabilidad al azul de tripano. Los hepatocitos se colocaron en cajas de 12 pozos y en cada uno se colocaron 5×10^4 células/ 3.8 cm^2 en medio DMEM F-12 adicionado con SFB al 10% inactivado, antibiótico-antimicótico y L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en una atmósfera de 5% de CO_2 por 24 h y luego 3 h en medio William's E con 0.01% de SFB antes de llevar a cabo cualquier experimento.

Western Blot

La detección de las proteínas HIF-1 α y P2Y2R y el análisis de la fosforilación de ERK se realizaron por *western blot*. Tanto HIF-1 α como el P2Y2R se detectó en homogenados de tejido hepático completo, mientras que la fosforilación de ERK en cultivos primarios de hepatocitos, sembrados en la misma densidad en la caja de cultivo. Todas las muestras fueron lisadas en solución de Laemmli (TrisCl 125mM, SDS 350 mM, Glicerol 200 mM, β -mercaptoetanol 20 mM, azul de bromofenol 0.03mM, ddH₂O) y hervidas por 5 min antes de ser centrifugadas a 5000 g por 5 min. Los extractos celulares fueron separados en geles de poliacrilamida al 10% mediante electroforesis de acuerdo con protocolos ya publicados (Vázquez-Cuevas et al., 2010).

Brevemente, los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) aplicando 200 mA por 105 min en una cámara de transferencia húmeda (Biorad). Las membranas fueron bloqueadas posteriormente por 2 h a temperatura ambiente en solución TBS-T (Tris 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.05%) con 5% de leche descremada y lavadas con TBS-T.

Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo específico, todos en dilución 1:1000. Después, las membranas se lavaron e incubaron por 2 h, a temperatura ambiente, con anticuerpo secundario (cabra anti-IgG de conejo) acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) en dilución 1:5000 y detectadas por quimioluminiscencia y autoradiografía.

Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) se utilizó para medir la viabilidad celular, siguiendo el protocolo del fabricante (Promega, EUA). Brevemente, los hepatocitos fueron cultivados en placas de 48 pozos a una densidad de 1×10^4 células/ 0.95 cm^2 en DMEMF-12 con 10% SFB. Las células fueron estimuladas con UTP por 24 h. El reactivo MTS, diluido en medio libre de suero, se agregó a cada pozo y las células se incubaron en esta reacción de 2 a 4 h hasta que se pudieran apreciar los precipitados cafés intracelulares. Después, se registró la absorbancia del medio a 490 nm con un espectrofotómetro Microplate Reader MPM 6.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Análisis de microarreglo de cDNA

El ensayo de microarreglos fue realizado en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (UNAM, CDMX, México). Cultivos primarios de hepatocitos de animales del grupo control y CCl_4 se incubaron por 24 h con medio o $100 \mu\text{M}$ de UTP (Martínez-Ramírez et al., 2017). Brevemente, el RNA fue purificado con el método de Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Posteriormente se llevó a cabo la síntesis de cDNA con $10 \mu\text{g}$ de RNA total y utilizando el kit de marcaje First-Strand de cDNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), donde ambos dUTP-Alexa 555 o dUTP- Alexa 647 fueron incorporados. La emisión de fluorescencia se analizó a 555 y 650 nm para Alexa 555 y Alexa 647, respectivamente. El cDNA marcado se hibridó con un arreglo de 22,000 transcritos que comprende el 70% del genoma del ratón; el arreglo contenía una librería de sondas de 65-mer de Sigma-Genosys (<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos.html>).

Las imágenes del arreglo se adquirieron y cuantificaron utilizando el software GenePix 4100A (OMICtools, RRID:SCR_002250) de Molecular Devices (Sunnyvale, San Jose, CA, EUA). Se calcularon los valores de la densidad promedio de ambas sondas fluorescentes y el fondo promedio. El análisis de los datos del microarreglo se realizó con el software gratuito genArise (genArise, RRID:SCR_001346), desarrollado en la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>).

El software genArise identifica patrones de expresión diferencial calculando un z-score dependiente de la intensidad, donde z representa el número de desviaciones estándar que un punto tiene de la media. Considerando este criterio, los elementos con un z-score de >1.5 desviaciones estándar representaría un transcrito que se expresó diferencialmente.

Para el análisis bioinformático y para identificar el papel biológico de los genes regulados por UTP en las dos condiciones, control y fibrótica, se realizó un análisis ontológico con el software disponible en línea de Ontología Génica (GO), GeneCodis4 (<https://genecodis.genyo.es/>) (revisado de Enero a Marzo de 2020) (Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012). Además, se utilizó el software en línea STRING para visualizar como redes las interacciones del conjunto de genes que estaba mayormente representado según su z-score.

Las interacciones observadas con cada red incluyen asociaciones conocidas y predichas, que provienen de las siguientes fuentes: bases de datos curadas y determinadas experimentalmente para las interacciones conocidas; vecindad génica, fusión y coocurrencia génica para las asociaciones predichas; además de búsqueda de textos, co-expresión y homología proteica para otras fuentes (Szklarczyk et al., 2019). Los datos fueron depositados en ArrayExpress-EMBL-EBI, con número de acceso: E-MTAB-8302.

Inducción de daño al DNA y evaluación por inmunofluorescencia

Para inducir el daño al DNA, específicamente de cortes de doble cadena (DSBs), se utilizó el método de administración *in vitro* de etopósido, el cual está documentado que permite la evaluación de este tipo de daño al DNA, ya que actúa como inhibidor de la topoisomerasa II evitando la unión de las cadenas durante la replicación (Papież et al., 2015; Zhang et al., 2021).

Brevemente, se obtuvieron los cultivos primarios de hepatocitos que fueron colocados en vidrios, previamente tratados con colágena tipo I de cola de rata, para permitir su adherencia, por 16 h. Posteriormente, se administraron los tratamientos farmacológicos indicados para cada experimento, los cuales incluyen, al UTP, al antagonista específico del P2Y2R (ARC-118925), al estabilizador de HIF-1 α (CoCl₂) y al inhibidor de la proteína HIF-1 α (HIFi).

Para evaluar el daño de DSBs, se utilizó como marcador la detección de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) en la serina 139 por inmunofluorescencia, ya que está descrito que poco tiempo después de la formación de DSBs, la H2AX es fosforilada y se acumula en el sitio de daño del DNA (Papież et al., 2015). La inmunofluorescencia para la detección de la histona en los hepatocitos se realizó siguiendo protocolos previamente descritos (Vázquez-Cuevas et al., 2013). Tanto el anticuerpo primario de γ -H2AX como el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a la molécula fluorescente Cy3 fueron usados en una dilución 1:200 en PBS-Tween al 0.05%. Las muestras se analizaron por microscopía de fluorescencia (Zeiss Apotome 3) y se cuantificó un promedio de 20 células por imagen y 20 imágenes por condición o tratamiento con los diferentes fármacos.

Análisis estadístico

Todos los datos numéricos se expresaron como la media \pm el error estándar. Los datos fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianzas y de normalidad para determinar si tenían una distribución normal. En los experimentos de *western blot*, se cuantificaron las bandas obtenidas por densitometría. En los experimentos de MTS, se evaluó con un espectrofotómetro la acumulación de formazán a 490 nm. En los experimentos de cuantificación de γ -H2AX, se contó el número de células γ -H2AX+ con respecto al número total de células.

Todos los valores se normalizaron con el control o basal de cada experimento y se analizaron por la prueba *t de Student* o ANOVA de una vía, dependiendo del número de grupos analizados y es señalado en cada caso. Se utilizó el programa *GraphPad Prism* para las pruebas estadísticas. Se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

Resultados

Fibrosis hepática inducida por CCl₄

El uso de CCl₄ para inducir fibrosis hepática es un modelo ya bien caracterizado (Hernández-Muñoz et al., 2001; Mortezaee et al., 2016); en el presente trabajo, se indujo un estado de fibrosis reversible, como se describe en la sección de Métodos. El análisis histopatológico utilizando la tinción de H&E en los hígados de animales control (Figura 3A) mostró hepatocitos sanos con un citoplasma eosinófilo granular, así como núcleos intactos con nucléolos claramente definidos. La arquitectura del tejido mostró tractos portales normales con vénulas portales, arteriolas hepáticas y ductos biliares interlobulares sin alteraciones, así como un espacio sinusoidal conservado entre cordones hepáticos (Figura 3A). Utilizando la tinción Tricrómica de Masson se observaron fibras de colágena delgadas delimitadas tan sólo a la zona pericentral (Figura 3B).

En los animales a los que se les administró CCl₄ durante 4 semanas, las anormalidades en el tejido fueron evidentes. Ambas zonas, portal y central, presentaron anisocitosis (evidencia de un estado de inflamación) en áreas extensas. Los hepatocitos presentaron vacuolas de grasa, así como una alta incidencia de núcleos sin membrana, picnosis y cariólisis. Este grupo también exhibió signos de necrosis e inflamación, además de un alto conteo de linfocitos en las zonas portal y central, así como pérdida de espacio de Disse (Figura 3A).

Con la tinción Tricrómica de Masson, se observaron gruesas fibras de colágena en la zona portal con ramificaciones hacia la zona central. El tejido también presentó hiperplasia y la formación de nuevos ductos biliares en respuesta al daño tóxico (Figura 3B). Además, los animales del grupo CCl₄ mostraron hepatomegalia (4.3 ± 0.3 vs $5.7\% \pm 0.4\%$ peso del hígado/peso corporal del grupo control y CCl₄, respectivamente, $p = 0.0021$, t de Student, $n = 4$) (Figura 3C), una característica de la inducción de un estado fibrótico. Para confirmar el estado pro-fibrótico de los hígados de los animales del grupo CCl₄, se midió el índice mitótico. Se observó que los hígados de estos animales exhibieron aumento en la frecuencia del índice mitótico de los hepatocitos (0.30 ± 0.07 vs 2.2 ± 0.2 mitosis por campo, $p < 0.0001$, t de Student) (Figura 3D).

Asimismo, se analizó por RT-PCR la inducción del gen que codifica para cadena α -1 del colágeno tipo I en ratones (*Col1a1*) y se comparó con el transcrito constitutivo *Gapdh*. Se observó un incremento significativo en el transcrito de *Col1a1* cuando se comparó contra animales control (4.0 ± 0.3 veces de cambio del control, $p < 0.0001$, *t* de Student) (Figura 3E).

El estado fibrótico inducido por el CCl₄ altera la distribución y abundancia del P2Y₂R

Dado que, como mencionamos en los antecedentes, teníamos evidencia del incremento en el nivel de expresión del transcrito de *P2ry2* en los hígados de animales fibróticos (Velázquez-Miranda, 2017) se analizó la abundancia y los patrones de expresión de P2Y₂R por inmunofluorescencia. En los hígados de animales control el P2Y₂R mostró una clara distribución dependiente de la zona; en cambio, el tratamiento con CCl₄ promovió un aumento generalizado en la expresión de P2Y₂R en el hígado (0.6 ± 0.1 vs 1.8 ± 0.2 D.O., para el grupo control y CCl₄, respectivamente, $p=0.031$ *t* de Student, $n=3$ animales, tres laminillas cada uno), resultando en la pérdida de la zonación hepática de P2Y₂R (Figura 4A y B).

El incremento en la expresión de P2Y₂R en animales a los que se les administró CCl₄ se confirmó por *western blot* (122 ± 24 vs 179 ± 14 D.O., grupos control y CCl₄ respectivamente, $p=0.036$, *t* de Student, $n=3$) (Figura 4C).

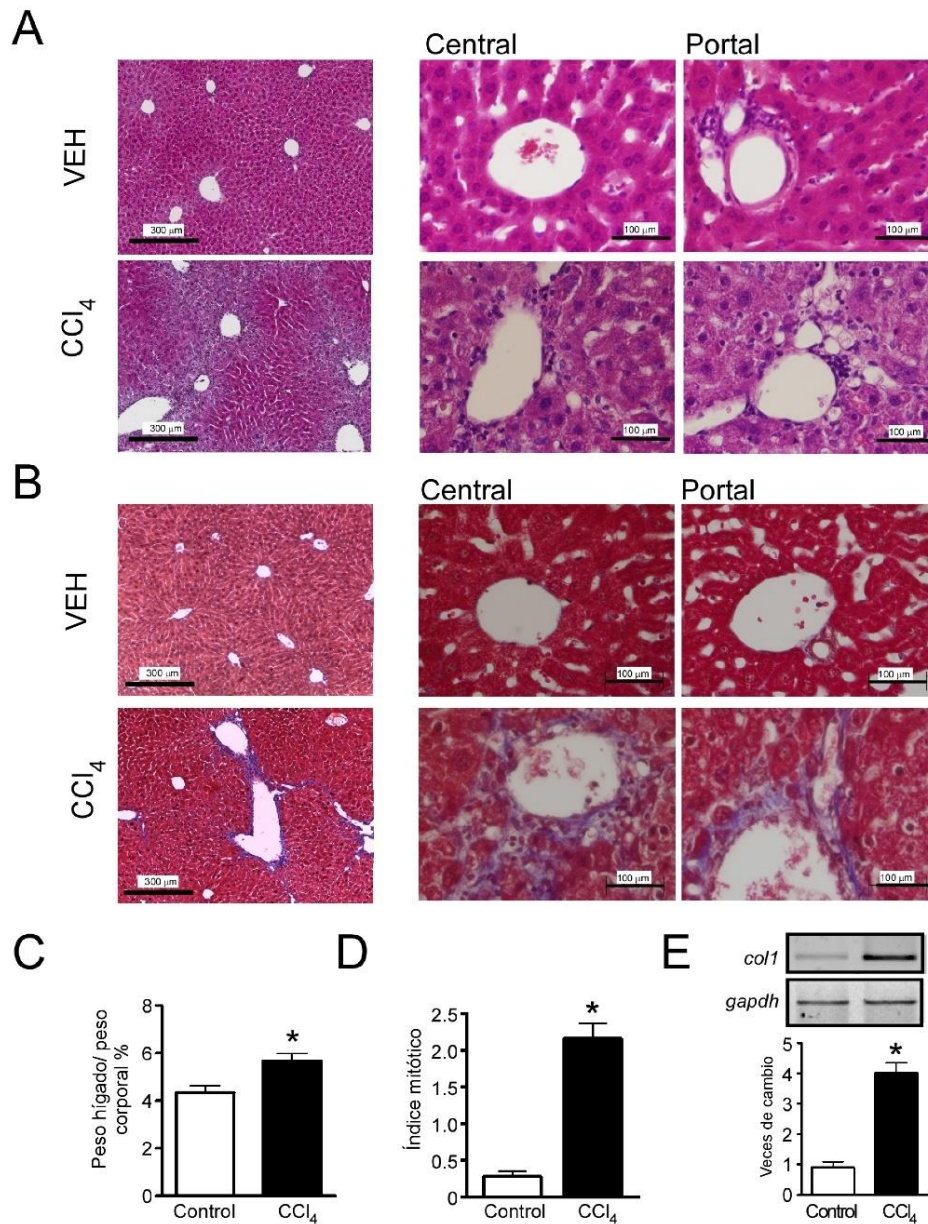


Figura 3. La administración de CCl₄ induce un fenotipo fibrótico. Ratones de la cepa C57BL6 recibieron inyecciones intraperitoneales de CCl₄ tres veces a la semana por 4 semanas, posteriormente, se realizó un análisis histopatológico de secciones del hígado. A) Hematoxilina e Eosina y B) Tricrómica de Masson de secciones de 5 μ m de hígado, mostrando campos de baja magnificación y las regiones portal y central, de animales control y tratados con CCl₄. C) Porcentaje del peso del hígado con respecto al peso corporal de animales de ambos grupos. D) Efectos del tratamiento con CCl₄ sobre la tasa de mitosis en el hígado (índice mitótico) y E) Expresión del transcrito de *Col1a1* en homogenados de hígado como marcador de fibrosis * $p < 0.05$, t de Student. Para C, los datos son el promedio de 3 ratones. En D, los resultados son el promedio de 72 campos de tres hígados de cada grupo y en E, se analizaron cinco animales por grupo.

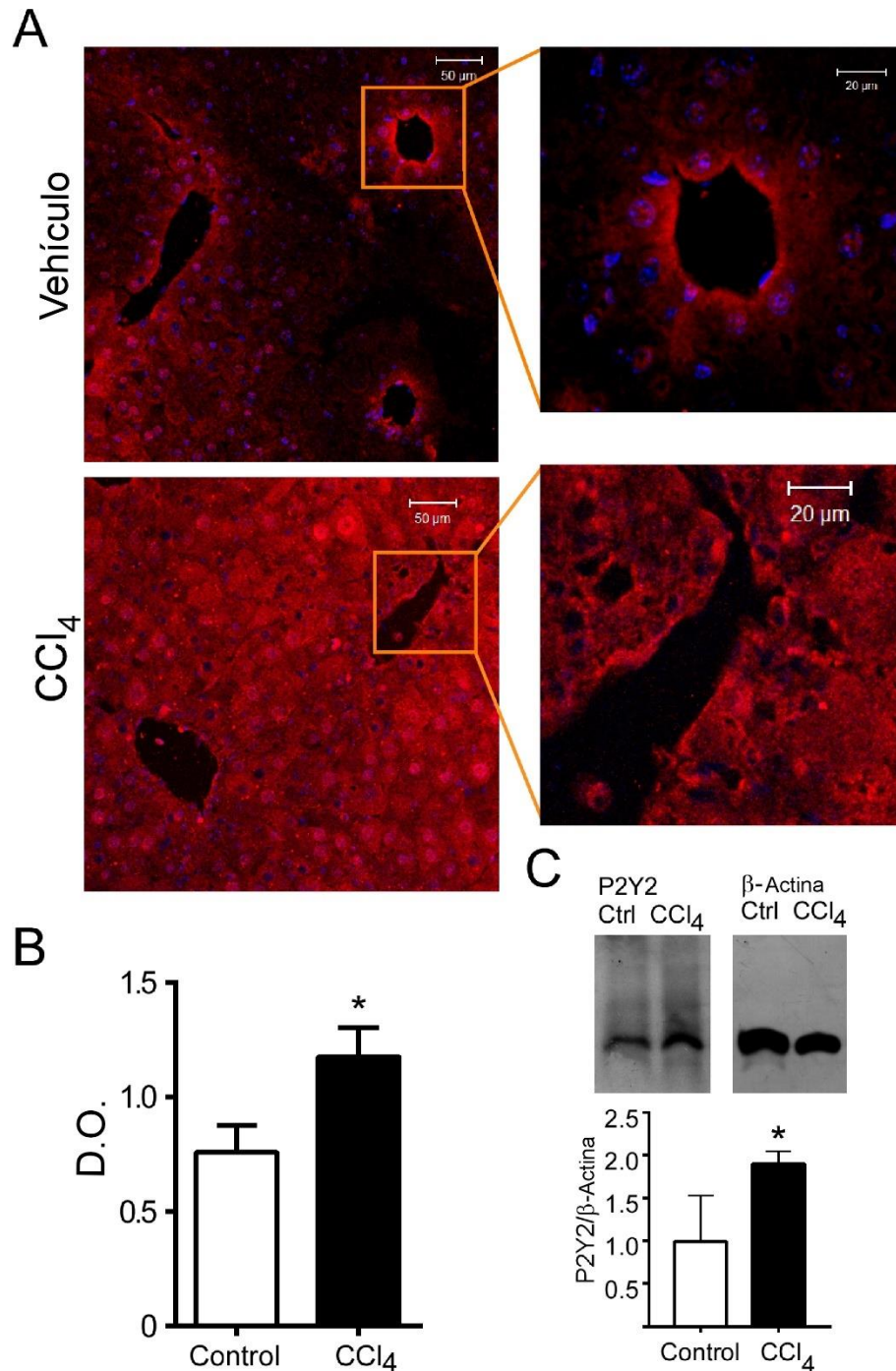


Figura 4. Detección del P2Y2R en secciones de hígado de ratones de los grupos Control y CCl₄. A) Rebanadas de hígado (5 μm) de animales de ambos grupos fueron marcadas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo primario dirigido al carboxilo terminal del P2Y2R y un anticuerpo secundario acoplado a Cy3 (rojo). B) Cuantificación de la fluorescencia total (n = tres ratones, tres rebanadas de cada uno). C) Análisis de la expresión de P2Y2R en muestras de hepatocitos de animales de ambos grupos por Western Blot y corregido contra β-actina como proteína constitutiva, * p < 0.05, *t* de Student. N=3.

La función de P2Y2R está exacerbada en hepatocitos de animales fibróticos

Con el objetivo de verificar si los cambios observados en la expresión del P2Y2R en los hígados fibróticos tienen un papel funcional, se decidió estimular hepatocitos aislados de animales de ambos grupos con agonistas purinérgicos y evaluar la fosforilación de la cinasa ERK, así como la viabilidad celular. En los hepatocitos control, la estimulación farmacológica con ATP, UTP y UDP, en una concentración saturante de 100 μ M, indujo un incremento no significativo de la fosforilación de ERK (298.4% \pm 100.6%, 250.1% \pm 59.9% y 90.7% \pm 22.0% del basal, respectivamente, no significativo); sin embargo, en hepatocitos de animales fibróticos, el mismo protocolo promovió una elevación significativa en la fosforilación de ERK (357.3% \pm 92.4% para ATP, $p=0.02$; 557.3% \pm 152.4% para UTP, $p=0.02$ y 222.4 \pm 44.9% para UDP, $p=0.03$, t de Student) (Figura 5A).

Para confirmar la especificidad del estímulo con UTP sobre el P2Y2R, se usó un antagonista selectivo para el receptor denominado ARC118925 (Rafehi et al., 2017); así, ARC eliminó la fosforilación de ERK inducida por UTP (277.1% \pm 37.3% y 130.2% \pm 43.3% del basal, UTP y ARC+UTP, respectivamente, $p=0.04$, t de Student), mostrando que P2Y2R está regulando las acciones de UTP en cultivos primarios de hepatocitos de ratón (Figura 5B). El papel exclusivo de P2Y2R está además confirmado por el análisis de PCR (Velázquez-Miranda, 2017), ya que previamente reportamos que no se encontró amplificación del transcrito de *P2ry4* en los cDNAs de hígados de ratones de ambos grupos, sugiriendo que el receptor P2Y4 no se expresa en este tejido.

Además, para analizar la actividad proliferativa de los cultivos primarios de hepatocitos en respuesta a diferentes estímulos se usó el ensayo de MTS, basado en la reducción del compuesto de tetrazolio por células viables para generar el compuesto colorimétrico formazán, soluble en medio de cultivo celular; esto con la idea de que la actividad mitocondrial estaría directamente relacionada con la proliferación celular. Aunque fue significativamente diferente para ambas condiciones, los hepatocitos provenientes de animales fibróticos fueron más sensibles a un estímulo mitogénico (suero fetal bovino, SFB) que los hepatocitos de animales control (147.4% \pm 6.8% vs 111.0 \pm 1.6% del basal respectivamente, $p < 0.0001$, t de Student) (Figura 5C).

La estimulación con ATP sólo indujo una respuesta de los hepatocitos de los hígados fibróticos ($138.2 \pm 10.1\%$ vs $107.0\% \pm 1.6\%$ del basal, para los grupos CCl_4 y control respectivamente, $p=0.003$, t de Student). Los hepatocitos de los animales del grupo CCl_4 fueron más sensibles a la estimulación con UTP; en los hepatocitos de estos animales, 100 nM de UTP promovió una respuesta del $130.3 \pm 7.6\%$ $p=0.002$ vs basal, t de Student; mientras que en los hepatocitos control el incremento no fue significativo ($106.5 \pm 1.9\%$). Con 10 nM de UTP, los valores fueron de $126.5 \pm 4.9\%$ ($p=0.001$ vs basal, t de Student) y $111.1 \pm 2.3\%$ ($p=0.01$ vs basal, t de Student) para los grupos CCl_4 y control respectivamente (Figura 5C). Estos resultados sugieren que los hepatocitos de animales a los que se les administró CCl_4 son más sensibles a una estimulación purinérgica, particularmente en las respuestas asociadas con la señalización de P2Y2R.

Análisis de la expresión génica en respuesta a UTP en hepatocitos de animales fibróticos

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que el CCl_4 sensibiliza a los hepatocitos, de manera que muestran una respuesta incrementada a los estímulos asociados a la activación de P2Y2R. Por lo tanto, otro objetivo fue analizar los patrones de expresión génica inducidos por la activación de P2Y2R a través de UTP, de forma que se pudieran identificar los posibles mecanismos de la acción de las purinas en el contexto del hígado fibrótico. Para este propósito, se realizó un análisis por microarreglos de cDNA donde cerca del 70% del genoma del ratón se comparó con cDNA obtenido de cultivos primarios de hepatocitos de animales de ambos grupos, los cuales se estimularon con UTP (100 μM) por 24h (los datos de este experimento fueron depositados en ArrayExpress-EMBL-EBI, número de acceso: E-MTAB-8302).

Se observaron claros cambios en la patrón de identidad transcripcional (Figura 6). Se identificaron diferencias evidentes en el número de transcritos que fueron regulados a la alta del grupo CCl_4 (541 vs 411 del grupo control, 32% de incremento, con 33 transcritos en común para ambos grupos); así como para los transcritos regulados a la baja, los que mostraron el resultado opuesto (191 vs 374 para los grupos CCl_4 y control, respectivamente; una diferencia de 49%, teniendo 38 transcritos en común) (Figura 6A).

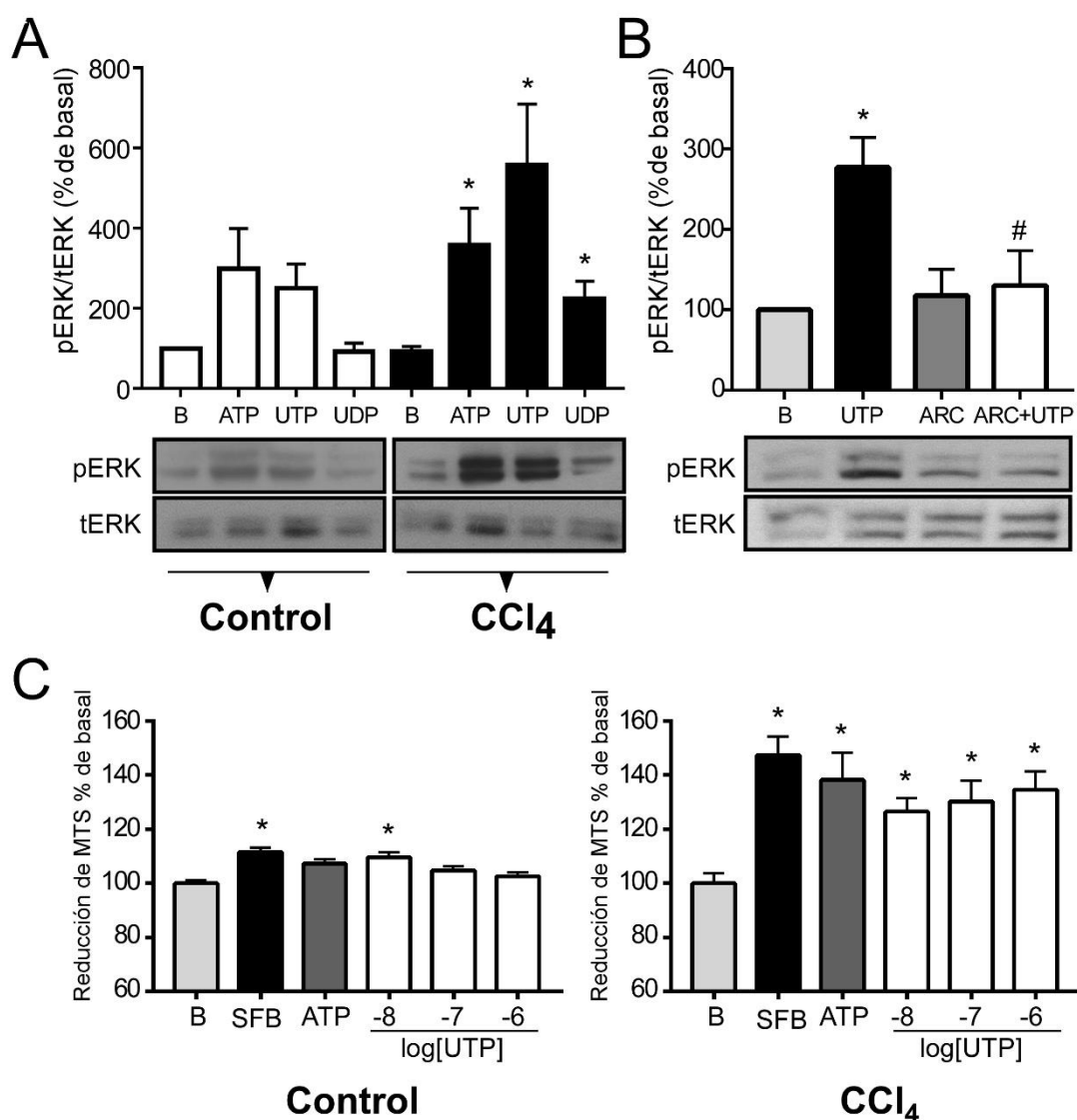


Figura 5. Análisis de la función de P2Y₂R en cultivos primarios de hepatocitos de animales control y fibróticos. A) Inducción de la fosforilación de ERK por agonistas purinérgicos en hepatocitos aislados de animales del grupo control y CCl₄ (n=3 Control y n=4 CCl₄). Los hepatocitos fueron estimulados con ATP, UTP y UDP (100 μM) por 5 min. Se analizaron ERK fosforilada (p-ERK) y ERK total (t-ERK) por Western Blot; se observa la diferencia p-ERK / t-ERK. B) Los hepatocitos del grupo CCl₄ fueron estimulados por 5 min con UTP (100 μM) con o sin 1 μM del antagonista ARC118925 (ARC); pre-incubado 20 min antes del UTP (n=3). C) Reducción de MTS después de la adición de suero fetal bovino (SFB), ATP y UTP en hepatocitos de los grupos Control y CCl₄ (n=5 por grupo). Los hepatocitos fueron aislados y cultivados por 16 h; posteriormente, fueron mantenidos por 3 h en medio libre de SFB. Después, fueron incubados con el estímulo indicado por 24 h. La viabilidad celular fue analizada con el método de la sal de tetrazolio (MTS). Los datos están normalizados con respecto a las células control (mantenidas en medio libre de SFB. * p < 0.05 *t* de Student vs basal, (B) # p < 0.05 *t* de Student vs UTP.

Así, los transcritos modificados en la condición control después de la estimulación con UTP, estaban relacionados con actividades asociadas a mantenimiento celular y vías metabólicas (Figura 6B), mientras que en los hepatocitos fibróticos la estimulación con UTP promovió respuesta mayor en los transcritos relacionados con diferenciación celular y reparación al daño al DNA (Tabla 1, Figura 6C). Estos resultados sugieren que la estimulación purinérgica tiene un efecto transcripcional diferencial en hepatocitos sanos y fibróticos.

Incremento de la respuesta proliferativa en los hepatocitos del grupo CCl₄

Los resultados de los experimentos de MTS indicaron que la señalización purinérgica, a través del P2Y₂R, promueve una posible actividad proliferativa de los hepatocitos; por lo tanto, el análisis de los resultados del microarreglo se enfocó en evaluar si este efecto se podía apreciar desde un nivel transcripcional. Se encontraron varios transcritos relacionados con los procesos de ciclo celular y proliferación, los cuales estaba regulados a la alta en la condición fibrótica y posterior a la estimulación con UTP, como *Rpa3* y *Rbbp5*, los cuales están involucrados con la progresión del ciclo celular, así como *Aatf* y *Zbb17*, relacionados con la inhibición de la muerte celular o la inactivación de inhibidores de la progresión del ciclo celular (Tabla 1).

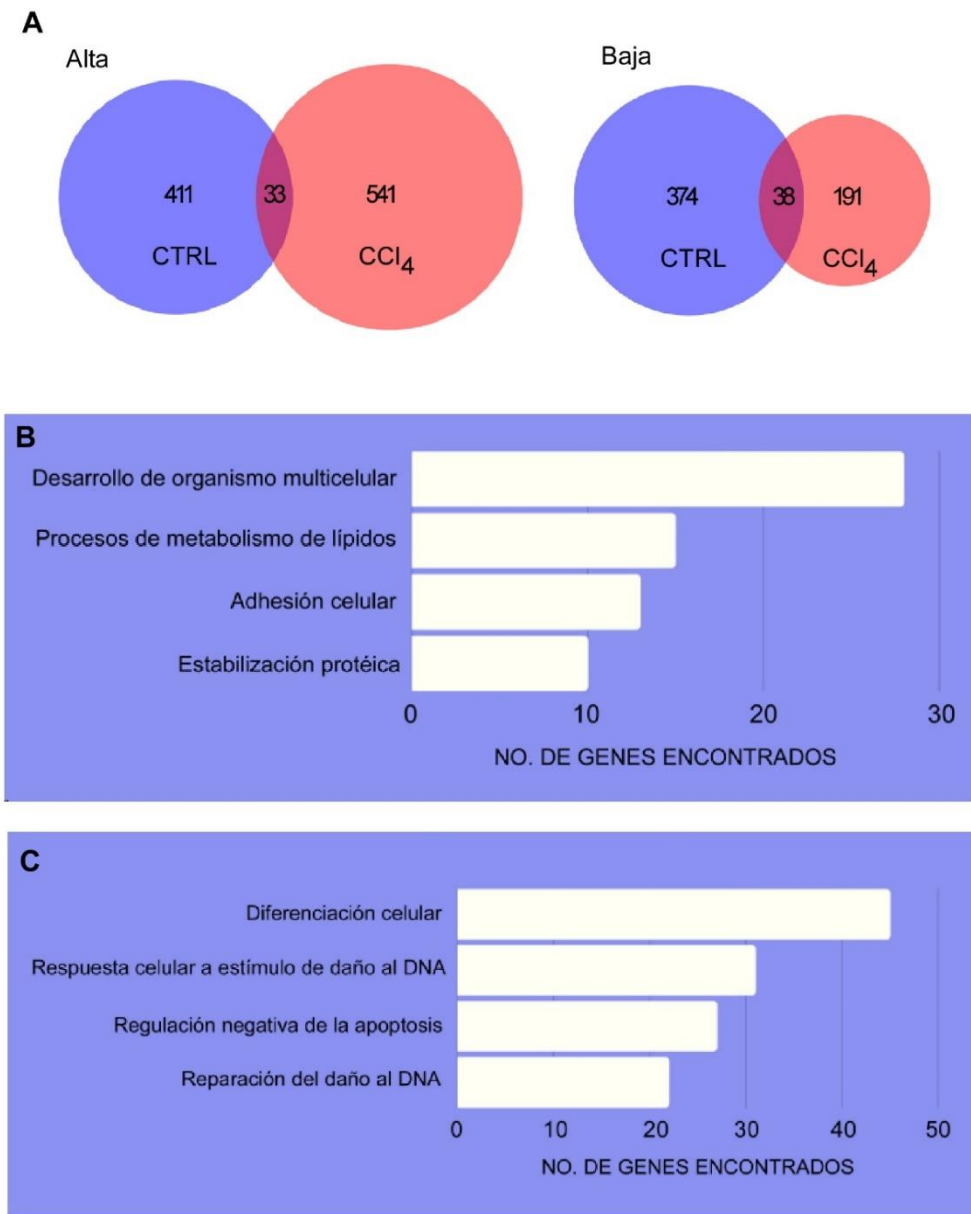


Figura 6. Análisis del patrón de expresión génica con microarreglos de cultivos primarios de hepatocitos estimulados con UTP, aislados de animales control y fibróticos. A) Diagramas de Venn, que representan el número de transcritos que fueron regulados a la alta o a la baja en cada condición, posterior a una estimulación con UTP, con la intersección representando el número de transcritos que cambió en cada condición. B) Histograma que representa los principales términos de ontología génica (GO) enriquecidos en el grupo de VEH y el número de genes encontrados del microarreglo que pertenecían a dicho proceso biológico. C) Histograma que representa los principales términos de GO enriquecidos en el grupo de CCl₄ y el número de genes encontrados del microarreglo que pertenecían a dicho proceso biológico.

Tabla 1. Análisis por ontología génica con la herramienta GeneCodis4 de los principales transcritos y vías de señalización modificados por la estimulación purinérgica en los hepatocitos del grupo CCl₄.

Transcritos regulados a la alta			Transcritos regulados a la baja		
GO:0006281 Reparación del DNA			GO:0045944 Regulación negativa de la transcripción por la RNA polimerasa II		
Símbolo	Z-score	Nombre	Símbolo	Z-score	Nombre
Fbxo18	2.74	F-Box DNA Helicase 1	Traf7	-2.86	TNF Receptor Associated Factor 7
Nthl1	3.06	Nth Like DNA Glycosylase 1	Rbl1	-2.71	RB Transcriptional Corepressor Like 1
Pold4	3.81	DNA Polymerase Delta 4, Accessory Subunit	Cdx4	-2.65	Caudal Type Homeobox 4
Rpa3	5.51	Replication protein A	Nfib	-2.37	Nuclear Factor I B
Eid3	2.87	EP300 Interacting Inhibitor Of Differentiation 3	Setdb1	-2.21	SET Domain Bifurcated Histone Lysine
Smc3	3.05	Structural Maintenance Of Chromosomes 3	Pkig	-2.16	CAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor Gamma
GO:0006974 Respuesta celular al estímulo de daño al DNA			GO:0030336: Regulación negativa de la migración celular		
Símbolo	Z-score	Nombre	Símbolo	Z-score	Nombre
<i>Foxo1</i>	1.72	Forkhead Box O1	<i>Nkx2-1</i>	-2.21	NK2 Homeobox 1
<i>Aatf</i>	3.58	Apoptosis Antagonizing Transcription Factor	<i>Pdgfb</i>	-2.11	Platelet Derived Growth Factor Subunit B
<i>Zfp238</i>	2.27	Zinc Finger And BTB Domain Containing 18	<i>Dach1</i>	-2.06	Dachshund Family Transcription Factor 1
<i>Baz1b</i>	2.52	Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain 1B	<i>Erdr1</i>	-1.94	Erythroid differentiation regulator
<i>Uba6</i>	2.11	Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 6	<i>Arid2</i>	-1.89	AT-Rich Interaction Domain 2
<i>Rbbp5</i>	2.27	RB Binding Protein 5	<i>Rhob</i>	-1.9	Ras Homolog Family Member B

Visualización de datos a través de redes de interacción

Posterior a los primeros resultados obtenidos del microarreglo de los hepatocitos de animales del grupo CCl₄ estimulados con UTP, los datos se analizaron con base en Ontología Génica para observar si los transcritos expresados diferencialmente pertenecían a vías de señalización específicas de alguna función biológica, usando dos plataformas: GeneCodis4 y STRING. Para ello, a través de la herramienta GeneCodis4 se obtuvo la lista de transcritos segmentada por componente celular, de donde se destacaron aquellos transcritos que tuvieran z-score mayor de 2.5 de la fracción de núcleo, los cuales correspondieron con factores de transcripción.

Esta nueva lista, de 56 transcritos, se introdujo a la base de datos de STRING que permitió observar la interacción, predicha o conocida, que las proteínas codificadas por estos transcritos pueden presentar entre ellas (Figura 7).

Además, a través del enriquecimiento funcional en la misma plataforma, se pueden destacar las vías de señalización de acuerdo con la ontología génica (GO) mayormente representadas, entre las cuales se observan: *Respuesta celular al estrés* (GO:0033554) en verde con 13 genes representados, *Respuesta celular a estímulo de daño al DNA* (GO:0006974) en rojo con 9 genes y *Reparación del DNA* (GO: 0006281) en azul con 6 genes (Figura 7). Estos resultados sugieren que la estimulación purinérgica, a través de la activación del P2Y₂R con UTP, podría estar involucrada en el proceso de reparación del daño al DNA, posiblemente con el fin de permitir el avance del ciclo celular y la proliferación.

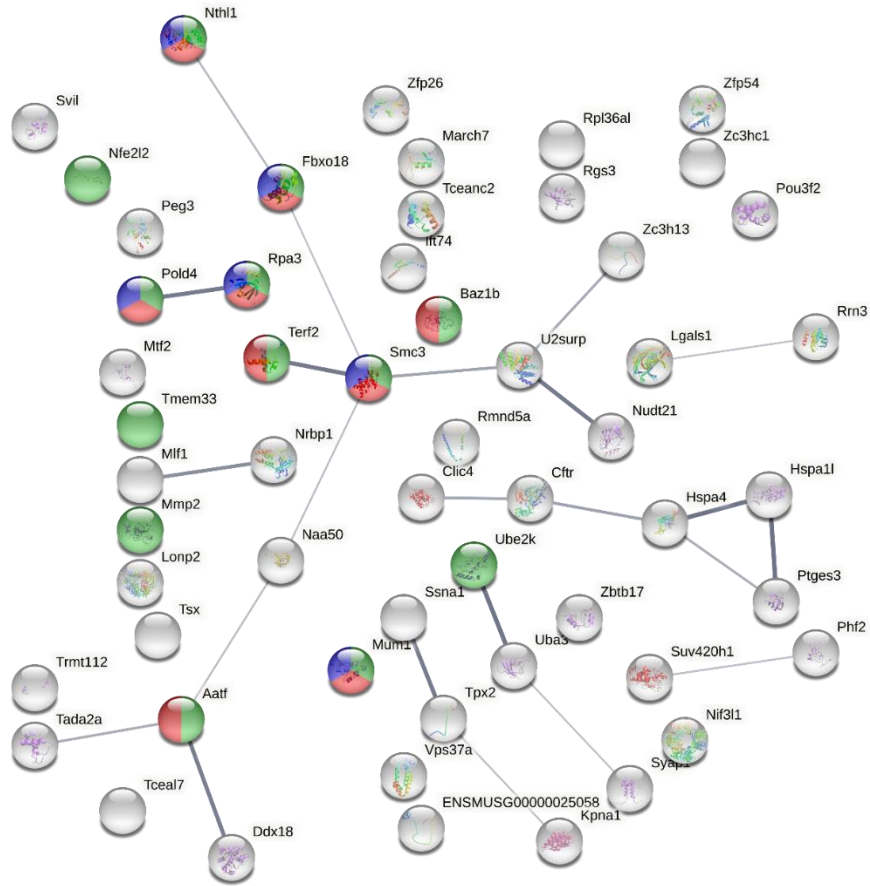


Figura 7. Red de interacción funcional de factores de transcripción con más de 2.5 de z-score del microarreglo de CCl₄ con UTP. Visualización generada por la plataforma STRING del conjunto de 56 transcritos destacados del núcleo como factores de transcripción y que, además, presentaron más de 2.5 de z-score de expresión en el microarreglo de hepatocitos de animales fibróticos estimulados con UTP. El grosor de las líneas representa el grado de interacción predicha entre cada nodo. Se destacan en colores tres vías de señalización por función biológica en términos de ontología génica. En verde: Respuesta celular al estrés (GO:0033554), en rojo: Respuesta celular a estímulo de daño al DNA (GO:0006974) y en azul: Reparación del DNA (GO: 0006281).

Papel del P2Y2R en la reparación del daño al DNA

La evidencia obtenida del análisis de los datos del microarreglo sugería que el P2Y2R está participando en la respuesta de reparación del daño al DNA. Además, los genes que presentaron mayor cambio en su z-score y de los que, además, se observó interacción con el análisis de STRING fueron *Rpa3* y *Pold4* (z-score = 5.51 y 3.81, respectivamente) (Figura 8). Está reportado que estos genes, junto con *Rad51/3* (z-score = 2.09), están asociados a la respuesta de reparación del DNA, específicamente a la reparación dirigida por homología y son particularmente reclutados a la zona de daño por cortes de doble cadena (DSBs) (Lee et al., 2019), y ya se ha descrito que el CCl₄ puede generar diversos tipos de daño al DNA (El-Yamany et al., 2021; Weber et al., 2003).

Dado lo anterior, se llevó a cabo un experimento exploratorio para observar si la estimulación purinérgica podría, en efecto, incidir sobre esta respuesta de reparación, para lo que se utilizó la detección por inmunofluorescencia de la γ -H2AX, la cual, es la forma fosforilada de la histona que H2AX y es reclutada a un sitio de daño al DNA al poco tiempo de la formación de DSBs y participa en la respuesta al daño activando proteínas de reparación (Papież et al., 2015).

En primera instancia se evaluó el daño al DNA generado solamente por el CCl_4 en hepatocitos (Figura 8). Se observó que el hepatotóxico genera daño al DNA como parte del contexto patológico de la fibrosis, pero que no se observa de manera generalizada (Figura 8A y B). Este dato sugiere que, si bien el CCl_4 puede ocasionar daño al DNA, la respuesta de reparación puede ser muy dinámica y no se observa en una ventana de tiempo específica.

Por ello se eligió administrar *in vitro* el fármaco etopósido en condiciones descritas (Ferracchiato et al., 2021; Schnake & Gutiérrez, 2019) ($30 \mu\text{M}$ durante 6 h) para generar un daño puntual al DNA que fuera específico de DSBs y en condiciones controladas para poder evaluar de forma clara directamente en los hepatocitos el efecto de la señalización purinérgica sobre la respuesta de reparación.

La administración de etopósido generó un daño al DNA de forma generalizada que promovió la expresión de la γ -H2AX que se cuantificó como células γ -H2AX+ con respecto al total de células (Figura 8A y B), y que fue significativamente mayor que las condiciones basales del CCl_4 (6.57 ± 1.89 vs 56.06 ± 4.96 % control vs etopósido, respectivamente, $p < 0.0001$).

Cuando se incubaron las células con $100 \mu\text{M}$ de UTP 16 h previas a la exposición al etopósido, se observaron menos células que indicaban presencia de la histona fosforilada con respecto a la condición con etopósido ($25 \pm 3.59\%$, $p = 0.0003$ vs etopósido), un 55.3% de inhibición. Este interesante resultado sugiere que la activación de P2Y2R con UTP tiene un papel en la reparación del daño al DNA, como lo reveló el análisis del microarreglo.

Por otro lado, previamente se había sugerido que en los hepatocitos había expresión del receptor P2Y₄, también sensible a nucleótidos de uridina (Velázquez-Miranda, 2017) y en este trabajo se demostró que el antagonismo del P2Y₂R con ARC bloqueó la respuesta de UTP en hepatocitos fibróticos (Figura 5B). En concordancia, en este experimento se observó que la disminución de células γ -H2AX+ generadas por el etopósido que induce el UTP podía ser bloqueado con el antagonista ARC (Figura 8) de manera significativa (60.45 ± 9.22 %, $p = 0.0008$ vs UTP). Este resultado sugiere que la estimulación con UTP produce una respuesta de reparación mediada de manera específica por la activación del P2Y₂R.

Participación de HIF-1 en la respuesta de reparación del daño al DNA

Con el fin de describir los mecanismos que pueden estar regulando la respuesta observada por UTP en la reparación del daño al DNA, se retomaron los resultados del microarreglo y de manera interesante se detectó la regulación a la alta de los transcritos de ambas subunidades del complejo transcripcional inducido por hipoxia (HIF-1) en el microarreglo de hepatocitos fibróticos estimulados con UTP (z-score =1.5 y 2.28, para las subunidades α y β , respectivamente). Está demostrado que P2Y₂R es blanco del complejo transcripcional de HIF-1 (Kraus et al., 2016) y el resultado del microarreglo sugiere que existe comunicación entre la señalización purinérgica y este factor transcripcional.

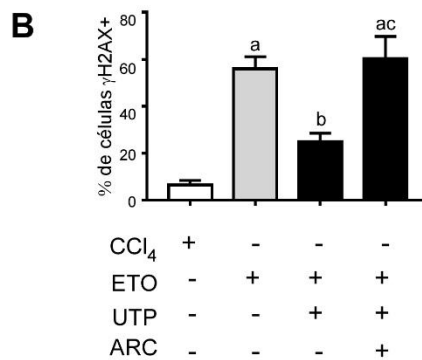
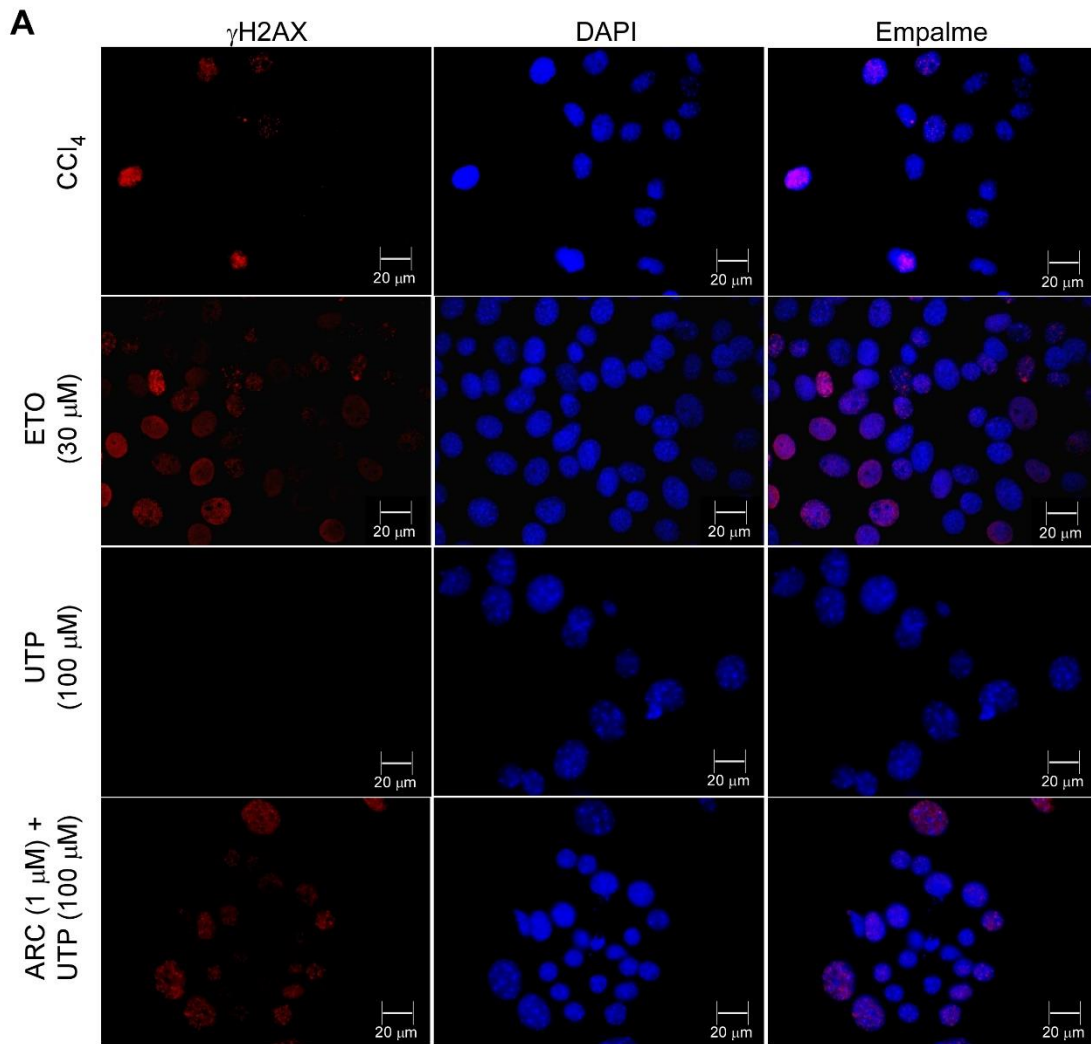


Figura 8. El estímulo con UTP induce la reducción del daño al DNA. A) Imágenes representativas del marcaje por inmunofluorescencia de la fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX), en azul se muestran los núcleos marcados con DAPI y en rojo la γ -H2AX en condiciones basales de hepatocitos de animales del grupo CCl₄ (Control), posterior a la incubación de 6 h con Etopósido (30 μ M), 16 h con UTP (100 μ M) y pre-incubado 1 h con ARC118925 (1 μ M) previo a la incubación con UTP (100 μ M). B) Cuantificación del porcentaje de células γ -H2AX+ con respecto al número total de células por imagen de cada grupo. ANOVA de una vía, a: ETO y UTP+ARC vs Control, $p = 0.0001$; b: UTP vs ETO, $p = 0.0003$; c: UTP vs UTP+ARC, $p = 0.0008$, $n = 20$ por imagen, por grupo.

Como comprobación inicial, se llevó a cabo la detección de la proteína de HIF-1 α por Western Blot, tanto en homogenados de tejido de animales controles y fibróticos y se observó que la expresión de HIF-1 α se encontraba significativamente incrementada en la condición fibrótica comparado con el control (1.007 ± 0.12 vs 1.74 ± 0.18 , $p = 0.0317$, *t de Student*) (Figura 9). Este resultado sugiere la corroboración de lo señalado en el microarreglo, además de que genera una propuesta de regulación de la respuesta observada de UTP. Para observar si el efecto que observamos de respuesta de reparación del daño al DNA posterior a la activación de P2Y2R con UTP, podría estar influenciado por la activación de la vía de HIF-1, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia para detectar la presencia de la γ -H2AX con la activación o inhibición de la vía de HIF-1.

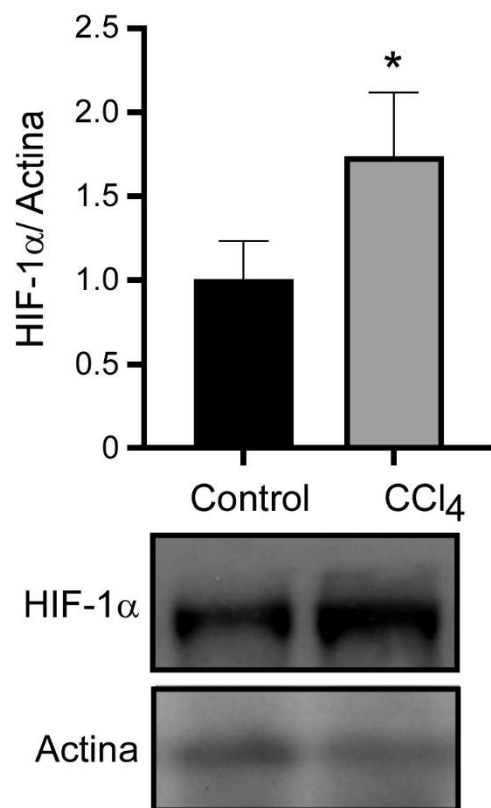


Figura 9. Detección de HIF-1 α por Western Blot en homogenados de hígado de ratones del grupo Control y CCl₄. A) Cuantificación de la expresión de HIF-1 α corregida contra β -actina como proteína constitutiva, * $p < 0.05$, *t de Student*. N=3 y 4, control y CCl₄ respectivamente.

Para la activación de la vía de HIF-1 *in vitro* en hepatocitos provenientes de animales fibróticos, se utilizó el modelo de administración de cloruro de cobalto (CoCl_2) en una concentración de 300 μM . Este compuesto bloquea la degradación de la subunidad HIF-1 α y, por lo tanto, promueve la transcripción de sus genes blanco (Emaogolizadeh Gurd Tapeh et al., 2021). Al incubar con CoCl_2 por 16 h a los hepatocitos fibróticos, previo al reto con etopósido, se observó un patrón de respuesta muy similar al UTP, induciendo la inhibición significativa de 46.4% vs etopósido de la fosforilación de la histona H2AX (26.32 ± 4.53 %, $p = 0.0315$ y $p = 0.0005$ vs Control y etopósido, respectivamente) (Figura 10). Asimismo, este efecto fue bloqueado significativamente con el inhibidor específico del complejo de HIF-1 (HIFi) (44.75 ± 8.72 %, $p = 0.0288$ vs CoCl_2); sin embargo, esta inhibición no bloquea por completo la respuesta de reparación, ya que la expresión de γ -H2AX aún es significativamente diferente de la condición control ($p = 0.009$). Estos datos sugieren que la respuesta de reparación del daño al DNA, observada con la estimulación de UTP, podría estar en parte modulada río arriba por la activación del complejo de HIF-1.

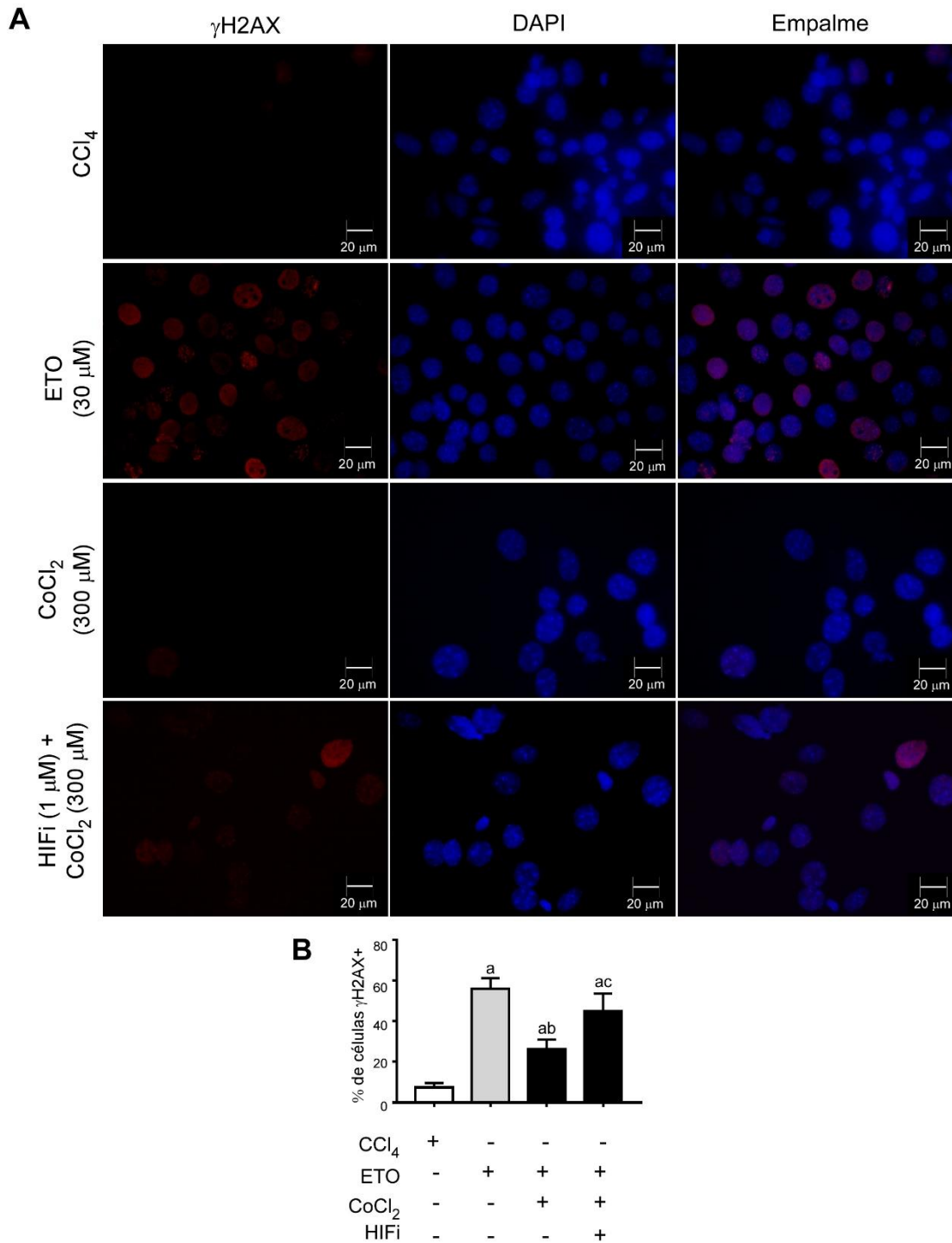


Figura 10. Participación de la activación de HIF-1 en la respuesta de reparación del DNA. A) Imágenes representativas del marcaje de γ -H2AX, en azul se muestran los núcleos marcados con DAPI y en rojo la γ -H2AX en condiciones basales de hepatocitos de animales del grupo CCl₄ (Control), posterior a la incubación de 6 h con Etopósido (30 Mm), 16 h con CoCl₂ (300 μ M) y pre-incubado 1 h con el inhibidor de HIF (HIFi) (1 μ M) previo a la incubación con CoCl₂ (300 μ M). B) Cuantificación del porcentaje de células γ -H2AX+ con respecto al número total de células por imagen de cada grupo. ANOVA de una vía, a: ETO, CoCl₂ y CoCl₂+ HIFi vs Control, $p < 0.0001$, $p = 0.0315$ y $p = 0.009$, respectivamente; b: CoCl₂ vs ETO, $p = 0.0005$; c: CoCl₂ vs CoCl₂+HIFi, $p = 0.0288$, $n = 20$ por imagen, por grupo.

Comunicación cruzada entre las vías de HIF-1 y la señalización purinérgica

Para observar si había un efecto de retroalimentación, ya fuera positiva o negativa, de ambas vías de señalización en la respuesta de reparación del daño al DNA, se llevaron a cabo experimentos con reguladores de la vía de HIF-1 y de P2Y2R. En primera instancia, a hepatocitos provenientes de animales del grupo CCl₄ en cultivo se les administró el inhibidor de la vía de HIF-1, HIFi (1 μ M), 1 h previo a la estimulación del P2Y2R con UTP (100 μ M) por 16 h (Figura 10). De forma interesante, la inhibición del complejo de HIF-1 junto con UTP bloquea por completo el efecto de disminución de células γ -H2AX+ observado sólo con UTP (Figuras 8 y 10) ($59.55 \pm 5.56\%$, $p = 0.0001$ vs Control). Este resultado sugiere que la inhibición de la señalización de HIF impide que la señalización purinérgica, a través de la activación del P2Y2R incida sobre la respuesta de daño al DNA.

Cuando se evaluó la respuesta de la estabilización de HIF usando CoCl₂ y estimulando o antagonizando al P2Y2R, ya sea con UTP o con ARC118925, respectivamente, se observó que el efecto del CoCl₂ era muy similar en ambas condiciones, ya que en ambas disminuyó la cantidad de células γ -H2AX+ significativamente ($15.02 \pm 4.86\%$ y $17.03 \pm 6.96\%$ de HIF+ARC y HIF+UTP, respectivamente, $p = 0.0001$ para ambos vs ETO) (Figura 11). Este resultado sugiere que la manipulación de la activación purinérgica no tiene incidencia sobre la función del complejo HIF-1.

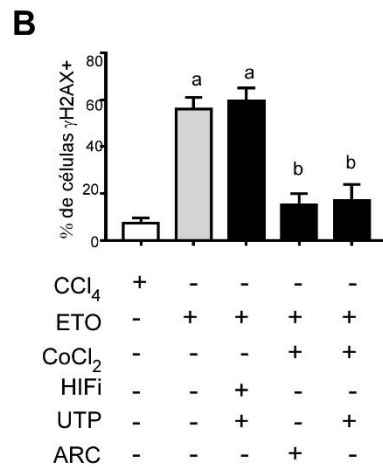
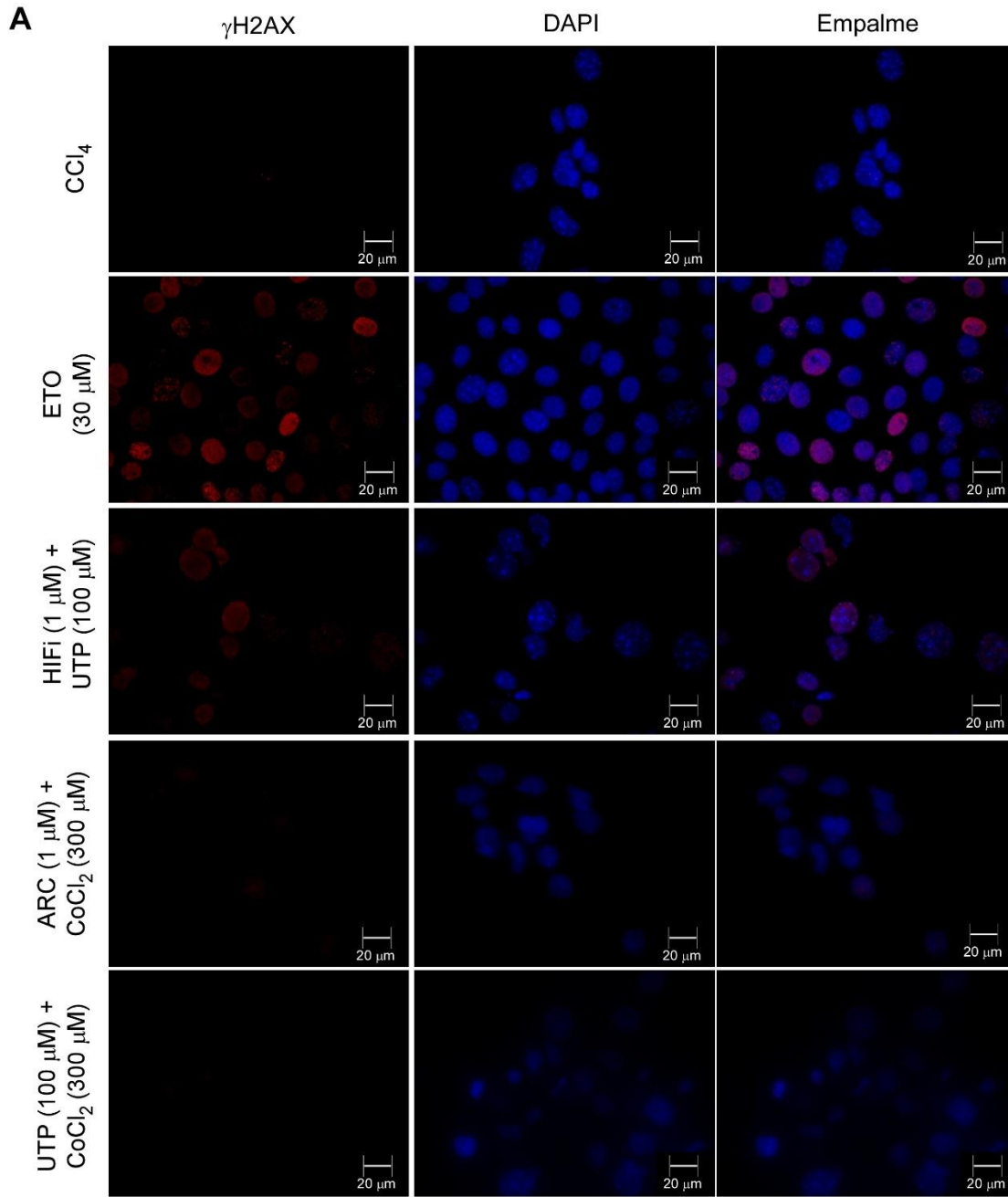


Figura 11. La señalización purinérgica no tiene efecto sobre la acción de HIF. A) Imágenes representativas del marcaje de γ -H2AX, en azul se muestran los núcleos marcados con DAPI y en rojo la γ -H2AX en condiciones basales de hepatocitos de animales del grupo CCl_4 (Control), posterior a la incubación de 6 h con Etopósido ($30 \mu\text{M}$), 16 h con UTP ($100 \mu\text{M}$) pre-incubado 1 h con el inhibidor de HIF (HIFi) ($1 \mu\text{M}$), 16 h con CoCl_2 ($300 \mu\text{M}$) pre-incubado 1 h con el inhibidor de P2Y2R, ARC ($1 \mu\text{M}$) y 16 h de UTP ($100 \mu\text{M}$) pre-incubado 1 h con CoCl_2 ($300 \mu\text{M}$). B) Cuantificación del porcentaje de células γ -H2AX+ con respecto al número total de células por imagen de cada grupo. ANOVA de una vía, a: ETO y HIFi+UTP vs Control, $p < 0.0001$, b: CoCl_2 +ARC y CoCl_2 +UTP vs ETO, $p < 0.0001$, $n = 20$ por imagen, por grupo.

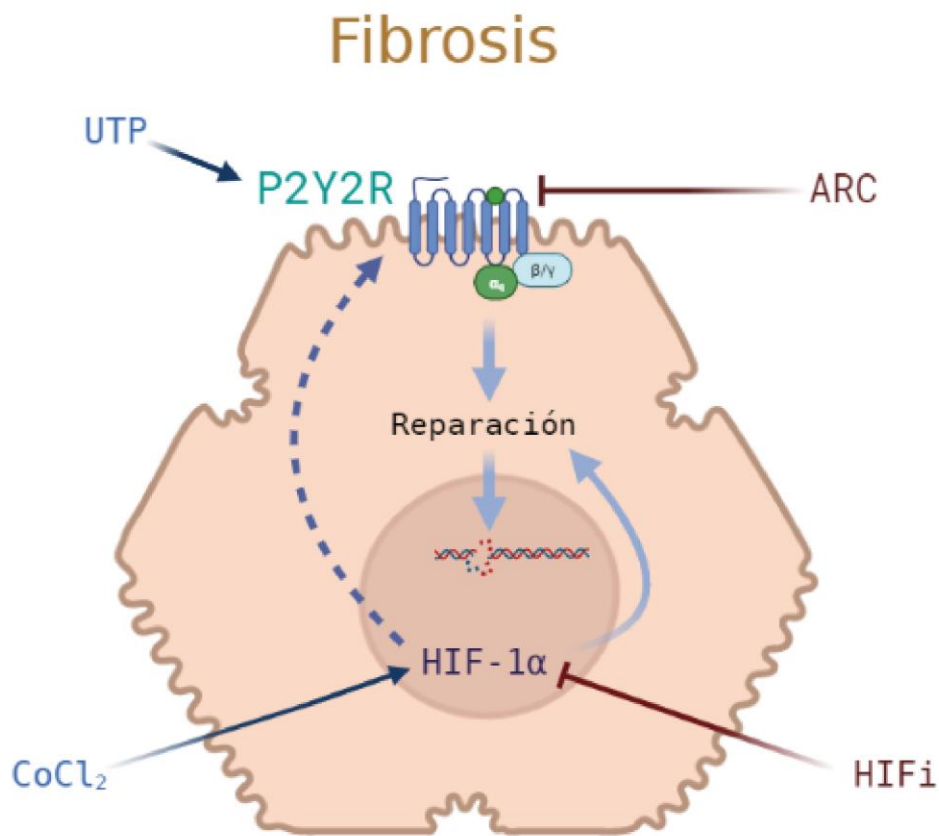


Figura 12. Modelo propuesto de la activación y función del P2Y2R y su relación con el factor transcripcional HIF-1 α en la fibrosis. En el hepatocito dañado, la activación del P2Y2R con UTP induce una aparente respuesta de reparación de DSBs en el DNA. Esta respuesta se inhibe con el uso del antagonista específico del P2Y2R, ARC. Por otra parte, usando CoCl_2 para estabilizar al factor de transcripción HIF-1 α , se induce una respuesta de reparación similar a la de UTP, y se inhibe con el uso de HIFi. Además, este factor de transcripción posiblemente regule la respuesta del P2Y2R, induciendo su transcripción.

Discusión

La fibrosis hepática es una condición patológica que constituye una de las etapas iniciales de la enfermedad hepática crónica la cual deriva en consecuencias clínicas importantes como la cirrosis y el hepatocarcinoma. Existe ya un gran número de evidencias que asocian a la señalización purinérgica con la respuesta de daño tisular en diferentes órganos, incluyendo en hígado (Hoque et al., 2012; Iracheta-Vellve et al., 2015). El ATP, como DAMP, puede ser liberado al espacio extracelular desde células necróticas tanto en daño agudo como crónico, promoviendo respuestas específicas asociadas a los receptores P2 (Ayata et al., 2012; Chatterjee et al., 2012). Aunque se conoce muy bien el mecanismo de acción del ATP a través del P2X7R, aún no son claros los mecanismos moleculares y celulares que son mediados por receptores P2Y en la fibrosis inducida por un daño hepatocelular.

Previamente, nuestro grupo de trabajo describió que en la fibrosis inducida por la administración de CCl₄ por 4 semanas, los receptores P2Y2R y P2Y6R incrementan su nivel de expresión en homogenados de hígado (Velázquez-Miranda, 2017). En el presente trabajo, se reprodujo este modelo animal bien caracterizado de fibrosis hepática (la administración del hepatotóxico CCl₄ por cuatro semanas, cuando la fibrosis aún es reversible) y se evaluaron diversos aspectos celulares inducidos por la activación del P2Y2R.

Antes de discutir los resultados obtenidos referentes al P2Y2R, mencionaremos que la expresión y la función de P2Y6R están exacerbadas en los hepatocitos de hígados fibróticos. Así, el aumento descrito de la expresión del transcrito de *P2yr6* puede relacionarse con el aumento de la respuesta de fosforilación de ERK en respuesta a UDP (Figura 5A), el agonista más potente de este receptor purinérgico (von Kügelgen & Harden, 2011). En cambio, no fue posible detectar la respuesta a UDP en hepatocitos de animales control, correlacionándose con la baja expresión de dicho receptor en condiciones basales (Figura 5A). Algunos reportes han asociado este receptor tanto a una respuesta inflamatoria (Vieira et al., 2011; Warny et al., 2001) como proliferativa, sugiriendo entonces que el P2Y6R también participa en la respuesta al daño en los eventos iniciales del proceso fibrótico, posiblemente a través de la inducción de la proliferación como respuesta adaptativa.

En este trabajo no se evaluó con mayor profundidad el papel de este receptor en la condición de fibrosis hepática; sin embargo, estos resultados generan nuevas avenidas de investigación a este respecto.

Debido a los antecedentes descritos, decidimos enfocar nuestra atención en el P2Y2R, y fue evidente un incremento en la expresión de este receptor en el hígado en la condición fibrótica, lo que fue documentado por diferentes aproximaciones experimentales: 1) qPCR a partir de RNA total aislado de homogenados de hígado; 2) detección por inmunofluorescencia en rebanadas de hígado, donde fue evidente la señal incrementada del P2Y2R en el parénquima hepático y 3) *western blot* en homogenados de hígado. Dado que la señal asociada a este receptor fue visible principalmente en hepatocitos, se llevó a cabo una serie de experimentos en cultivos primarios de este tipo celular.

Para determinar si la mayor expresión de P2Y2R correlacionaban con un aumento en la respuesta celular, se evaluaron tanto la fosforilación de ERK como la viabilidad celular, posterior a la estimulación con diferentes agonistas purinérgicos, incluyendo UTP, en cultivos primarios de hepatocitos, y a pesar de que este ligando es un agonista selectivo tanto para P2Y2R como para P2Y4R, asumimos que los efectos observados fueron inducidos principalmente por P2Y2R, debido a que habíamos descrito que no fue posible detectar el transcrito del *P2ry4* por qPCR en tejido hepático de animales tanto controles como fibróticos (Velázquez-Miranda, 2017). Esto fue confirmado por el hecho de que la preincubación de los cultivos de hepatocitos con el antagonista selectivo del P2Y2R, ARC previene el aumento en la fosforilación de ERK inducido por UTP (Figura 5B).

A partir de las observaciones sobre los niveles de p-ERK podemos afirmar que los receptores purinérgicos en cultivos primarios de hepatocitos de ratón, pueden ser activados por agonistas purinérgicos (ATP, UTP y UDP). No obstante, cuando se evaluó la proliferación en hepatocitos control, no hubo una respuesta estadísticamente significativa usando varias concentraciones de UTP, a excepción de la menor concentración utilizada (10 nM).

Por otra parte, en los hepatocitos provenientes de hígados del grupo CCl₄ que fueron estimulados con UTP (100 μM), la fosforilación de ERK aumentó más de cinco veces comparado con los controles. En estas mismas condiciones, se observó una respuesta proliferativa a todas las concentraciones utilizadas de UTP, lo que podría explicarse por el aumento amplio y homogéneo en la expresión de P2Y2R.

Estos resultados sugieren que los hepatocitos de los animales a los que se les administró CCl₄ están en un estado sensibilizado para la proliferación en respuesta a un estímulo purinérgico. A este respecto, se ha demostrado que la reducción en la expresión de la ectonucleotidasa trifosfato difosfohidrolasa 2 (ENTPD2), la enzima que hidroliza ATP a AMP, facilita la proliferación de otros tipos celulares hepáticos, como las células epiteliales del ducto biliar (Jhandier et al., 2005). Este hallazgo sugiere que el aumento en la disponibilidad de nucleótidos en el espacio extracelular podría activar a los receptores purinérgicos, incluyendo al P2Y2R, y promover la proliferación celular. El P2Y2R está ampliamente expresado en hepatocitos (Beldi et al., 2008); su activación promueve la supervivencia celular durante un proceso inflamatorio asociado a daño hepático agudo (Ayata et al., 2012) y se requiere para la progresión del ciclo celular, a través de la regulación de ciclinas y otros elementos esenciales para la proliferación eficiente de los hepatocitos (Tackett et al., 2014).

Además, se ha demostrado que el P2Y2R contribuye significativamente a los procesos proliferativos y de supervivencia, posteriores a una hepatectomía parcial, pues los hígados de ratones *knockout* para el *P2ry2* presentan una proliferación deficiente en respuesta a la eliminación del 70% del órgano (Graubardt et al., 2013) o a un reto hipóxico (Carini et al., 2006; Tak et al., 2016) en modelos animales de crecimiento hepático. En concordancia con nuestros resultados, en un modelo de carcinogénesis inducido por inyecciones de dietilnitrosamina (DEN), recientemente se describió que en ratones *knockout* para este receptor, el tóxico indujo un menor número de tumores, indicando que la proliferación celular en respuesta a un daño hepático, dependiente de P2Y2R, es relevante para la tumorigénesis hepática (Schulien et al., 2019).

Tomando en consideración nuestros resultados y los datos existentes podemos proponer que en el hígado fibrótico existe una señalización purinérgica exacerbada, ya que se ha documentado que ante diferentes eventos de daño incrementa la concentración de ATP extracelular (Hasuzawa et al., 2021; Kepp et al., 2021).

En el presente trabajo mostramos la expresión incrementada y función exacerbada del P2Y2R. Esta exacerbación purinérgica podría estar contribuyendo a los mecanismos regenerativos al inducir proliferación celular, sin embargo, es posible que cuando el daño es crónico permite la sobrevivencia de células parenquimales que llevan errores en su genoma, lo cual podría contribuir a su vez al establecimiento de las etapas posteriores de la enfermedad crónica hepática

Para un mejor entendimiento de las posibles rutas de información que pudieran estar reguladas por la estimulación del P2Y2R con UTP en una condición fibrótica, utilizamos microarreglos para evaluar las posibles variaciones en los patrones de expresión transcripcional. En estos experimentos se utilizaron hepatocitos aislados de ratones de ambos grupos experimentales y fueron estimulados con UTP 100 μ M por 24 h. El análisis mostró que el UTP promovió patrones transcripcionales distintivos tanto en condiciones control como experimental, revelando diferencias notables en el rol de las purinas en el espacio extracelular y la activación de P2Y2R. Mientras en hepatocitos control se regularon genes principalmente relacionados con procesos metabólicos, en la condición fibrótica, los transcritos que mostraron modificaciones a la alta posterior a la estimulación estaban principalmente relacionados con proliferación y respuestas de reparación del daño al DNA y, por otro lado, a la baja aquellos transcritos involucrados en migración e inhibición de la proliferación.

Estos datos correlacionan con nuestros resultados de los experimentos de MTS, sugiriendo que, durante un estímulo pro-fibrótico, la estimulación purinérgica induce la supresión de señales inhibitorias de la proliferación. Una observación interesante fue la regulación a la baja de transcritos relacionados con la inhibición de la vía de señalización de la migración celular. Está descrito que los procesos de proliferación celular, diferenciación celular y migración son procesos que juegan un importante rol en respuestas de reparación y cicatrización (Aragona et al., 2017). Por tanto, los resultados de este trabajo sugieren que, después de la administración de un hepatotóxico, las células parenquimales muestran una flexibilidad fenotípica incrementada y que la estimulación purinérgica podría inducir proliferación al tiempo que inhiba de la migración, como la intención de preservar la estructura y estado del tejido; sin embargo, es una nota interesante para futuras investigaciones.

Está descrito que la progresión de la enfermedad hepática crónica está íntimamente relacionada con un amplio conjunto de afecciones o daños que incluyen la lipotoxicidad, disfunción mitocondrial, inflamación y estrés celular (Kumar et al., 2021). Además, existen ya varias evidencias que describen que el sistema purinérgico está sobre regulado en el contexto de daño hepático y que su activación está relacionada con el mantenimiento de un ambiente desregulado y patológico (Ayata et al., 2012; Daré et al., 2021; Ezhilarasan, 2021).

Esto último está de acuerdo con otros resultados de este trabajo, donde se observa una mayor respuesta a agonistas purinérgicos en la fosforilación de ERK (Figura 5A), así como la expresión diferencial de los genes que estaban siendo regulados a la alta y a la baja en condiciones fibróticas comparadas con el control (Figura 6A). En conjunto, estos resultados nos sugieren que existe una gran cantidad de procesos patológicos ocurriendo al unísono en el establecimiento de la fibrosis y que este contexto de daño promueve una sensibilización a la estimulación purinérgica y sus funciones consiguientes.

Los datos del microarreglo se introdujeron a la plataforma GeneCodis4, donde se filtraron por localización celular, tomando aquellos que fueran de la fracción nuclear y fueron correlacionados con los que tuvieran un z-score mayor a 2.5. Este nuevo conjunto de 56 transcritos fue introducido a la herramienta de STRING, la cual permite visualizar conjuntos de genes y predecir las interacciones que pueden tener las proteínas, además de permitir el enriquecimiento funcional de vías de señalización de diferentes bases de datos (Szkarczyk et al., 2019).

El resultado más interesante fue la regulación a la alta de transcritos que eran parte de la respuesta de Reparación del daño al DNA (Tabla 1, Figura 6), especialmente los transcritos *Rpa3*, *Pold4* y *Rad51/3*. Tanto la proteína de replicación A (RPA) como la enzima Rad51 son proteínas de unión al DNA, involucradas en la reparación de daño por recombinación homóloga, también llamada reparación dirigida por homología (HDR), asociada a la reparación de cortes de doble cadena (DSBs), específicamente en el proceso conocido como bucle de invasión (*displacement loop*, *D-loop*) (Bhat & Cortez, 2018). Para continuar con este proceso específico de reparación, la polimerasa δ , específicamente la subunidad 4, Pol δ 4, es la encargada de sintetizar un segmento nuevo de DNA con la cadena invadida intacta como base (Lee et al., 2019).

Esto sugiere que el papel de la estimulación purinérgica dentro de la reparación del daño al DNA puede ser parte de la reparación de DSBs por el proceso de HDR, para permitir la replicación y la consecuente proliferación.

A partir de esta información diseñamos experimentos dirigidos a entender si la actividad del P2Y2R está relacionada con los procesos de reparación de DSBs en hepatocitos fibróticos. En estos experimentos evaluamos el efecto de activar o inhibir al P2Y2R sobre la acumulación de la histona H2AX en su forma fosforilada, γ -H2AX, como un indicador de la actividad de la vía. Nuestros experimentos demostraron la participación de la estimulación del P2Y2R con UTP en la reparación del daño, observando un menor número de células γ -H2AX+ en comparación con etopósido (Figura 8).

Esta observación es relevante en el contexto de daño hepatocelular pues se conoce que el hepatotóxico CCl₄, después de generar aldehídos reactivos, puede inducir estrés al DNA y la subsecuente formación de aductos (El-Yamany et al., 2021; Weber et al., 2003), y está descrito que el daño al DNA puede generar la desregulación de la vía de las cinasas inducidas por mitógenos (MAPK), promoviendo inhibición transcripcional (Miras-Portugal et al., 2019). Asimismo, se ha demostrado que aumentar la disponibilidad de ATP, atenuando a la ectonucleotidasa CD39, promueve una respuesta protectora en situación de daño al DNA (Aho et al., 2016). En un modelo de daño por deaferentación sensorial, se ha descrito que algunas poblaciones neuronales comienzan procesos tanto proliferativos como de reparación del daño para permitir la replicación, y se observó que en este contexto incrementan los receptores purinérgicos, sugiriendo un papel de la señalización por purinas en este mecanismo (Illing et al., 2019). Además, la inducción de respuestas al daño de DNA, así como proliferativas, en hepatocitos se ha descrito recientemente usando otro modelo animal, administrando el hepatotóxico DEN (Schulien et al., 2019). Una respuesta reparativa ante un estrés del DNA para evitar la muerte celular puede ser un mecanismo importante por el cual el P2Y2R regule la regeneración de tejido dañado.

Por otro lado, con el fin de describir los mecanismos que pueden estar regulando la respuesta observada por UTP en la reparación del daño al DNA, se retomaron los resultados del microarreglo y entre los transcritos que fueron regulados a la alta por UTP en hepatocitos de hígados fibróticos, se observaron ambas subunidades del complejo HIF-1.

Este factor es atractivo debido a que está bien descrito que el factor de transcripción HIF-1 induce la expresión de genes proliferativos y de supervivencia en condiciones hipóxicas (Ke & Costa, 2006).

Además, es ampliamente reconocido el papel de la hipoxia en daño y reparación del DNA, especialmente en el contexto del cáncer. Está descrito que, de manera aguda, la hipoxia regula vías de señalización de reparación de daño al DNA (Sanada et al., 2021) y en una ventana de mayor tiempo, las vías se desregulan de tal manera que inducen el silenciamiento permanente de algunos genes de reparación del DNA, lo que conlleva a mutaciones cancerígenas (Scanlon & Glazer, 2015).

Como parte de la regulación temprana de HIF-1 de las vías de reparación del DNA puede encontrarse la inducción de la expresión del P2Y2R, ya que existe evidencia de que el P2Y2R es un blanco directo de HIF-1 α (Kraus et al., 2016). En el presente trabajo observamos que el aumento de P2Y2R correlaciona con mayor respuesta ante una estimulación (Figura 5) y una respuesta de reducción de células que presentaban daño al DNA ante el reto con etopósido (Figura 8), por tanto, nos planteamos la hipótesis de que posiblemente existe una relación funcional entre P2Y2R y el factor transcripcional HIF-1.

Esta idea se sustenta en el hecho por la regulación a la alta de los transcritos de las subunidades de HIF-1 así como por la respuestas similares observada de la inducida por UTP y del estabilizador de HIF-1 α , CoCl₂ en la reducción de la fosforilación de la histona H2AX (Figuras 8 y 10). Está ampliamente descrito que, además de algunas características enzimáticas y metabólicas, la disponibilidad de oxígeno es capaz de regular las funciones de los hepatocitos a lo largo del gradiente prooxidante establecido entre la zona periportal altamente oxigenada y la zona pericentral con bajas cantidades de oxígeno disponible (Figura 1) (Kietzmann, 2017).

Para observar si esta comunicación cruzada está presente, se utilizaron agonistas y antagonistas de ambas vías de señalización. De manera interesante, observamos que la inhibición de HIF-1 previene el efecto inhibitorio de la estimulación de P2Y2R con UTP sobre el daño inducido por etopósido (Figura 11). Previamente se ha descrito que tanto un modelo de hipoxia como la regulación a la alta de HIF-1 α , usando plásmidos, inducen la sobreexpresión del P2Y2R (Tak et al., 2016). Nuestros resultados sugieren que HIF-1 participa en la activación del P2Y2R, posiblemente a través de la inducción de su expresión.

Además, encontramos que la activación o antagonismo de P2Y2R no tuvieron efecto en la respuesta de HIF-1 sobre la fosforilación de la histona H2AX (Figura 9). Este resultado, junto con la regulación a la alta de ambas subunidades de HIF-1 observado en el microarreglo con UTP, sugieren que el complejo transcripcional HIF-1 induce un asa de retroalimentación positiva sobre su propia expresión a través del P2Y2R, pero que la activación de este último podría no incidir directamente sobre la función de HIF-1; sin embargo, hacen falta evidencias que permitan dilucidar el mecanismo por el cual podría estar ocurriendo este fenómeno.

Esto sugiere que en etapas tempranas de la enfermedad crónica el P2Y2R puede participar en la reparación del DNA para permitir la replicación y proliferación, lo cual podría coincidir con los efectos tempranos de HIF, y que si estos mecanismos se mantienen generan un contexto de toxicidad e inestabilidad genómica mayor.

Conclusiones

En conjunto, el presente trabajo demuestra que, en el modelo de fibrosis inducida por CCl₄, el agonista específico para el P2Y2R, UTP, aumentó la fosforilación de ERK así como la actividad proliferativa, sugiriendo que un estado exacerbado de la señalización purinérgica, a través del P2Y2R, en un contexto fibrótico podría promover la proliferación celular en el parénquima durante la primer etapa de la enfermedad crónica hepática, como parte de una respuesta regenerativa, y que este papel podría explicar su aumento en esta condición; sin embargo, esta respuesta podría diferir de la fisiológica considerando el contexto de daño y estrés de la fibrosis. Además, la actividad del P2Y2R participa en la respuesta de reparación del daño al DNA, y la descripción de este mecanismo es algo que sin duda abre nuevos caminos de investigación.

Perspectivas

Este trabajo permite generar nuevos caminos de investigación que quedan por explorar. En primer lugar, es importante analizar si el aumento del receptor P2Y6 correlaciona con un aumento en su función y si esta función está relacionada también con vías de reparación de daño al DNA. Por otro lado, es de igual relevancia el evaluar si el efecto de la activación purinérgica por UTP induce un aumento de expresión de HIF y comprobar el efecto sobre su función. Además, hay todavía grandes lagunas de información acerca de los demás receptores P2Y con respecto a la patología hepática que sería interesante atender.

Referencias

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhatsky, A., & Zimmermann, H. (2009). Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.*, *32*(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
- Aho, J., Helenius, M., Vattulainen-Collanus, S., Alastalo, T. P., & Koskenvuo, J. (2016). Extracellular ATP protects endothelial cells against DNA damage. *Purinergic Signalling*, *12*(3), 575–581. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9508-5>
- Aragona, M., Dekoninck, S., Rulands, S., Lenglez, S., Mascré, G., Simons, B. D., & Blanpain, C. (2017). Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. *Nature communications*, *8*, 14684. <https://doi.org/10.1038/ncomms14684>
- Ayata, C. K., Ganal, S. C., Hockenjos, B., Willim, K., Vieira, R. P., Grimm, M., Robaye, B., Boeynaems, J. M., Di Virgilio, F., Pellegatti, P., Diefenbach, A., Idzko, M., & Hasselblatt, P. (2012). Purinergic P2Y₂ receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury. *Gastroenterology*, *143*(6), 1620–1629.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.049>
- Bao, Y., Wang, L., Pan, H., Zhang, T., Chen, Y., Xu, S., Mao, X., & Li, S. (2021). Animal and Organoid Models of Liver Fibrosis. *Frontiers in Physiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.666138>
- Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. En *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 115, Número 2, pp. 209–218). The American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>
- Beldi, G., Wu, Y., Sun, X., Imai, M., Enjoji, K., Csizmadia, E., Candinas, D., Erb, L., & Robson, S. C. (2008). Regulated catalysis of extracellular nucleotides by vascular CD39/ENTPD1 is required for liver regeneration. *Gastroenterology*, *135*(5), 1751–1760. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.025>
- Bhat, K. P., & Cortez, D. (2018). RPA and RAD51: Fork reversal, fork protection, and genome stability. En *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 25, Número 6, pp. 446–453). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0075-z>
- Bravo-Manríquez, M. A. (2020). *Análisis del efecto de la prolactina sobre el crecimiento del hígado del ratón durante el desarrollo postnatal*. UNAM.

- Burnstock. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*, 24(3), 509–581.
- Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. En *Physiological Reviews* (Vol. 87, Número 2, pp. 659–797). *Physiol Rev.*
<https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>
- Burnstock, G. (2016). P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signalling*, 12(1), 59–67. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9493-0>
- Burnstock, G., Vaughn, B., & Robson, S. C. (2014). Purinergic signalling in the liver in health and disease. *Purinergic Signal.*, 10(1), 51–70. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9398-8>
- Burnstock, & Verkhratsky, A. (2010). Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis*, 1, e9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.11>
- Campana, L., Esser, H., Huch, M., & Forbes, S. (2021). Liver regeneration and inflammation: from fundamental science to clinical applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00373-7>
- Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. En *Cells* (Vol. 9, Número 7). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
- Carini, R., Alchera, E., De Cesaris, M. G., Splendore, R., Piranda, D., Baldanzi, G., & Albano, E. (2006). Purinergic P2Y2 receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J. Hepatol.*, 45(2), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.02.017>
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J. M., & Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol*, 8(1), R3. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-1-r3>
- Chatterjee, S., Rana, R., Corbett, J., Kadiiska, M. B., Goldstein, J., & Mason, R. P. (2012). P2X7 receptor-NADPH oxidase axis mediates protein radical formation and Kupffer cell activation in carbon tetrachloride-mediated steatohepatitis in obese mice. *Free Radic. Biol. Med.*, 52(9), 1666–1679. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.010>
- Chaves, M. M., Sinflorio, D. A., Thorstenberg, M. L., Martins, M. D. A., Moreira-Souza, A.

- C. A., Rangel, T. P., Silva, C. L. M., Bellio, M., Canetti, C., & Coutinho-Silva, R. (2019). Non-canonical NLRP3 inflammasome activation and il-1 β signaling are necessary to L. Amazonensis control mediated by P2x7 receptor and leukotriene B4. *PLoS Pathogens*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007887>
- Cheng, D., Chai, J., Wang, H., Fu, L., Peng, S., Ni, X., & Berasain, C. (2021). Hepatic macrophages: Key players in the development and progression of liver fibrosis. *Liver International*. <https://doi.org/10.1111/liv.14940>
- Cordeiro, J. V., & Jacinto, A. (2013). The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(4), 249–262. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847785>
- Daré, B. Le, Ferron, P. J., & Gicquel, T. (2021). The purinergic p2x7 receptor-nlrp3 inflammasome pathway: A new target in alcoholic liver disease? En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 4, pp. 1–13). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22042139>
- Dranoff, J. A., Ogawa, M., Kruglov, E. A., Gaça, M. D. A., Sévigny, J., Robson, S. C., & Wells, R. G. (2004). Expression of P2Y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287(2), G417–424. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00294.2003>
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol. (Lond.)*, 68(3), 213–237.
- Dusabimana, T., Park, E. J., Je, J., Jeong, K., Yun, S. P., Kim, H. J., Kim, H., & Park, S. W. (2021). P2y2r deficiency ameliorates hepatic steatosis by reducing lipogenesis and enhancing fatty acid β -oxidation through ampk and pgc-1 α induction in high-fat diet-fed mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115528>
- El-Yamany, M. F., Zaki, E. S., Shaltout, S. A., & Saad, M. A. (2021). Bone marrow mononuclear cells boosts anti-cytogenetical aberration effect of N-acetylcysteine and α -lipoic acid in rat's liver and bone marrow: implication of oxidative and inflammatory

pathways. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31(6), 437–449.

<https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1906370>

Emaogolizadeh Gurd Tapeh, B., Mohammadi, A., Alivand, M. R., & Solali, S. (2021). Effect of Mimic Hypoxia on the Proliferation and Expression of miR-27a, miR-9, miR-370 and their Target Genes in MOLT-4 and KG1a Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(6), 1975–1984.

<https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.6.1975>

Ezhilarasan, D. (2021). Hepatotoxic potentials of methotrexate: Understanding the possible toxicological molecular mechanisms. *Toxicology*, 458, 152840.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152840>

Ferracchiato, S., Di-Iacovo, N., Scopetti, D., Piobbico, D., Castelli, M., Pieroni, S., Gargaro, M., Manni, G., Brancorsini, S., Della-Fazia, M. A., & Servillo, G. (2021). Hops/Tmub1 Heterozygous Mouse Shows Haploinsufficiency Effect in Influencing p53-Mediated Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7186.

<https://doi.org/10.3390/ijms22137186>

Graubardt, N., Fahrner, R., Trochsler, M., Keogh, A., Breu, K., Furer, C., Stroka, D., Robson, S. C., Slack, E., Candinas, D., & Beldi, G. (2013). Promotion of liver regeneration by natural killer cells in a murine model is dependent on extracellular adenosine triphosphate phosphohydrolysis. *Hepatology*, 57(5), 1969–1979.

<https://doi.org/10.1002/hep.26008>

Hasuzawa, N., Tatsushima, K., Tokubuchi, R., Kabashima, M., & Nomura, M. (2021).

VNUT is a therapeutic target for type 2 diabetes and NASH. *Yakugaku Zasshi*, 141(4), 517–526. <https://doi.org/10.1248/YAKUSHI.20-00204-4>

Hernández-Muñoz, R., Díaz-Muñoz, M., Suárez-Cuenca, J. A., Trejo-Solís, C., López, V., Sánchez-Sevilla, L., Yáñez, L., & De Sánchez, V. C. (2001). Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology*, 34(4 Pt 1), 677–687.

<https://doi.org/10.1053/jhep.2001.27949>

Holton, F. A., & Holton, P. (1954). The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J. Physiol. (Lond.)*, 126(1), 124–140.

- Hoque, R., Sohail, M. A., Salhanick, S., Malik, A. F., Ghani, A., Robson, S. C., & Mehal, W. Z. (2012). P2X7 receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, *302*(10), G1171–1179. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00352.2011>
- Illing, R. B., Buschky, H., & Tadic, A. (2019). Mitotic activity, modulation of DNA processing, and purinergic signalling in the adult rat auditory brainstem following sensory deafferentation. *European Journal of Neuroscience*, *50*(12), 3985–4003. <https://doi.org/10.1111/ejn.14521>
- Iracheta-Vellve, A., Petrasek, J., Satishchandran, A., Gyongyosi, B., Saha, B., Kodys, K., Fitzgerald, K. A., Kurt-Jones, E. A., & Szabo, G. (2015). Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Hepatol.*, *63*(5), 1147–1155. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.013>
- Iredale, J. P., Thompson, A., & Henderson, N. C. (2013). Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1832*(7), 876–883. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.002>
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T. J., Park, T. J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y. H., Meng, F., Asagiri, M., Murray, L. A., Hofmann, A. F., Iida, T., Glass, C. K., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1400062111>
- Jhandier, M. N., Kruglov, E. A., Lavoie, E. G., Sévigny, J., & Dranoff, J. A. (2005). Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J. Biol. Chem.*, *280*(24), 22986–22992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412371200>
- Kanellopoulos, J. M., Almeida-da-Silva, C. L. C., Rützel Boudinot, S., & Ojcius, D. M. (2021). Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.645834>
- Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.*, *70*(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>

- Kepp, O., Bezu, L., Yamazaki, T., Di Virgilio, F., Smyth, M. J., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2021). ATP and cancer immunosurveillance. *The EMBO Journal*.
<https://doi.org/10.15252/emboj.2021108130>
- Khanam, A., Saleeb, P. G., & Kottlilil, S. (2021). Pathophysiology and Treatment Options for Hepatic Fibrosis: Can It Be Completely Cured? *Cells*, *10*(5), 1097.
<https://doi.org/10.3390/cells10051097>
- Kietzmann, T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol*, *11*, 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.012>
- Kraus, A., Grampp, S., Goppelt-Struebe, M., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Peters, D. J. M., Leipziger, J., Schley, G., Schödel, J., Eckardt, K.-U., & Buchholz, B. (2016). P2Y2R is a direct target of HIF-1 α and mediates secretion-dependent cyst growth of renal cyst-forming epithelial cells. *Purinergic Signal.*, *12*(4), 687–695.
<https://doi.org/10.1007/s11302-016-9532-5>
- Kumar, S., Duan, Q., Wu, R., Harris, E., & Su, Q. (2021). Pathophysiological Communication between Hepatocytes and Non-Parenchymal Cells in Liver Injury from NAFLD to Liver Fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 113869.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113869>
- Lee L, B. H. (1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. En *American Registry of Pathology* (3rd edition, Vol. 3, p. 258). McGraw-Hill Book Company.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516394107>
- Lee, M. Y. W. T., Zhang, S., Wang, X., Chao, H. H., Zhao, H., Darzynkiewicz, Z., Zhang, Z., & Lee, E. Y. C. (2019). Two forms of human DNA polymerase δ : Who does what and why? En *DNA Repair* (Vol. 81). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102656>
- Martínez-Ramírez, A. S., Díaz-Muñoz, M., Battastini, A. M., Campos-Contreras, A., Olvera, A., Bergamin, L., Glaser, T., Jacintho Moritz, C. E., Ulrich, H., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2017). Cellular Migration Ability Is Modulated by Extracellular Purines in Ovarian Carcinoma SKOV-3 Cells. *J. Cell. Biochem.*, *118*(12), 4468–4478.
<https://doi.org/10.1002/jcb.26104>
- McGavin MD, Carlton WW, & Zachary JF. (2001). *Thomson's special veterinary pathology*

(3rd edition). Mosby Publication.

- Mederacke, I., Dapito, D. H., Affò, S., Uchinami, H., & Schwabe, R. F. (2015). High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc*, *10*(2), 305–315. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.017>
- Miras-Portugal, M. T., Queipo, M. J., Gil-Redondo, J. C., Ortega, F., Gómez-Villafuertes, R., Gualix, J., Delicado, E. G., & Pérez-Sen, R. (2019). P2 receptor interaction and signalling cascades in neuroprotection. En *Brain Research Bulletin* (Vol. 151, pp. 74–83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.12.012>
- Mortezaee, K., Sabbaghziarani, F., Omid, A., Dehpour, A. R., Omid, N., Ghasemi, S., Pasbakhsh, P., & Ragerdi Kashani, I. (2016). Therapeutic value of melatonin post-treatment on CCl4-induced fibrotic rat liver. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *94*(2), 119–130. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0266>
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. En *Apoptosis* (Vol. 26, Números 3–4, pp. 152–162). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
- Nayagam, D. A. X., McGowan, C., Villalobos, J., Williams, R. A., Salinas-LaRosa, C., McKelvie, P., Lo, I., Basa, M., Tan, J., & Williams, C. E. (2013). Techniques for processing eyes implanted with a retinal prosthesis for localized histopathological analysis. *Journal of visualized experiments : JoVE*, *78*. <https://doi.org/10.3791/50411>
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J. M., & Pascual-Montano, A. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Research*, *37*(Web Server), W317–W322. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp416>
- Novo, E., Cannito, S., Morello, E., Paternostro, C., Bocca, C., Miglietta, A., & Parola, M. (2015). Hepatic myofibroblasts and fibrogenic progression of chronic liver diseases. *Histol. Histopathol.*, *30*(9), 1011–1032. <https://doi.org/10.14670/HH-11-623>
- Oliveira-Giacomelli, Á., Petiz, L. L., Andrejew, R., Turrini, N., Silva, J. B., Sack, U., & Ulrich, H. (2021). Role of P2X7 Receptors in Immune Responses During Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.662935>

- Papież, M. A., Krzyściak, W., Wąsik, M., & Papież, M. (2015). *Inhibition of myeloperoxidase activity have impact on the formation of DNA double-strand breaks induced by etoposide in HL-60 cell line.*
- Parola, M., & Pinzani, M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. En *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 65, pp. 37–55). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>
- Perez, I., Bolte, F. J., Bigelow, W., Dickson, Z., & Shah, N. L. (2021). *Step by Step: Managing the Complications of Cirrhosis.* <https://doi.org/10.2147/HMER.S278032>
- Pietrowski, M. J., Gabr, A. A., Kozlov, S., Blum, D., Halle, A., & Carvalho, K. (2021). Glial Purinergic Signaling in Neurodegeneration. *Frontiers in Neurology*, 12, 654850. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.654850>
- Rafehi, M., Burbiel, J. C., Attah, I. Y., Abdelrahman, A., & Müller, C. E. (2017). Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y2 receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic signalling*, 13(1), 89–103. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9542-3>
- Sakamoto, S., Miyaji, T., Hiasa, M., Ichikawa, R., Uematsu, A., Iwatsuki, K., Shibata, A., Uneyama, H., Takayanagi, R., Yamamoto, A., Omote, H., Nomura, M., & Moriyama, Y. (2014). Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep06689>
- Sanada, Y., Takata, T., Tanaka, H., Sakurai, Y., Watanabe, T., Suzuki, M., & Masunaga, S. (2021). HIF-1 α affects sensitivity of murine squamous cell carcinoma to boron neutron capture therapy with BPA. *International Journal of Radiation Biology*, 1–24. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1956004>
- Santana, P. T., Martel, J., Lai, H. C., Perfettini, J. L., Kanellopoulos, J. M., Young, J. D., Coutinho-Silva, R., & Ojcius, D. M. (2016). Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? En *Microbes and Infection* (Vol. 18, Número 2, pp. 93–101). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.10.007>
- Scanlon, S. E., & Glazer, P. M. (2015). Multifaceted control of DNA repair pathways by the hypoxic tumor microenvironment. *DNA Repair*, 32, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.030>

- Schnake, N., & Gutiérrez, S. (2019). Etoposide-induced DNA damage in a chromosomal breakpoint of RUNX1 gene is independent of RUNX1 expression. *Leukemia Research Reports*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2019.100182>
- Schulien, I., Hockenjos, B., van Marck, V., Ayata, C. K., Follo, M., Thimme, R., & Hasselblatt, P. (2019). Extracellular ATP and purinergic P2Y2 receptor signaling promote liver tumorigenesis in mice by exacerbating DNA damage. *Cancer Research*, canres.1909.2019. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-19-1909>
- Sharma, A., & Nagalli, S. (2021). *Chronic Liver Disease*. StatPearls. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119484/>
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., Bork, P., Jensen, L. J., & Von Mering, C. (2019). STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., & Pascual-Montano, A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W478–W483. <https://doi.org/10.1093/nar/gks402>
- Tackett, B. C., Sun, H., Mei, Y., Maynard, J. P., Cheruvu, S., Mani, A., Hernandez-Garcia, A., Vigneswaran, N., Karpen, S. J., & Thevananther, S. (2014). P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 307(11), G1073–1087. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00092.2014>
- Tak, E., Jun, D. Y., Kim, S.-H., Park, G.-C., Lee, J., Hwang, S., Song, G.-W., & Lee, S.-G. (2016). Upregulation of P2Y2 nucleotide receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Int. Med. Res.*, 44(6), 1234–1247. <https://doi.org/10.1177/0300060516662135>
- Thevananther, S., Sun, H., Li, D., Arjunan, V., Awad, S. S., Wyllie, S., Zimmerman, T. L., Goss, J. A., & Karpen, S. J. (2004). Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology*, 39(2), 393–402. <https://doi.org/10.1002/hep.20075>
- Trefts, E., Gannon, M., & Wasserman, D. H. (2017). The liver. En *Current Biology* (Vol. 27, Número 21, pp. R1147–R1151). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>

- Vázquez-Cuevas, F. G., Cruz-Rico, A., Garay, E., García-Carrancá, A., Pérez-Montiel, D., Juárez, B., & Arellano, R. O. (2013). Differential expression of the P2X7 receptor in ovarian surface epithelium during the oestrous cycle in the mouse. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(7), 971–984. <https://doi.org/10.1071/RD12196>
- Vázquez-Cuevas, Zárate-Díaz, E., Garay, E., & Arellano, R. (2010). Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 8, 88. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-88>
- Velázquez-Miranda, E. (2017). *Comunicación celular mediada por nucleótidos en la fibrosis hepática*. UNAM.
- Verkhatsky, A., & Burnstock, G. (2014). Biology of purinergic signalling: Its ancient evolutionary roots, its omnipresence and its multiple functional significance. *BioEssays*, 36(7), 697–705. <https://doi.org/10.1002/bies.201400024>
- Vieira, R. P., Müller, T., Grimm, M., von Gernler, V., Vetter, B., Dürk, T., Cicko, S., Ayata, C. K., Sorichter, S., Robaye, B., Zeiser, R., Ferrari, D., Kirschbaum, A., Zissel, G., Virchow, J. C., Boeynaems, J.-M., & Idzko, M. (2011). Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 184(2), 215–223. <https://doi.org/10.1164/rccm.201011-1762OC>
- von Kügelgen, I., & Harden, T. K. (2011). Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv. Pharmacol.*, 61, 373–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00012-6>
- Wang, P., Jia, J., & Zhang, D. (2020). Purinergic signalling in liver diseases: Pathological functions and therapeutic opportunities. En *JHEP Reports* (Vol. 2, Número 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100165>
- Warny, M., Aboudola, S., Robson, S. C., Sévigny, J., Communi, D., Soltoff, S. P., & Kelly, C. P. (2001). P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 276(28), 26051–26056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102568200>
- Weber, L. W. D., Boll, M., & Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. En *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 33, Número 2, pp. 105–136). CRC Press LLC.

<https://doi.org/10.1080/713611034>

- Wei, L., Mousawi, F., Li, D., Roger, S., Li, J., Yang, X., & Jiang, L. H. (2019). Adenosine triphosphate release and P2 receptor signaling in Piezo1 channel-dependent mechanoregulation. *Frontiers in Pharmacology*, *10*.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01304>
- Woo, K., Sathe, M., Kresge, C., Esser, V., Ueno, Y., Venter, J., Glaser, S. S., Alpini, G., & Feranchak, A. P. (2010). Adenosine triphosphate release and purinergic (P2) receptor-mediated secretion in small and large mouse cholangiocytes. *Hepatology*, *52*(5), 1819–1828. <https://doi.org/10.1002/hep.23883>
- Xie, R., Xu, J., Wen, G., Jin, H., Liu, X., Yang, Y., Ji, B., Jiang, Y., Song, P., Dong, H., & Tuo, B. (2014). The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(27), 19137–19149.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540047>
- Xu, J., Liu, X., Koyama, Y., Wang, P., Lan, T., Kim, I. G., Kim H., I. H., Ma, H. Y., & Kisseleva, T. (2014). The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. En *Frontiers in Pharmacology: Vol. 5 JUL*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00167>
- Zhang, W., Gou, P., Dupret, J.-M., Chomienne, C., & Rodrigues-Lima, F. (2021). Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Translational Oncology*, *14*(10), 101169.
<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101169>
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell discovery*, *6*(1), 36.
<https://doi.org/10.1038/s41421-020-0167-x>
- Zimmermann, H., Mishra, S. K., Shukla, V., Langer, D., Gampe, K., Grimm, I., Delic, J., & Braun, N. (2007). Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An. R. Acad. Nac. Farm*, *31*.

Anexos

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Velázquez-Miranda E, Díaz-Muñoz M & Vázquez-Cuevas FG. 2019. Purinergic signaling in hepatic disease. *Purinergic Signal*. DOI: 10.1007/s11302-019-09680-3.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN ORIGINAL

Velázquez-Miranda E, Molina-Aguilar C, González-Gallardo A, Vázquez-Martínez O, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Increased Purinergic Responses Dependent on P2Y2 Receptors in Hepatocytes from CCl4-Treated Fibrotic Mice. *Int J Mol Sci*. DOI: 10.3390/ijms21072305.



Purinergic signaling in hepatic disease

E. Velázquez-Miranda¹ · M. Díaz-Muñoz¹ · F. G. Vázquez-Cuevas¹

Received: 25 May 2019 / Accepted: 2 September 2019 / Published online: 1 October 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Extracellular purines (ATP and adenosine) are ubiquitous intercellular messengers. During tissular damage, they function as damage-associated molecular patterns (DAMPs). In this context, purines announce tissue alterations to initiate a reparative response that involve the formation of the inflammasome complex and the recruitment of specialized cells of the immune system. The present review focuses on the role of the purinergic system in liver damage, mainly during the onset and development of fibrosis. After hepatocellular injury, extracellular ATP promotes a signaling cascade that ameliorates tissue alterations to restore the hepatic function. However, if cellular damage becomes chronic, ATP orchestrates an aberrant reparative process that results in severe liver diseases such as fibrosis and cirrhosis. ATP and adenosine, their receptors, and extracellular ectonucleotidases are mediators of unique processes that will be reviewed in detail.

Keywords Purinergic receptors · Ectonucleotidases · Liver · Fibrosis · Inflammation

Chronic hepatic diseases

Functional and cellular organization of the liver

The liver is one of the most active organs from a metabolic perspective. It is the only organ that can put together all the elements required to form purine and pyrimidine rings and then send them into the bloodstream to be used by other organs as energetic and signaling molecules [1]. In humans, the liver receives almost 30% of the blood supply and consumes one fifth of the available O₂. The liver also plays immunological roles because it is essential to set an innate body defense during acute illnesses [2]. It has been said that the primary function of the hepatic tissue was immunological and that the biochemical role in the integration of intermediary metabolism evolved during further specialization [3].

Many functions of the liver are related to the metabolic conversions of nutrients and vitamins and the processing of xenobiotics [4]. Hepatic biochemical activities include glyco-gen metabolism and gluconeogenesis; synthesis of fatty acids,

triacylglycerols, phospholipids, and bile acids; synthesis, secretion, and transformation of lipoproteins; ketogenesis; synthesis of albumin, blood clotting factors such as angiotensinogen, metal-handling proteins, apolipoproteins, and IGF-1; NH₄⁺-handling by urea and glutamine; and endocytic protection (removal of bacteria and endotoxins by Kupffer cells).

The histological unit of the liver is the lobule. It is delimited by a central vein surrounded by six portal triads; each portal triad is formed by a branch of the portal vein, a branch of the hepatic artery, and a bile ductule. Portal triads and the central vein are connected by cords of hepatocytes; interestingly, the metabolic capabilities of the periportal hepatocytes are different from the ones shown by the pericentral hepatocytes. This metabolic zonation is caused by the O₂ gradient that is established along the lobule, being the metabolic networks more oxidative in the periportal hepatocytes and more reductive in the pericentral hepatocytes [5]. Liver cell plates are divided by sinusoids, which are demarcated by endothelial cells. Within the sinusoids are resident macrophages known as Kupffer cells (KCs). There is a subendothelial region between the hepatocyte cords and the sinusoids, called Disse space. In this region, a non-parenchymal cell population, known as hepatic stellate cells (HSCs), can be found. HSCs are responsible for fibrogenic responses in the liver [6].

The liver is a complex organ that functions by the coordinated action of a variety of cell types [7]: (1) hepatocytes, which are the main parenchymal cells in the liver, constitute

✉ F. G. Vázquez-Cuevas
fvazquez@comunidad.unam.mx;
fvazquezc132005@yahoo.com.mx

¹ Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, C.P. 76230 Juriquilla, Querétaro, México

~80% of the hepatic mass. Hepatocytes perform the principal metabolic activities of the liver. (2) Biliary epithelial cells, also known as cholangiocytes, are parenchymal cells that form the bile ducts. The intrahepatic biliary tract contains the bile canaliculi and the canals of Hering, whereas the extracellular biliary tract is composed of the gallbladder and the cystic duct. (3) HSCs, also known as lipocytes or Ito cells, are liver pericytes that present two phenotypes: a quiescent vitamin A-storing cell and an activated myofibroblast-like cell that is responsible for collagen deposition in situations of liver damage. (4) KCs, which are hepatic macrophages lining the walls of the sinusoids, and promote a pro-oxidant and inflammatory response that turns the HSCs into the collagen-forming phenotype that eventually leads to fibrosis. (5) Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), which form a permeable barrier acting as an interface between blood cells, HSCs, and hepatocytes, have a very high endocytic capacity. (6) Pit cells, which are lymphoid entities located in the portal region, are crucial during liver inflammation and fibrogenesis. (8) Oval cells, which are adult stem cells derived from activated hepatic progenitor cells located in the terminal bile ducts, can differentiate into hepatocytes and cholangiocytes. Oval cell activation can be triggered in situations of severe liver injury such as in cirrhosis.

Liver pathology

The liver is a very plastic organ that is capable of showing discrete cellular turnover under circadian regulation and an exceptional regenerative potential in response to surgical hepatectomy (complete tissue renewal after 8 days of 2/3 hepatectomy in rodents). During this process, extracellular matrix molecules orchestrated by Ito cells play a key role in reestablishing the normal vascular structure of the liver [8]. However, the liver is also susceptible to suffering pathological alterations, as well as metabolic and endocrine disturbances by the action of drugs, environmental factors, and microorganisms. Given its regenerative potential, the liver can overcome acute damage in many circumstances; however, chronic injuries can promote homeostatic disequilibrium that leads to chronic hepatic diseases such as inflammation (hepatitis), fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (Fig. 1).

Inflammation This entity comprises several associated complex biological processes by which the tissues respond to harmful or pathogenic stimuli. The pro-inflammatory agents can be intrinsic (DNA damage, pro-oxidant reactions, metabolic deregulation) or extrinsic (pathogens, irritants). Inflammation can be related to molecular instabilities causing cellular damage or damage-associated molecular patterns (DAMPs), molecular patterns associated with microbes (MAMPs), or other pathogens (PAMPs) [9]. Inflammasomes will be addressed later.

Fibrosis Unlike other organs and tissues, the liver lacks a proper basement membrane and its histological organization, based on the configuration of the Disse space, is suited to facilitate the rapid bidirectional exchange between plasma and the hepatocytes. This specialization is achieved by the abundant fenestrations and gaps of the sinusoidal endothelial cells and an extracellular matrix mostly consisting of fibronectin, some collagen type 1, and minor quantities of collagen types III to VI [10]. Due to repetitive injuries, either by drugs, virus, or stressful metabolic conditions, the regenerative capacity of the liver becomes compromised. At early phases, little to mild hepatic damage occurs. However, as the cellular damage continues, so does a disorder of the extracellular matrix known as scarring or fibrosis. This condition can be reversed if the cause(s) stop before too much tissue alteration occurs [11].

Cirrhosis If the scarring process continues over time, fibrosis becomes permanent. The histological deformation becomes more evident with the formation of thick collagen bands (fibrous septa) throughout the liver, involving dynamic changes in matrix stiffness, flexibility, and density. The regenerative ability of the liver is obliterated, and hepatic function is severely compromised; this state is called cirrhosis. The cirrhotic liver shows profound alterations in the structure of the extracellular matrix: (1) exacerbated elevation of elastin and reduced collagen I and III content; (2) collagen VI forms branched filamentous networks by the enhanced expression of protein COL6A1; (3) a basement membrane formed by basal lamina appears, disrupting the exchange of factors and metabolites between hepatocytes and the plasma; and (4) endothelial fenestration is lost [11]. On the onset and establishment of cirrhosis, HSCs play a preponderant role: because of the presence of inflammatory cytokines, oxidative stress, and growth factors, the retinoid-containing quiescent HSCs become transdifferentiated into activated myofibroblasts. Vitamin A deposits are greatly reduced, whereas the expression of α -smooth muscle actin is importantly enhanced. Myofibroblasts promote fibrogenesis (by transforming growth factor- β 1 [TGF- β 1] and CTGF), matrix restructuring (by MMP-2 and 9, and TIMP-1 and 2), leukocyte chemoattraction (by MCP-1), cytokine secretion, Ito cell chemotaxis (by PDGF), and hepatocyte proliferation [12].

Hepatocellular carcinoma It is a primary malignancy of the liver that is usually the culmination of a previous hepatic chronic disorder such as cirrhosis, prolonged alcohol intake, and viral hepatitis. At present, hepatocellular carcinoma (HCC) is a major cause of death associated with neoplastic illness. Molecular characterization of this malignancy describes a complex and heterogeneous entity with a vast array of genetic (punctual mutations, chromosomal rearrangements, and gain/loss of genomic DNA) and epigenetic modifications

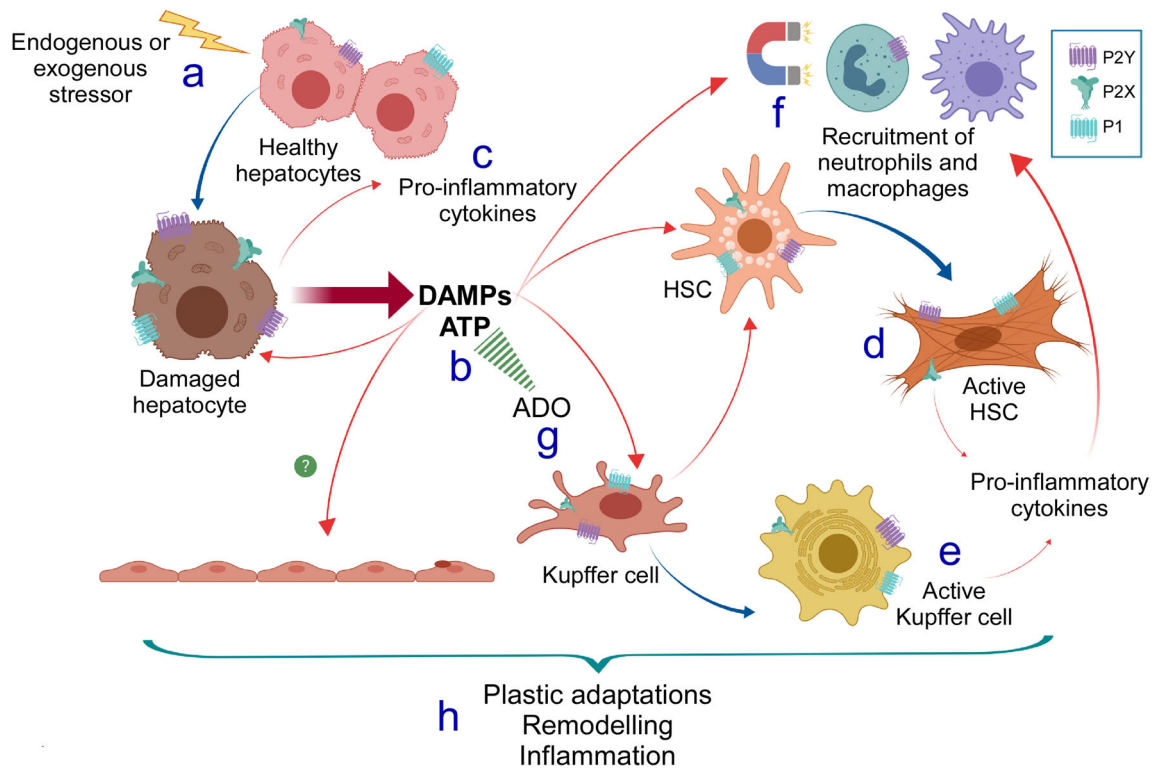


Fig. 1 Pro-inflammatory responses mediated by purinergic signaling associated with hepatocellular damage. Upon hepatocellular injury or stress (a), damaged hepatocytes release DAMPs, particularly ATP, into the extracellular space (b). This nucleotide exerts its actions by interacting with specific P2X (mainly P2X7 and P2X4 in the liver) and P2Y membrane receptors (mainly P2Y2 in the liver). The autocrine/paracrine purinergic actions promote the production and release of pro-inflammatory molecules by the own hepatocyte or by other liver cell types (c), such as hepatic stellate cells (HSCs) and Kupffer cells, to induce their activated phenotype (d, e). Then, additional ATP and other pro-inflammatory signals released from activated HSCs and Kupffer cells

act as chemoattractants for immune cells such as neutrophils and macrophages (f). At the same time, ATP is irreversibly turned into adenosine (ADO), which also contributes to the cellular events leading to liver fibrosis by acting through P1 receptors (g). Together, these signals support the wound-healing response that, after some time, promotes hepatocellular plastic adaptations, tissular remodeling, and chronic inflammation (h), culminating in a fibrotic state. In the picture, red arrows indicate released compounds to the extracellular space acting in autocrine or paracrine fashion, whereas blue arrows indicate phenotypic changes of the participating cells

[13]. Among the signaling pathways that have been related to the onset and development of HCC are WNT/ β -catenin, receptor tyrosine kinases, VEGF and other angiogenic pathways, TGF- β , JAK/STAT, and ubiquitin proteasome.

Purines and cell signaling

It is now well established that intercellular signaling regulated by purines is a form of ubiquitous cellular communication. The concept of purinergic signaling was introduced by Geoffrey Burnstock in 1972 [14]. After the purinergic signaling theory gained wider acceptance, research focused on the identification of cell membrane receptors sensitive to extracellular nucleotides and nucleosides. Receptors were classified as P1, sensitive to adenosine, and P2, sensitive to ATP. From the P1 family, four receptors were cloned and characterized (A1, A2A, A2B, and A3). These receptors are G protein-coupled receptors (GPCRs) that are differentially coupled to Gs/Gi

signaling pathways and activate the mobilization of intracellular Ca^{2+} and changes in cAMP concentration levels [15, 16].

On the other hand, P2 receptors were subsequently divided into two subfamilies, P2X and P2Y, as evidence suggested that both had different pharmacological and molecular properties, and their activation led to differences in signaling pathways [17, 18]. P2X receptors are ligand-gated cation channels from which seven subunits have been cloned and described (P2X1–7) [19]. P2Y receptors belong to the GPCR superfamily and their activation leads to Gi/q-mediated signaling. From this subfamily, eight receptor subtypes have been cloned and characterized (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, and P2Y14) [20].

The intracellular concentration of ATP can reach [mM] levels; in contrast, ATP in the extracellular space is in the much lower [nM] range. Due to the vast amount of ATP-dependent processes, there is a fine and tight intracellular regulation of ATP exchange [21, 22]. Because ATP can act as a molecular messenger, it has been demonstrated in neurons and many endocrine cells that this molecule can be stored in small

synaptic vesicles alongside several neurotransmitters and in large granular (dense-cored) vesicles along with peptides [23–26]. ATP can be released from these same vesicles through exocytosis in mechanisms both dependent on and independent of calcium dynamics [21, 27]. Moreover, it is now well described that ATP can be released to the extracellular space through several other physiologically relevant mechanisms, including connexin/pannexin membrane hemichannels, and by activation of membrane transporters [28]. Nucleotides can also be released from apoptotic cells in a damage setting to serve as “find-me” signals that promote phagocyte recruitment [29], as well as from necrotic cells when their contents are overturned to the extracellular space, where they can act as DAMPs to activate inflammatory signaling through the inflammasome complex [30].

Nucleotide hydrolysis is a very efficient and swift process that occurs in the extracellular space through the actions of membrane-bound ectonucleotidases, and its ultimate product is generally the nucleoside adenosine. Ectonucleotidases tightly control the availability and ratios of nucleotides/nucleosides and can be powerful regulators of purinergic signaling in a variety of processes. Four main families of ectonucleotidases have been characterized: ectonucleotidase triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), ecto-5'-nucleotidases (eNs), ectonucleotidase pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPPs), and alkaline phosphatases [31].

Due to the characterization of the wide expression of most purinergic receptors in almost all cell types in many tissues in both invertebrates and vertebrates, a great body of research has focused on the relevance of their expression in regulating a variety of physiological functions. Evidence has demonstrated the participation of purines in short-term processes, such as neurotransmission and cytokine release [15, 32], as well as in biological processes that include proliferation, epithelial to mesenchymal transition, regulation of metabolic processes, platelet aggregation, differentiation, and inflammation in various other tissues [33, 34].

Purines in liver fibrosis

ATP

The physiological actions related to the purinergic receptor P2Y2 have been widely described in the liver [35–37]. This receptor is essential for hepatic regeneration; for example, in P2Y2R^{-/-} mice, the early events in cell cycle progression and cell proliferation (associated with ERK/Egr-1/AP-1 pathway) were impaired after 70% partial hepatectomy [38]. This notable role of the P2Y2 receptor acting as a modulator of liver regenerative response suggests that ATP and its specific receptors, not only P2Y2, could be playing a role in the cellular response related to tissular damage during liver disease.

A possible role for the purinergic system has been investigated in different models of liver disease. In rats, experimental liver damage by systemic administration of dimethylnitrosamine for 10 weeks or carbon tetrachloride (CCl₄) for 6 to 8 weeks was attenuated by the blockade of purinergic receptors using the antagonist pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS), which inhibited the appearance of fibrotic markers in the liver, specifically the increased deposition of type I collagen. To explain this observation, it was proposed that the effect of antagonizing the purinergic receptors with PPADS regulated the activation of HSCs. Interestingly, the action mediated by PPADS was selective because it did not have an effect on the liver fibrosis produced by bile duct ligation [39].

On the other hand, acute hepatitis induction by administration of concanavalin A in mice induced hepatic ATP release and an increment in P2Y2 expression; in agreement, P2Y2R^{-/-} mice showed reduced damage in response to the same treatment and were less sensitive to acetaminophen (APAP)-induced liver damage [40]. These observations suggest that extracellular ATP and purinergic receptors participate in the early mechanisms associated with liver damage by toxic treatments.

P2X receptors are also expressed in the liver, where transcripts for P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, and P2X7 have been detected. In isolated hepatocytes, transcripts and proteins corresponding to P2X4 and P2X7 receptors have been reported. In these cells, the stimulation with 2'(3')-O-(4-benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate (BzATP) induced a reduction in glycogen content and elicited Na⁺ conductances as well as the release of intracellular Ca²⁺. The biophysical and biochemical characterization indicated that P2X4 is the receptor involved in these responses in hepatocytes [41]. Moreover, partial hepatectomy in P2X4R^{-/-} mice showed impaired biliary adaptation post hepatectomy, resulting in a delay in the proliferation response and apoptotic induction in hepatocytes [42]. This suggests that P2X4 participates in the adaptive response to liver tissue damage.

Additionally, the fibrotic response (estimated by the expression level of procollagen-1 transcript and collagen deposition within the tissue) elicited by bile duct ligation or a high-fat diet is less in P2X4R^{-/-} mice compared to wild type (WT) mice; interestingly, P2X4R^{-/-} mice did not show differences in the fibrotic induction when damage was induced by CCl₄, unlike in the P2Y2/PPADS experiments. This sensitivity to a fibrotic stimulus was mediated by P2X4 signaling that drove the phenotype of hepatic myofibroblasts (MFBs)—mainly portal MFBs—to a profibrotic profile [43].

Purinergic signaling can also mediate the activation and recruitment of immune cells in the liver, increasing the severity of hepatic diseases. In a mouse model of primary sclerosing cholangitis (KO of multidrug resistance protein 2 knockout, Mdr2^{-/-}), deletion of CD39 (CD39^{-/-}) induced an

increment of CD8+ T cells exacerbating liver injury and fibrosis, suggesting that extracellular ATP signaling favors CD8+ T cells infiltration to the damaged region [44]. In agreement, in a sepsis-induced liver injury model, CD39 expression limits P2X7 pro-inflammatory signaling and cytokine production [45], and a more severe effect of the hepatotoxic CCl₄ has been also demonstrated in ENTPD2 null mice [46]. P2Y2R has also been related to activate an immune response in acute liver damage. P2Y2R^{-/-} mice reduced the expression of chemoattractants compared to WT mice in response of concanavalin A, directly impacting on hepatic immune cell infiltration [40].

Adenosine

Accumulated evidence suggests that adenosine (ADO) is a profibrotic intracellular messenger acting through A2A receptors (A2AR). The systemic administration of A2AR antagonists, caffeine, or ZM241385 prevented liver fibrosis induced by the administration of CCl₄ or thioacetamide [47]; moreover, neither of the profibrotic substances had any effect when they were administered to A2AR^{-/-} but not A3AR^{-/-} mice. Regarding these observations, it was proposed that in response to profibrotic agents, liver cells release ADO to the extracellular space to establish an autocrine-paracrine loop in which the nucleoside interacts with A2AR to favor fibrosis induction. In agreement, it was observed that in cultured liver sections, the administration of ethanol or methotrexate induced an increment in the release of ADO to the extracellular milieu [47]. These studies suggested that ADO released by a profibrotic stimulus, acting through A2AR, promoted liver fibrosis. Moreover, in liver damage induced by lipotoxicity and experimental non-alcoholic steatohepatitis (NASH), the pharmacological blocking of A2AR reduced liver damage by a pathway that inhibited JNK 1/2 activation [48].

On the other hand, the role of A1 adenosine receptors (A1AR) in fibrotic induction is controversial [49, 50]. In mice lacking this receptor (A1AR^{-/-}), the induction of liver fibrosis (collagen accumulation and HSC activation) associated with CCl₄ administration was attenuated [50]. Similar findings were observed during treatment with hepatotoxic α -naphthylisothiocyanate [49]; but when liver damage was induced by bile duct ligation (BDL), fibrosis was potentiated. Moreover, the gene expression pattern of A1AR^{-/-} was differential in hepatic tissue when comparing CCl₄ and BDL-treated animals [50]; this notable differential role of ADO signaling in response to a different type of damage reveals that diverse and plastic pathways lead to fibrosis and require specific characterization. Further, mice lacking A1AR were more susceptible to acute ethanol-induced liver damage than WT mice; this sensitivity was related to increased lipogenesis and lipid peroxidation as well as to the depletion of superoxide dismutase resulting in hepatic steatosis in these subjects [51].

Altogether, the available data make it possible to visualize that in liver damage induced by chemical toxins, such as CCl₄, ADO establishes an autocrine-paracrine loop acting through A2AR and A1AR, but the role of the nucleoside in other hepatotoxic models is unclear. Information concerning the purinergic actions in liver damage are summarized in Table 1.

Purines as regulators of hepatic stellate cell activation

HSCs are resident mesenchymal liver cells located in the Disse space and are characterized by their ability to store vitamin A and secrete extracellular matrix elements; however, these cells are mostly known for their pivotal role in fibrosis. As a response to liver injury, HSCs transdifferentiate and activate to an MFB phenotype. MFBs lack vitamin A storage and express enhanced α -smooth muscle actin (α -SMA). Activated MFBs promote the synthesis of type I collagen and are thus considered the main fibrogenic cells in liver damage [63].

ATP

Key studies done before cloning of purinergic receptors showed that the stimulation of isolated HSCs with purinergic ligands elicited inositol phosphate formation, increased the intracellular concentration of Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i), and induced phenotypic changes in HSCs. The potency order was UTP > ATP > ADP [64], clearly showing that HSCs expressed purinergic receptors mainly responsive to UTP, probably P2Y2 and/or P2Y4 receptors.

Molecular analysis confirmed the expression and functionality of P2Y receptors in HSCs: Quiescent HSCs expressed P2Y2 and P2Y4 and the ectonucleotidase NTPD-2; and their stimulation with ATP and UTP induced an increment in [Ca²⁺]_i. Importantly, researchers observed that the fibrogenic process induced evident changes when HSCs were transformed into MFBs, since these cells lost the expression of both P2Y2 and P2Y4 and acquired P2Y6 expression. Similarly, MFB stimulation with UDP elicited an increment in [Ca²⁺]_i as well as an augmented expression of the procollagen 1 transcript [65], suggesting a direct role for P2Y6 in the onset and maintenance of the fibrotic phenotype. In experiments of fibrosis induction in rats, the blockade of purinergic receptors with PPADS resulted in a reduced fibrotic response. In isolated HSCs, the antagonist prevented the phenotypic transformation and inhibited cell proliferation and the expression of procollagen-1 and fibronectin [39]. Altogether, these data suggest that the purinergic system is deeply modified during the activation of HSCs, and that the role played by P2Y receptors in MFB is profibrotic through positive regulation of procollagen I and α -SMA expression.

Similarly, purinergic receptor activation by different nucleotides (UTP being the most potent) in HSCs induced the synthesis of phosphatidic acid (PA) through activation of both

Table 1 Purinergic receptors in the liver damage

Receptor or ligand	Injury	Effect	References
P2X	Diethylnitrosamine or CCl ₄	Administration of the antagonist PPADS, inhibit expression of fibrotic markers	Dranoff et al. [39]
	APAP-induced hepatotoxicity	Reduced hepatotoxicity after blockade of P2X receptors	Amaral et al. [52]
P2X4	Partial hepatectomy	P2X4 ^{-/-} mice showed impaired biliary adaptation post hepatectomy	Besnard et al. [42]
P2X7	APAP-induced hepatotoxicity	P2X7R antagonist, Brilliant Blue G, together with an antagonist for NF-κB, reduced hepatocellular injury and death	Abdelaziz et al. [53]
		A438079 protected against liver injury, possibly through an effect upstream of inflammasome	Xie et al. [54]
		Both, mice administered A438079 and P2X7R-deficient mice, presented decreased liver necrosis	Hoque et al. [55]
	Ethanol-induced alcoholic liver disease	A438079 reduced chronic inflammation by preventing lipid accumulation in HepG2 cells	Shang et al. [56]
	CCl ₄ -induced liver fibrosis	Administration of A438079 inhibited P2X7, collagen, SMA-α, and TGF-β expression, induced by CCl ₄	Huang et al. [57]
	Non-alcoholic liver disease	ASC, IL-18, and NLRP3 KO mice showed increased severity of the disease	Henao-Mejía et al. [58]
	Steatohepatitis	Reduction of the activation of P2X7R was the protective effect found with berberine	Vivoli et al. [59]
	Sepsis-induced injury	Pharmacological blockade of P2X7R prevented tissue damage, apoptosis, and cytokine production	Savio et al. [45]
	Phthalate ester-induced liver injury	P2X7R inhibitor abolished NLRP3 expression and cleavage of caspase 1 and IL-1β	Ni et al. [60]
	Cholestatic injury	Injury induced by activation of NLRP3 in this model include participation of P2X7R	Gong et al. [61]
P2Y2	Partial hepatectomy	P2Y2 ^{-/-} mice have a less proliferative rate in the early stage of liver regeneration	Tackett et al. [38]
	Acute hepatitis induced by concanavalin A	P2Y2 is upregulated and P2Y2 ^{-/-} showed reduced immune cell infiltration	Ayata et al. [40]
A2AR	CCl ₄ Thioacetamide Lipotoxicity NASH	Antifibrotic effect of A2AR antagonist and no effect in A2AR ^{-/-} mice	Chan et al. [47] Imarisio et al. [48]
A1AR	CCl ₄	Fibrosis was attenuated in A1AR ^{-/-} mice	Yang et al. [50] Yang et al. [49]
A1AR	BDL Ethanol (acute)	Fibrosis was potentiated in A1AR ^{-/-} mice	Yang et al. [51]
A2AR	Ethanol-induced injury	Antagonists of A2ARs inhibited HSCs activation	Szuster-Ciesielska et al. [62]
CD39	Biliary fibrosis	CD39 ^{-/-} mice show an increase in hepatic CD8+ T cells and exacerbated liver injury and fibrosis	Peng et al. [44]
	Sepsis-induced liver injury	Expression of CD39 diminishes P2X7 inflammatory signaling and attenuates liver injury	Savio et al. [45]
ENTPD2	CCl ₄ -induced and biliary-type fibrosis	Entpd2 null mice present more severe liver injury and fibrosis	Feldbrügge et al. [46]

phospholipase D (PLD) and the extracellular mitogen-activated kinases (ERK) [66]. However, the exact role of these signals promoting the phenotypic appearance of MFB is not well understood.

On the other hand, the purinergic ligand-gated channel P2X4 enabled the acquisition of the profibrotic phenotype of liver MFB, mainly from portal MFB and not from HSC-derived MFB. Signaling by this receptor regulated α-SMA accumulation, contraction capability, and lysosomal exocytosis of pro-fibrogenic messengers such as growth factors and interleukins (ILs) [43].

Adenosine

The role for ADO in HSC phenotype transformation is controversial. Some evidence supports the fact that ADO, acting through A2AR, induces HSC activation [62, 67–69]. In primary cultures of rat HSCs, the nucleoside was able to induce a concomitant increase of procollagen I and III transcripts and their respective proteins. The signal transduction pathway leading to these effects was analyzed in the human HSC line LX2, and it was found that the regulation of both collagen I and III depends on A2AR activation by a pathway that

involves protein kinase A, Src, and ERK for collagen I and p38 mitogen-activated protein kinases (p38-MAPK) for collagen III [69]. Similar findings were obtained in the HSC-derived cell line HSC-T6 [68] and in primary cultures of mouse HSCs [67].

Also, in the LX2 cell line, ADO blocked the intracellular Ca^{2+} increment and cell migration elicited by PDGF, a potent inducer of the proliferation and migration of this hepatic cell type [70], by activating A2AR. ADO also concomitantly induced the production of TGF- β and collagen I, indicating HSC activation. Altogether, these data support the idea that ADO is a profibrotic factor that could also function as a stop signal for the migration induced by PDGF when activated HSCs reach a damaged site [71].

Reports suggest that ADO participates as a permissive factor in the acetaldehyde-induced HSC activation since the incubation of quiescent rat HSCs with this metabolite promoted an increment in the transcripts for A2AR and A1AR while A2BR and A3R remained unchanged. Moreover, the acetaldehyde-dependent HSC activation was blocked by the antagonist for both A2AR or A1AR [72]. Nevertheless, the signal transduction pathway is still controversial because A2AR and A1AR are coupled to distinct G proteins; thus, researchers have not yet defined the mechanism(s) mediating the effects of extracellular ADO.

In apparent contradictory findings, the administration of the aspartate salt of ADO (IFC-305 compound) in primary cultures of rat HSCs maintained the quiescent phenotype, as revealed by cell morphology, the presence of lipid droplets, the inhibition of profibrotic proteins α -SMA and procollagen-1 expression, and the increment in the levels of anti-fibrogenic proteins MMP-13, Smad7, and PPAR γ [73]. These findings were consistent with previous observations describing the reversion of CCl₄-induced cirrhosis by systemic administration of IFC-305 in rats [74]. Moreover, it has been demonstrated in co-cultures that platelets can suppress HSC activation by releasing ATP and generating ADO, as was shown by the reduction of several fibrotic markers, such as α -SMA and type I collagen [75]. Table 2 provides information on purinergic action in non-parenchymal cells in liver damage.

DAMPs, inflammation, and purinergic signaling

Inflammation and inflammasomes

As result of cellular or tissular injuries, damaged cells release distinct molecules that function as alert signals to trigger the innate immune response. These molecules, known as DAMPs, comprise a diverse group of factors such as foreign nucleic acids, uric acid, proteins like keratin-18, and nucleotides (mainly ATP) [78]. This primary response drives cells to release cytokines to induce inflammation. Release of IL-1 β , IL-18, and IL-6 is a finely regulated two-step process: first, the

synthesis and cytosolic accumulation of immature proteins that depend on the activation of transcriptional factor NF- κ B; second, the proteolytic processing of immature proteins that is mediated by inflammasomes. If maturation does not occur, immature ILs will be subjected to proteasome-mediated degradation [79, 80].

DAMPs regulate the second stage of IL release, acting on a sophisticated machinery of proteins named inflammasomes. This machinery is comprised of the following: (1) an adapter protein named apoptosis-associated speck-like protein (Pycard-ASC) with a characteristic caspase association domain; (2) an effector enzyme, usually caspase-1 or caspase-11, involved in the proteolytic maturation of IL-18 and 1 β [9]; and (3) the DAMP sensor protein. All these cytosolic proteins are receptors that are activated by specific signals (NLRP inflammasomes and its components have been reviewed elsewhere) [81–83].

Of particular interest for this review is the role played by ATP as a DAMP to regulate the inflammatory response through the assembly of the NLRP3 inflammasome. When a tissue is damaged, ATP is released to the extracellular space; since the intracellular concentration of ATP is of millimolar order and the volume of the extracellular compartment is small, the nucleotide reaches a high concentration in the extracellular space, sufficient to activate the low affinity purinergic receptor P2X7 [84]. P2X7 ligation induces the aggregation of the NLRP3 inflammasome that is the best characterized pathway driven by ATP acting as an inflammatory promoter. The main signal conducting to inflammasome assembly elicited by P2X7 is the K⁺ drop resulting from the efflux of this ion induced by P2X7 receptor activity [85–87]. Downstream of this K⁺ efflux, inflammasomes are assembled by binding the NEK7 kinase to the LRR of NLRP3; this interaction is necessary for the binding of ASC and caspase-1 to the whole complex [88, 89]. Besides, it has been demonstrated that although the P2X7 receptor is not a constituent of the inflammasome, it associates through protein-protein interactions with NLRP3 in discrete regions where the K⁺ drop is transduced to inflammasome activation, making the inflammatory response elicited by extracellular ATP more efficient [90].

Moreover, there is evidence that the P2X4 receptor contributes with inflammasome activation in renal disease and spinal cord injury, since the lack of this receptor or its pharmacological inhibition impairs the assembly of the inflammasome, suggesting collaborative actions with P2X7 and other factors in the inflammasome activation. However, the molecular mechanisms underlying these actions remain elusive [91, 92].

Inflammasomes and liver

A high concentration of nucleotides and nucleosides in the extracellular space during DAMP actions can regulate

Table 2 Purinergic receptors in non-parenchymal cells

Receptor or ligand	Phenotype in which they were detected	Effect	References
P2Y2	Quiescent HSC	UTP elicits an increment in $[Ca^{2+}]_i$	Dranoff et al. [65]
P2Y4			
P2Y6	Activated HSC	UDP elicits an increment in $[Ca^{2+}]_i$	Dranoff et al. [65]
P2X4	Portal MFB but not HSC-derived MFB	Induces a profibrotic phenotype	Le Guilcher et al. [43]
P2X7	Quiescent Kupffer cells	In hepatotoxic damage, cholestatic liver disease or cell exposure to nanoparticles induces the assembly of NLRP3 inflammasome	Hoque et al. [55] Toki et al. [76] Gong et al. [61] Kojima et al. [77]
A2AR	Quiescent HSC	Mediates the acetaldehyde-induced HSC activation	Che et al. [69] Szuster-Ciesielska et al. [62] Wang et al. (2014) Yamaguchi et al. [67] Yang et al. [72]
Aspartate salt of ADO (IFC-305 compound) acting through an unidentified adenosine receptor	Quiescent HSC	Maintains quiescent phenotype	Velasco-Loyden et al. [73]

HSC hepatic stellate cells, MFB myofibroblasts, $[Ca^{2+}]_i$ intracellular concentration of Ca^{2+}

processes such as inflammation and immune responses in the liver [93] (Fig. 1). Pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β are both products of inflammasome signaling activation, and their presence in the liver has been detected in response to a challenge with LPS or APAP [94, 95]. Furthermore, an increased presence of the components of the inflammasome machinery, markedly mRNA of TLR4, NLRP3, CARD protein, and caspase-1, has been found in LPS-induced liver injury [96]. Moreover, the two-signal pathway of inflammasome activation has been observed in the liver during APAP-induced damage. Authors found that the hepatotoxic stimulus led to hepatocyte death, which triggered the activation of Tlr9 in sinusoidal endothelial cells and subsequent activation of the NLRP3 inflammasome [97].

Hepatocytes are the first cells to respond when hepatocellular damage occurs. Studies have found the several elements of the inflammasome pathway expressed in these cells [98], although some evidence has suggested that the transcriptional activation of NLRP3 only occurs after an LPS challenge in primary rat hepatocytes [99]. Inflammasome pathway components, such as NLRP3, ASC, and caspase-1, increase their protein expression level in an ethanol-induced liver injury in BRL-3A cells, a normal rat hepatocyte cell line [100], as well as in primary hepatocytes isolated from a model of NASH [101].

HSCs activation is induced in inflammatory environments such as those in many hepatic diseases that are associated with the liver inflammasome activation pathway. The activation of the inflammasome in HSCs mediates processes such as the expression of collagen-1 and the imbalance of ECM/MMP [102] that induces liver fibrosis in mice [103], in an NLRP3-dependent manner. NLRP3 inflammasome and fibrosis

marker expression were also observed in primary HSCs and the LX-2 human HSC line of *Schistosoma japonicum*-infected mice [104].

KCs also become activated and drive an inflammatory response mediated by the NLRP3 inflammasome upon liver cell damage [104]. IL-18 is an important regulatory cytokine that can induce the production of interferon- γ (IFN- γ) and promote the secretion of other inflammatory cytokines and chemokines [105] and NLRP3 inflammasome activation is crucial for the maturation of IL-18, which can also be cleaved by caspase-1 following inflammasome activation. It has been observed that Kupffer macrophages release IL-18, following NLRP3 inflammasome activation, after liver injury induction using LPS. Notably, IL-18 release by Kupffer cells only occurred after sensitization with a bacterial pre-treatment [106].

P2X7

Activation of P2X7 receptor of the inflammasome pathway has been widely documented as a pro-inflammatory factor that contributes to the toxicity of several hepatic diseases (Fig. 1, Table 1). The P2X7 receptor can mediate the release of IL-1 β as well as mRNA expression of several elements of the inflammasome activation pathway. In this work, authors have also described that an ATP-mediated stimulus can potentiate LPS-induced hepatotoxic response [107]. Furthermore, blockade of P2X7 with antagonist A438079 or P2X7R^{-/-} mice showed significantly decreased APAP-induced necrosis [55]. Protective effects of the reduction of P2X7 activation in the inflammasome pathway were also seen in a murine model of steatohepatitis [108]. The mechanisms involved in the

protective effects of the P2X7 blockade are not fully elucidated. Evidence has shown a direct effect on the downregulation of the inflammasome pathway and its components [109], but a modulatory interaction with the NF- κ B pathway has also been suggested [53].

Activation of P2X7 by ATP in the extracellular space promotes the opening of membrane-bound pannexin-1 hemichannels, which have also been associated with the inflammatory response. It has been reported that pannexin-1 channels are necessary for the maturation and release of IL-1 β , as well as for the recognition of bacterial products in the cytosol, in both dependent and independent of TLR signaling [110, 111]. In the liver, the expression of pannexin-1 hemichannels was found to increase after a challenge with LPS, in parallel with other components of the inflammasome [96].

Involvement of the P2X7 in inflammasome-mediated responses has also been described in the BRL-3A cell line. A blockade of this receptor, with knockdown techniques and A438079, was found to underlie the protective effects of zexanthin dipalmitate on ethanol-induced liver injury [109]. P2X7 receptor has also been associated with NLRP3 inflammasome activation in a phthalate ester-induced liver injury in L02 and HepG2 cells, a normal and transformed hepatocyte cell line, respectively [60].

Moreover, activation of the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells, and the concomitant release of IL-1 β mediated by ATP, is dependent on the P2X7. The role played by this purinergic receptor was demonstrated using the pharmacological antagonist A438079 in a clonal mouse Kupffer cell line (KUP5) [76]. Others have also used P2X7-deficient mice in a model of hepatotoxicity [55] as well as in a model of cholestatic liver injury [61]. Similar findings were obtained from the P2X7 antagonist A438079 when KCs were exposed to nanoparticles, thus confirming their effects on inflammation [77].

Others groups have reported that A438079 may also have an effect upstream and independent of the inflammasome signaling; for example, by inhibiting P450 isoenzyme activities [54]. This result could be due to different release mechanisms for IL-1 β after P2X7 receptor activation in inflammation, both dependent on and independent of inflammasome activation, in different types of macrophages [112, 113].

Other purinergic mediators

The accumulation and proportion of extracellular nucleotides can be a relevant factor during the activation of the inflammasome machinery; thus, the regulation of such dynamics by ectonucleotidases is crucial in the inflammation pathways. CD39 is an ectoenzyme capable of generating AMP and ADP from the breakdown of ATP, thus reducing nucleotide levels in the extracellular space. Accordingly, several authors have found that eliminating the activity of the

CD39 ectonucleotidase promotes the elevation of ATP levels and increases liver injury in an acute model of sepsis and APAP-induced hepatotoxicity [45, 55].

Although P2X7 has been widely associated with inflammatory signaling responses, evidence has shown that P2Y receptors could also be implicated in the inflammation process. P2Y2 receptor expression in hepatocytes has been implicated in promoting neutrophil infiltration and cellular damage in a model of acute liver injury as an outcome of inflammation signaling [40].

Concluding remarks

Purinergic signaling is an extremely complex system that participates not only in regulating several processes in the various cell types within the liver, but also in the context of a cellular environment that is dynamically changing in response to a damaged or diseased state. Substantial evidence now shows that extracellular nucleotides and nucleosides are important mediators in hepatic disease and could potentially become pharmacological targets to regulate a variety of pathophysiological responses in the liver.

Acknowledgments We are grateful to Jessica González Norris for proofreading.

Funding information This work was funded by PAPIIT-UNAM, number IN201017 to FGV-C and IN201618 to MD-M, and CONACyT-México, number 284-557 to MD-M.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest E. Velázquez-Miranda declares that he has no conflict of interest.

M. Díaz-Muñoz declares that he has no conflict of interest.

Francisco Gabriel Vázquez-Cuevas declares that he has no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

1. Fustin J-M, Doi M, Yamada H et al (2012) Rhythmic nucleotide synthesis in the liver: temporal segregation of metabolites. *Cell Rep* 1:341–349. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.001>
2. Ananian P, Hardwigsen J, Bernard D, Le Treut YP (2005) Serum acute-phase protein level as indicator for liver failure after liver resection. *Hepatogastroenterology* 52(63):857–861
3. Röszer T (2014) The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Res* 358:685–695. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1985-7>

4. Mataix Verdú J, Martínez de Vitoria E (2009) Chapter 48. Liver and biliary tract. In: *Treaty of nutrition and feeding*. OCEANO/ergon, Spain, pp 1355–1369
5. Jungermann K, Katz N (1989) Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* 69:708–764. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.708>
6. Ishibashi H, Nakamura M, Komori A et al (2009) Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol* 31:399–409. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0155-6>
7. Wang G-P, Xu C-S (2010) Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Mol Biotechnol* 46:49–57. <https://doi.org/10.1007/s12033-010-9274-5>
8. Martínez-Hernández A, Amenta PS (1995) The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 9(14):1401–1410
9. Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform remodeling activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* 10:417–426. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
10. Martínez-Hernández A, Amenta PS (1993) The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423:1–11
11. Baiocchi A, Montaldo C, Conigliaro A et al (2016) Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. *PLoS One* 11:e0151736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151736>
12. Elpek GÖ (2014) Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: an update. *World J Gastroenterol* 20:7260–7276. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7260>
13. McKillop IH, Moran DM, Jin X, Koniaris LG (2006) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Res* 136:125–135. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.04.013>
14. Burnstock G (1972) Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509–581
15. Di Virgilio F, Vuerich M (2015) Purinergic signaling in the immune system. *Auton Neurosci* 191:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.011>
16. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA et al (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update. *Pharmacol Rev* 63:1–34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>
17. Webb TE, Simon J, Krishek BJ et al (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* 324:219–225
18. Burnstock G, Kennedy C (1985) Is there a basis for distinguishing two types of P₂-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16:433–440
19. Burnstock G (2014) Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp Physiol* 99:16–34. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>
20. von Kügelgen I, Harden TK (2011) Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P₂Y receptors. *Adv Pharmacol* 61:373–415. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00012-6>
21. Bonora M, Patergnani S, Rimessi A et al (2012) ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* 8:343–357. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>
22. Ramzan R, Staniek K, Kadenbach B, Vogt S (2010) Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1797:1672–1680. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.06.005>
23. Cui JD, Xu ML, Liu EYL et al (2016) Expression of globular form acetylcholinesterase is not altered in P₂Y₁R knock-out mouse brain. *Chem Biol Interact* 259:291–294. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.028>
24. Braun M, Wendt A, Karanauskaite J et al (2007) Corelease and differential exit via the fusion pore of GABA, serotonin, and ATP from LDCV in rat pancreatic beta cells. *J Gen Physiol* 129:221–231. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609658>
25. Pablo Huidobro-Toro J, Verónica Donoso M (2004) Sympathetic co-transmission: the coordinated action of ATP and noradrenaline and their modulation by neuropeptide Y in human vascular neuroeffector junctions. *Eur J Pharmacol* 500:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.008>
26. Choi RCY, Siow NL, Cheng AWM et al (2003) ATP acts via P₂Y₁ receptors to stimulate acetylcholinesterase and acetylcholine receptor expression: transduction and transcription control. *J Neurosci* 23:4445–4456
27. Cotrina ML, Lin JH, López-García JC et al (2000) ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* 20:2835–2844
28. Abudara V, Retamal MA, Del Rio R, Orellana JA (2018) Synaptic functions of hemichannels and pannexons: a double-edged sword. *Front Mol Neurosci* 11:435. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00435>
29. Elliott MR, Cheken FB, Tramont PC et al (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461:282–286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>
30. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK (2014) Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509:310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>
31. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>
32. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H (2009) Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 32:19–29. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.10.001>
33. Martínez-Ramírez AS, Vázquez-Cuevas FG (2015) Purinergic signaling in the ovary. *Mol Reprod Dev* 82:839–848. <https://doi.org/10.1002/mrd.22537>
34. Burnstock G, Verkhratsky A (2010) Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* 1:e9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2009.11>
35. Dixon CJ, White PJ, Hall JF et al (2005) Regulation of human hepatocytes by P₂Y receptors: control of glycogen phosphorylase, Ca²⁺, and mitogen-activated protein kinases. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1305–1313. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.082743>
36. Thevananther S, Sun H, Li D et al (2004) Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* 39:393–402. <https://doi.org/10.1002/hep.20075>
37. Keppens S, De Wulf H (1986) Characterization of the liver P₂-purinoceptor involved in the activation of glycogen phosphorylase. *Biochem J* 240:367–371
38. Tackett BC, Sun H, Mei Y et al (2014) P₂Y₂ purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G1073–G1087. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00092.2014>
39. Dranoff JA, Kruglov EA, Abreu-Lanfranco O et al (2007) Prevention of liver fibrosis by the purinoceptor antagonist pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS). *In Vivo* 21:957–965
40. Ayata CK, Ganai SC, Hockenjos B et al (2012) Purinergic P₂Y₂ receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury. *Gastroenterology* 143:1620–1629.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.049>

41. Emmett DS, Feranchak A, Kilic G et al (2008) Characterization of ionotropic purinergic receptors in hepatocytes. *Hepatology* 47: 698–705. <https://doi.org/10.1002/hep.22035>
42. Besnard A, Gautherot J, Julien B et al (2016) The P2X4 purinergic receptor impacts liver regeneration after partial hepatectomy in mice through the regulation of biliary homeostasis. *Hepatology* 64:941–953. <https://doi.org/10.1002/hep.28675>
43. Le Guilcher C, Garcin I, Dellis O et al (2018) The P2X4 purinergic receptor regulates hepatic myofibroblast activation during liver fibrogenesis. *J Hepatol* 69:644–653. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.05.020>
44. Peng Z-W, Rothweiler S, Wei G et al (2017) The ectonucleotidase ENTPD1/CD39 limits biliary injury and fibrosis in mouse models of sclerosing cholangitis. *Hepatal Commun* 1:957–972. <https://doi.org/10.1002/hep4.1084>
45. Savio LEB, de Andrade MP, Figliuolo VR et al (2017) CD39 limits P2X7 receptor inflammatory signaling and attenuates sepsis-induced liver injury. *J Hepatol* 67:716–726. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.05.021>
46. Feldbrügge L, Jiang ZG, Csizmadia E et al (2018) Distinct roles of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in liver regeneration and fibrosis. *Purinergic Signal* 14:37–46. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9590-3>
47. Chan ESL, Montesinos MC, Fernandez P et al (2006) Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis. *Br J Pharmacol* 148:1144–1155. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706812>
48. Imarisio C, Alchera E, Sutti S et al (2012) Adenosine A(2a) receptor stimulation prevents hepatocyte lipotoxicity and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in rats. *Clin Sci* 123:323–332. <https://doi.org/10.1042/CS20110504>
49. Yang P, Chen P, Wang T et al (2013) Loss of A(1) adenosine receptor attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in mice. *Toxicol Sci* 131:128–138. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs263>
50. Yang P, Han Z, Chen P et al (2010) A contradictory role of A1 adenosine receptor in carbon tetrachloride- and bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 332:747–754. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162727>
51. Yang P, Wang Z, Zhan Y et al (2013) Endogenous A1 adenosine receptor protects mice from acute ethanol-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 309:100–106. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.05.003>
52. Amaral SS, Oliveira AG, Marques PE, Quintão JLD, Pires DA, Resende RR, Sousa BR, Melgaço JG, Pinto MA, Russo RC, Gomes AKC, Andrade LM, Zanin RF, Pereira RVS, Bonorino C, Soriani FM, Lima CX, Cara DC, Teixeira MM, Leite MF, Menezes GB (2013) Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity. *Cell Communication and Signaling* 11(1):10
53. Abdelaziz HA, Shaker ME, Hamed MF, Gameil NM (2017) Repression of acetaminophen-induced hepatotoxicity by a combination of celastrol and brilliant blue G. *Toxicol Lett* 275:6–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.012>
54. Xie Y, Williams CD, McGill MR et al (2013) Purinergic receptor antagonist A438079 protects against acetaminophen-induced liver injury by inhibiting p450 isoenzymes, not by inflammasome activation. *Toxicol Sci* 131:325–335. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs283>
55. Hoque R, Sohail MA, Salhanick S et al (2012) P2X7 receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G1171–G1179. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00352.2011>
56. Shang Y, Li XF, Jin MJ, Li Y, Wu YL, Jin Q, Zhang Y, Li X, Jiang M, Cui BW, Lian LH, Nan JX (2018) Leucodien attenuates inflammatory response in macrophages and lipid accumulation in steatotic hepatocytes via P2x7 receptor pathway: A potential role in alcoholic liver disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 107:374–381
57. Huang C, Yu W, Cui H, Wang Y, Zhang L, Han F, Huang T (2014) P2X7 blockade attenuates mouse liver fibrosis. *Molecular Medicine Reports* 9(1):57–62
58. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaïss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jurczak MJ, Camporez J, Shulman GI, Gordon JI, Hoffman HM, Flavell RA (2012) Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482(7384):179–185
59. Vivoli E, Cappon A, Milani S, Piombanti B, Provenzano A, Novo E, Masi A, Navari N, Narducci R, Mannaioni G, Moneti G, Oliveira CP, Parola M, Marra F (2016) NLRP3 inflammasome as a target of berberine in experimental murine liver injury: interference with P2X7 signalling. *Clinical Science* 130(20):1793–1806
60. Ni J, Zhang Z, Luo X et al (2016) Plasticizer DBP activates NLRP3 inflammasome through the P2X7 receptor in HepG2 and L02 cells. *J Biochem Mol Toxicol* 30:178–185. <https://doi.org/10.1002/jbt.21776>
61. Gong Z, Zhou J, Zhao S et al (2016) Chenodeoxycholic acid activates NLRP3 inflammasome and contributes to cholestatic liver fibrosis. *Oncotarget* 7:83951–83963. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13796>
62. Szuster-Ciesielska A, Sztanke K, Kandefers-Szerszeń M (2012) A novel fused 1,2,4-triazine aryl derivative as antioxidant and non-selective antagonist of adenosine A(2A) receptors in ethanol-activated liver stellate cells. *Chem Biol Interact* 195:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2011.10.004>
63. Friedman SL (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88:125–172. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>
64. Takemura S, Kawada N, Hirohashi K et al (1994) Nucleotide receptors in hepatic stellate cells of the rat. *FEBS Lett* 354:53–56
65. Dranoff JA, Ogawa M, Kruglov EA et al (2004) Expression of P2Y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G417–G424. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00294.2003>
66. Benitez-Rajal J, Lorite M-J, Burt AD et al (2006) Phospholipase D and extracellular signal-regulated kinase in hepatic stellate cells: effects of platelet-derived growth factor and extracellular nucleotides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G977–G986. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00041.2006>
67. Yamaguchi M, Saito S-Y, Nishiyama R et al (2017) Caffeine suppresses the activation of hepatic stellate cells cAMP-independently by antagonizing adenosine receptors. *Biol Pharm Bull* 40:658–664. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00947>
68. Wang H, Guan W, Yang W et al (2014) Caffeine inhibits the activation of hepatic stellate cells induced by acetaldehyde via adenosine A2A receptor mediated by the cAMP/PKA/SRC/ERK1/2/P38 MAPK signal pathway. *PLoS One* 9:e92482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092482>
69. Che J, Chan ESL, Cronstein BN (2007) Adenosine A2A receptor occupancy stimulates collagen expression by hepatic stellate cells via pathways involving protein kinase A, Src, and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signaling cascade or p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol Pharmacol* 72: 1626–1636. <https://doi.org/10.1124/mol.107.038760>
70. Pinzani M (2002) PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 7:d1720–d1726
71. Hashmi AZ, Hakim W, Kruglov EA et al (2007) Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate

- cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G395–G401. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00208.2006>
72. Yang Y, Wang H, Lv X et al (2015) Involvement of cAMP-PKA pathway in adenosine A1 and A2A receptor-mediated regulation of acetaldehyde-induced activation of HSCs. *Biochimie* 115:59–70. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.019>
 73. Velasco-Loyden G, Pérez-Carreón JI, Agüero JFC et al (2010) Prevention of in vitro hepatic stellate cells activation by the adenosine derivative compound IFC305. *Biochem Pharmacol* 80:1690–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.017>
 74. Pérez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredó ML et al (2010) An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCl(4)-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol* 42:287–296. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.005>
 75. Ikeda N, Murata S, Maruyama T et al (2011) Platelet-derived adenosine 5'-triphosphate suppresses activation of human hepatic stellate cell: in vitro study. *Hepatology* 42:91–102. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2011.00893.x>
 76. Toki Y, Takenouchi T, Harada H et al (2015) Extracellular ATP induces P2X7 receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1 β , HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 458:771–776. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.011>
 77. Kojima S, Negishi Y, Tsukimoto M et al (2014) Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 β production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *Toxicology* 321:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.008>
 78. Mihm S (2018) Danger-associated molecular patterns (DAMPs): molecular triggers for sterile inflammation in the liver. *Int J Mol Sci* 19:E3104. <https://doi.org/10.3390/ijms19103104>
 79. Englezou PC, Rothwell SW, Ainscough JS et al (2015) P2X7R activation drives distinct IL-1 responses in dendritic cells compared to macrophages. *Cytokine* 74:293–304. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.013>
 80. Ainscough JS, Frank Gerberick G, Zahedi-Nejad M et al (2014) Dendritic cell IL-1 α and IL-1 β are polyubiquitinated and degraded by the proteasome. *J Biol Chem* 289:35582–35592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.595686>
 81. Ting JP-Y, Lovering RC, Alnemri ES et al (2008) The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity* 28:285–287. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.005>
 82. Davis BK, Wen H, Ting JP-Y (2011) The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 29:707–735. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>
 83. Di Virgilio F (2013) The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacol Rev* 65:872–905. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006171>
 84. Coddou C, Yan Z, Obsil T et al (2011) Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol Rev* 63:641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>
 85. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G et al (2013) K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38:1142–1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
 86. Pétrilli V, Papin S, Dostert C et al (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14:1583–1589. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>
 87. Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269:15195–15203
 88. Shi H, Wang Y, Li X et al (2016) NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat Immunol* 17:250–258. <https://doi.org/10.1038/ni.3333>
 89. He Y, Zeng MY, Yang D et al (2016) NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530:354–357. <https://doi.org/10.1038/nature16959>
 90. Franceschini A, Capece M, Chiozzi P et al (2015) The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J* 29:2450–2461. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268714>
 91. de Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G et al (2012) P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury. *J Neurosci* 32:3058–3066. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4930-11.2012>
 92. Chen K, Zhang J, Zhang W et al (2013) ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy. *Int J Biochem Cell Biol* 45:932–943. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.009>
 93. Burnstock G, Vaughn B, Robson SC (2014) Purinergic signalling in the liver in health and disease. *Purinergic Signal* 10:51–70. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9398-8>
 94. Cover C, Liu J, Farhood A et al (2006) Pathophysiological role of the acute inflammatory response during acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 216:98–107. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.04.010>
 95. Lang CH, Silvis C, Deshpande N et al (2003) Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 19:538–546. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000055237.25446.80>
 96. Ganz M, Csak T, Nath B, Szabo G (2011) Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver. *World J Gastroenterol* 17:4772–4778. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i43.4772>
 97. Imaeda AB, Watanabe A, Sohail MA et al (2009) Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J Clin Invest* 119:305–314. <https://doi.org/10.1172/JCI35958>
 98. Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J et al (2001) Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 49:1269–1275. <https://doi.org/10.1177/002215540104901009>
 99. Boaru SG, Borkham-Kamphorst E, Tihaa L et al (2012) Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *J Inflamm (Lond)* 9:49. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-9-49>
 100. Xiao J, Zhu Y, Liu Y et al (2014) *Lycium barbarum* polysaccharide attenuates alcoholic cellular injury through TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway. *Int J Biol Macromol* 69:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.034>
 101. Csak T, Ganz M, Pespisa J et al (2011) Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. 54:133–144. <https://doi.org/10.1002/hep.24341>
 102. Watanabe A, Sohail MA, Gomes DA et al (2009) Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296:G1248–G1257. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90223.2008>
 103. Inzaugarat ME, Johnson CD, Holtmann TM et al (2019) NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces liver fibrosis in mice. *Hepatology* 69:845–859. <https://doi.org/10.1002/hep.30252>

104. Zhang W-J, Fang Z-M, Liu W-Q (2019) NLRP3 inflammasome activation from Kupffer cells is involved in liver fibrosis of *Schistosoma japonicum*-infected mice via NF- κ B. *Parasit Vectors* 12:29. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3223-8>
105. Wang F, Guan M, Wei L, Yan H (2019) IL-18 promotes the secretion of matrix metalloproteinases in human periodontal ligament fibroblasts by activating NF- κ B signaling. *Molecular Medicine Reports*; Athens 19:703. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9697>
106. Imamura M, Tsutsui H, Yasuda K et al (2009) Contribution of TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta-mediated IL-18 release to LPS-induced liver injury in mice. *J Hepatol* 51:333–341. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.027>
107. Jiang S, Zhang Y, Zheng J-H et al (2017) Potentiation of hepatic stellate cell activation by extracellular ATP is dependent on P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation. *Pharmacol Res* 117:82–93. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.040>
108. Vivoli E, Cappon A, Milani S et al (2016) NLRP3 inflammasome as a target of berberine in experimental murine liver injury: interference with P2X7 signalling. *Clin Sci* 130:1793–1806. <https://doi.org/10.1042/CS20160400>
109. Gao H, Lv Y, Liu Y et al (2019) Wolfberry-derived zeaxanthin dipalmitate attenuates ethanol-induced hepatic damage. *Mol Nutr Food Res* 63:e1801339. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801339>
110. Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG et al (2007) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. - PubMed - NCBI. *Immunity* 26(4):433–443
111. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>
112. Gicquel T, Victoni T, Fautrel A et al (2014) Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41:279–286. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12214>
113. Pelegrin P, Barroso-Gutierrez C, Surprenant A (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol* 180:7147–7157

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

Increased Purinergic Responses Dependent on P2Y2 Receptors in Hepatocytes from CCl₄-Treated Fibrotic Mice

Erandi Velázquez-Miranda, Christian Molina-Aguilar [†] , Adriana González-Gallardo, Olivia Vázquez-Martínez, Mauricio Díaz-Muñoz and Francisco G Vázquez-Cuevas *

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro 76230, Mexico; erandivelazquez@gmail.com (E.V.-M.); cmolina@ligh.unam.mx (C.M.-A.); gallardog@unam.mx (A.G.-G.); ovazquez@comunidad.unam.mx (O.V.-M.); mdiaz@comunidad.unam.mx (M.D.-M.)

* Correspondence: fvazquez@comunidad.unam.mx; Tel.: +52-555-623-4035

† Current Address: Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro 76230, Mexico.

Received: 24 February 2020; Accepted: 17 March 2020; Published: 26 March 2020



Abstract: Inflammatory and wound healing responses take place during liver damage, primarily in the parenchymal tissue. It is known that cellular injury elicits an activation of the purinergic signaling, mainly by the P2X7 receptor; however, the role of P2Y receptors in the onset of liver pathology such as fibrosis has not been explored. Hence, we used mice treated with the hepatotoxin CCl₄ to implement a reversible model of liver fibrosis to evaluate the expression and function of the P2Y2 receptor (P2Y2R). Fibrotic livers showed an enhanced expression of P2Y2R that eliminated its zonal distribution. Hepatocytes from CCl₄-treated mice showed an exacerbated ERK-phosphorylated response to the P2Y2R-specific agonist, UTP. Cell proliferation was also enhanced in the fibrotic livers. Hepatic transcriptional analysis by microarrays, upon CCl₄ administration, showed that P2Y2 activation regulated diverse pathways, revealing complex action mechanisms. In conclusion, our data indicate that P2Y2R activation is involved in the onset of the fibrotic damage associated with the reversible phase of the hepatic damage promoted by CCl₄.

Keywords: purinergic signaling; P2Y2 receptor; adenine nucleotides; hepatocyte; CCl₄; liver fibrosis

1. Introduction

Extracellular nucleotides, as intercellular messengers, exert their actions through specific receptors known as P2X and P2Y. While P2X receptors are ligand-gated ion channels, P2Y receptors (P2YRs) belong to the superfamily of G-protein coupled receptors (GPCRs) with seven transmembrane segments. Eight P2YRs have been described to date (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-14). P2Y2R is a prototypical member of the family that displays its actions through G α q coupling and the phosphoinositide-Ca²⁺ pathway [1].

The expression of P2Y2R has been described in liver cells. In primary cultures of human hepatocytes, P2Y2R activity induced an increment in the levels of intracellular calcium [Ca²⁺]_i, inositol polyphosphates, glycogen phosphorylase activity and MAPK-ERK phosphorylation [2]. In rat hepatocytes, stimulation with a non-hydrolysable analog of ATP, ATP γ S, induced cell proliferation and an increment in the phosphorylation of JNK. ATP γ S also induced the early response genes c-fos and c-jun and the binding of the AP-1 complex to DNA, suggesting activation of this effector [3].

Importantly, it has been demonstrated that P2Y2R is necessary for liver growth after partial hepatectomy. In P2Y2R^{-/-} mice, proliferative signals like ERK phosphorylation, egr-1 activation and

AP-1 complex binding to DNA, which are responsible for priming the regenerative process after 70% resection of the liver, are impaired [4].

In the context of tissue damage, ATP released from injured tissues is considered a damage associated molecular pattern (DAMP) [5,6]. It is well understood that extracellular ATP, acting mainly through P2X7R, induces the innate inflammatory response by promoting the activity of the inflammasome NLRP3 [7], which has been shown to be particularly relevant during liver fibrosis [8]. However, it remains unknown whether P2YRs play a role in response to cellular damage. In the fibrotic context, the signaling associated with P2Y2R has not been characterized. Since fibrosis is an aberrant wound healing process where hepatocyte proliferation has lost control, we reasoned that extracellular ATP released through chronic liver injury has a role in fibrotic development, thus influencing cell proliferation.

Recently, it was demonstrated that P2Y2R plays a relevant role in tumor initiation in hepatocarcinogenesis, since P2Y2^{-/-} mice develop a lower number of liver tumors in response to diethylnitrosamine (DEN) injection. Mechanistically, this effect was correlated with a decreased cell proliferation in the early stage of the response to the hepatotoxic [8].

Therefore, it is possible to hypothesize that extracellular purines play complex roles in liver fibrosis that involve various receptor subtypes, with P2X7 mediating inflammation and P2Y2 promoting proliferation.

Although the fibrosis-induced hepatocellular damage involves an interplay among multiple liver cell types, parenchymal cells are the primary sensors of injury signals and are primed for pro-fibrotic responses [5,9]; under this rationale, we are interested in the responses mediated by P2Y2R in hepatocytes.

In the present study, we analyzed the expression and function of P2Y2R in a mouse model of fibrosis, induced by the administration of CCl₄ for 4 weeks. P2Y2R was up-regulated, and the UTP-induced purinergic responses, detected as ERK phosphorylation and cell proliferation, were exacerbated. The gene expression landscape indicated that extracellular purines through P2Y2R influenced a complex web of informational pathways to support the survival of fibrotic hepatocytes. We propose that P2Y2R is an important element in the hepatic fibrotic changes, mainly driving the parenchymal proliferative responses associated with fibrosis installation.

2. Results

2.1. Hepatic Fibrosis Induced by CCl₄

The use of CCl₄ to induce liver fibrosis is a well-characterized model [10,11]; in the present study, we induced a reversible fibrotic state, as described in the Material and Methods section. Histopathological assessment by hematoxylin-and eosin-staining in the livers of control mice (Figure 1A) showed healthy hepatocytes with granular eosinophil cytoplasm and intact nuclei with clearly defined nucleoli. Tissue architecture showed normal portal tracts with portal venules, hepatic arterioles and interlobular bile ducts without disturbances and a well-preserved sinusoidal space between hepatic cords (Figure 1A). Using Masson's trichrome staining, thin collagen fibers were observed only within the pericentral zones (Figure 1B).

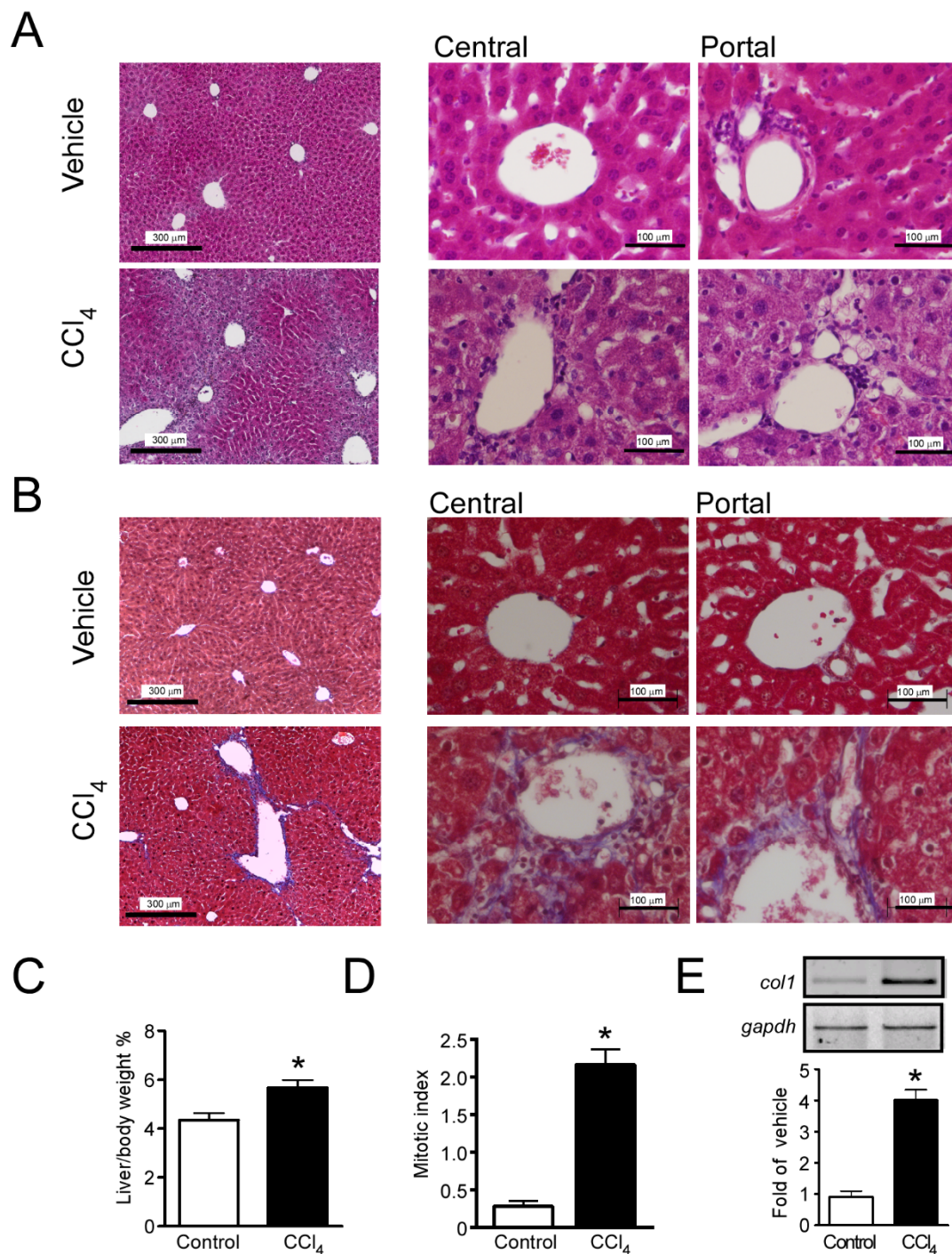


Figure 1. Administration of CCl₄ for 4 weeks induced a fibrotic phenotype. Mice of the C57BL/6 strain were treated with intraperitoneal injections of CCl₄, three times a week for 4 weeks, then, a histological analysis of liver sections was performed. Hematoxylin and Eosin (A) and Masson's Trichrome stain (B) in 5 μm liver slices, showing low magnification fields and central and portal regions, from control and CCl₄-injected mice (n= three mice, three slides each). (C) Percent of liver/body weight from control- or CCl₄-injected mice. (D) Effects of CCl₄ treatment on the rate of liver mitosis (mitotic index) and E) Expression level of *Col1a1* transcript in liver homogenates as a marker of fibrosis. * *p* < 0.05, Student's *t*-test. For C, data are the mean of three mice. In (D), results are the average of 72 fields from three livers of each group and in (E), five mice per group were analyzed.

In mice treated for 4 weeks with CCl₄, tissue and cytological abnormalities were evident. Portal and central zones presented extensive areas with anisocytosis (evidence of the inflammatory state). Hepatocytes exhibited fat vacuoles and a granular eosinophilic cytoplasm, as well as a high incidence of dismembered nuclei, pyknosis and karyolysis. This group also presented signs of necrosis and inflammation, such as a high lymphocyte count in the portal and central zones, and loss of Disse space (Figure 1A). Using Masson's trichrome staining, we observed coarse collagen fibers in the portal zone with ramifications for the central zone. The tissue also showed hyperplasia and the neo-formation of bile ducts as a response to the toxic damage (Figure 1B). Moreover, mice treated with CCl₄ showed hepatomegaly (4.3 ± 0.3 vs. $5.7\% \pm 0.4\%$ liver/body weight for control and CCl₄, respectively, $p = 0.0021$, Student's *t*-test, $n = 4$) (Figure 1C), a characteristic of the induction of the fibrotic state.

To confirm the pro-fibrotic state of the livers in the CCl₄-treated mice, the mitotic index was analyzed. We observed that livers from CCl₄-treated mice showed an increased frequency of mitotic hepatocytes (0.30 ± 0.07 vs. 2.2 ± 0.2 mitosis by field, $p < 0.0001$, Student's *t*-test) (Figure 1D). Furthermore, induction of the gene coding for the α -1 chain of collagen type I in mice (*Col1a1*) was analyzed by RT-PCR and compared to the constitutive transcript *Gapdh*. A significant increment in the *Col1a1* transcript was quantified when compared with control animals (4.0 ± 0.3 fold of control, $p < 0.0001$, Student's *t*-test) (Figure 1E).

2.2. CCl₄-Induced Changes in the Expression Level of P2Y Receptor Transcripts

Although this study focused on P2Y₂R, we were interested in describing the changes in the expression levels of all P2YRs associated with the fibrotic state. To analyze if hepatocellular damage modified the expression levels of P2YRs, total RNA from liver homogenates of control and CCl₄-treated mice was isolated and used for reverse transcription and qPCR. The transcript for *P2yr11* was not included in the analysis because this receptor is not expressed in rodents [12]. Interestingly, it was not possible to amplify *P2yr1* and *P2yr4* transcripts in both groups. An increment in the expression of *P2yr2* (6.3 ± 2.1 fold of control, $p = 0.007$, Student's *t*-test) and *P2yr6* (3.1 ± 0.6 fold of control, $p = 0.023$, Student's *t*-test) transcripts was noted, as well a reduction in the expression of *P2yr13* (0.20 ± 0.08 fold of control, $p < 0.0001$, Student's *t*-test), whereas *P2yr14* and *P2yr12* did not show any changes (Figure 2).

Our main interest was the uridine nucleotide-sensitive P2YRs, particularly P2Y₂R, because of its regulatory role in hepatic regeneration mediating proliferative pathways in hepatocytes [4]. Considering that liver fibrosis involves a deregulated wound-healing process, we decided to analyze further the role of P2Y₂R in the reversible fibrotic process associated with CCl₄-treatment.

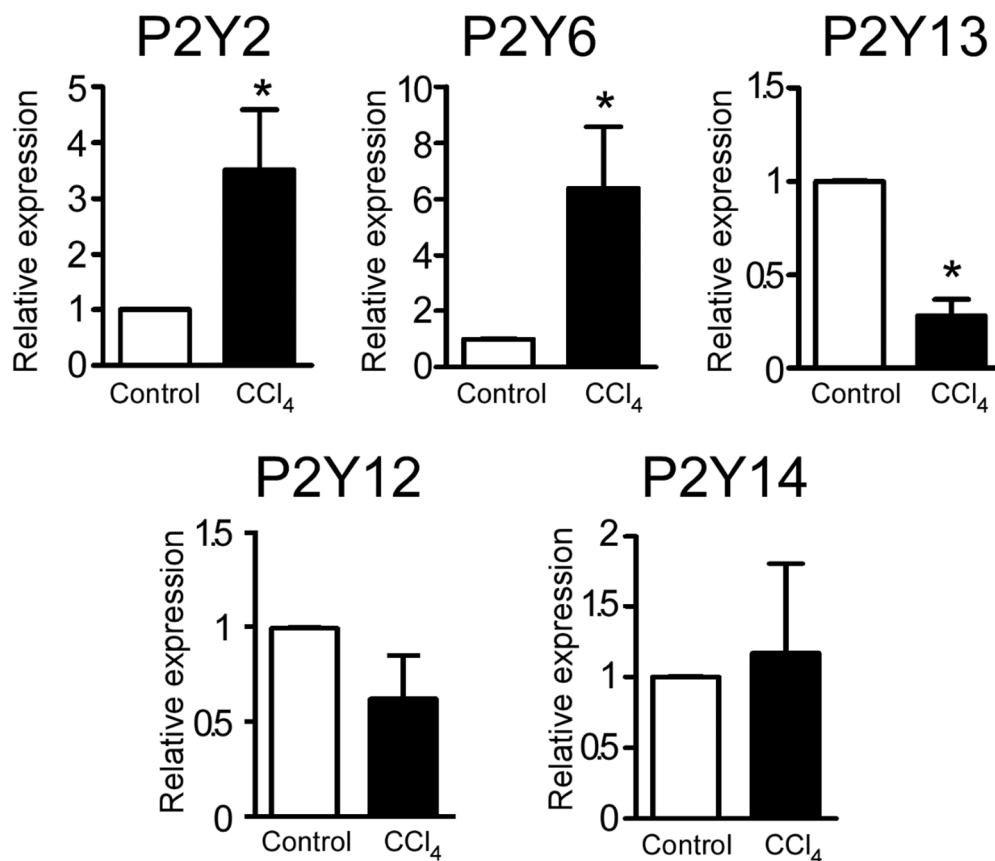


Figure 2. Effect of CCl₄-administration on the expression level of P2YRs in mouse liver homogenates. Relative expression level of *P2yr2*, *P2yr6*, *P2yr12*, *P2yr13* and *P2yr14* from vehicle- and CCl₄-injected mice analyzed by qPCR; data are expressed as fold of control group. * $p < 0.05$, Student's *t*-test. $n = 6$ for *P2yr2* and *P2yr6*; and 5 for *P2yr12*, *P2yr13* and *P2yr14*.

2.3. The Fibrotic State Induced by CCl₄ Alters the Distribution and Abundance of P2Y2R

P2Y2R abundance and expression patterns were analyzed by immunofluorescence. In the livers of control mice, P2Y2R showed a clear zonal distribution. P2Y2R was expressed in the perivascular region of both central and portal zones. In contrast, CCl₄ treatment elicited a general increment in the expression of P2Y2R in the entire liver (0.6 ± 0.1 vs. 1.8 ± 0.2 OD, for control and CCl₄ groups respectively, $p = 0.031$ Student's *t*-test, $n =$ three mice, three slides each), resulting in the loss of the P2Y2R hepatic zonation (Figure 3A,B). The increment in the expression level of P2Y2R in CCl₄-treated mice was confirmed by Western blotting (122 ± 24 vs. 179 ± 14 OD, control and CCl₄ groups respectively, $p = 0.036$, Student's *t*-test $n = 3$) (Figure 3C).

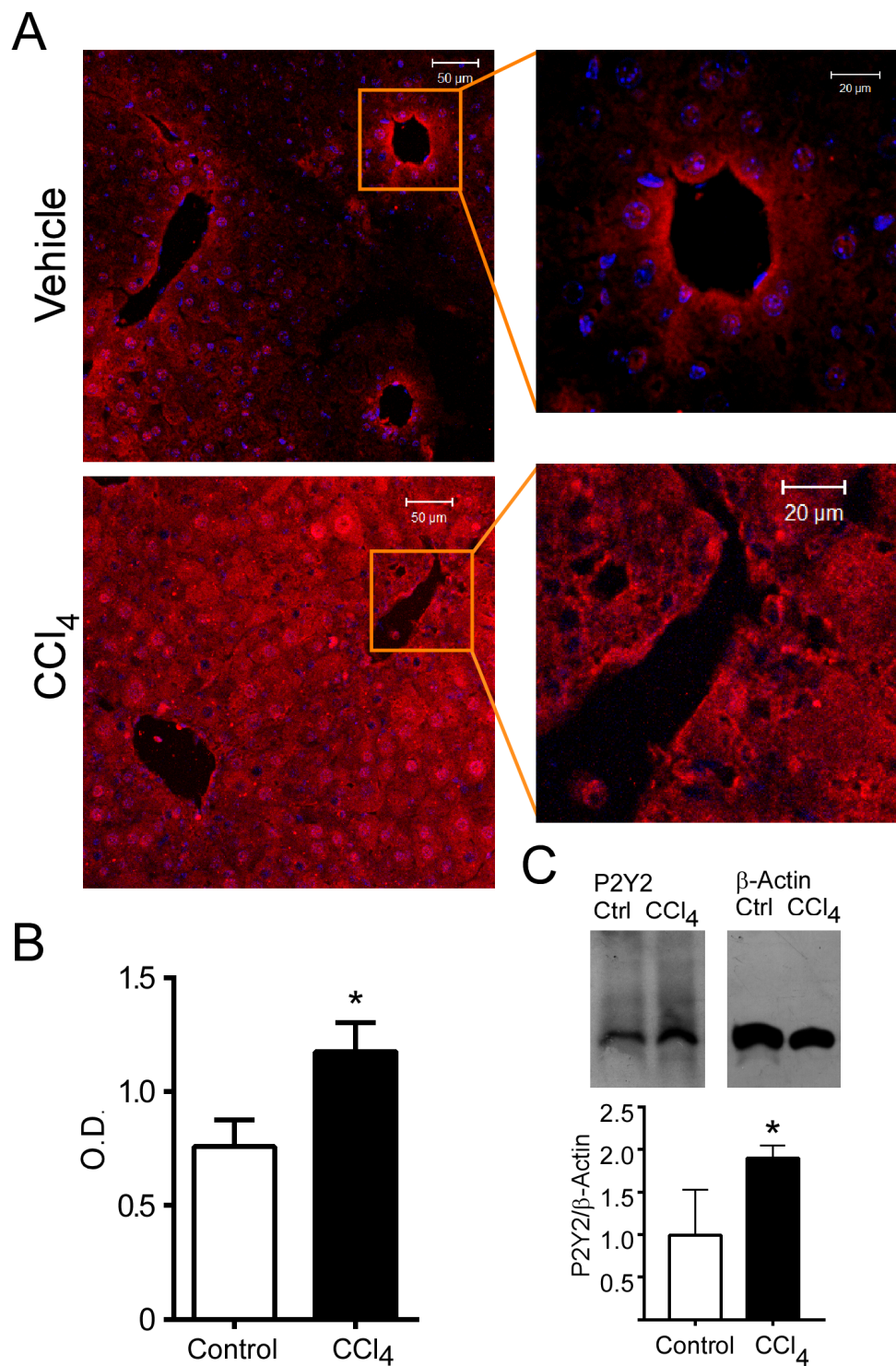


Figure 3. Detection of P2Y2R in liver sections from control and CCl₄-treated mice. (A) Liver slices (5 μm) from vehicle- and CCl₄-injected mice were labelled by immunofluorescence using a primary antibody directed against the carboxy end of the receptor and a secondary antibody coupled to Cy3 (red signal). (B) Total fluorescence was quantified, $n =$ three mice, three slides each, in (C) the expression level of P2Y2R was analyzed in samples from control and CCl₄-treated hepatocytes by Western blot and corrected against β-actin as constitutive protein, * $p < 0.05$ Student's t -test. $n = 3$.

2.4. P2Y2R Function is Exacerbated in Hepatocytes from CCl₄-Treated Mice

With the aim of verifying whether the changes observed in the expression levels of P2Y2R in fibrotic livers could have a functional impact, we decided to stimulate hepatocytes isolated from control or CCl₄-treated mice with purinergic agonists and evaluate ERK phosphorylation and cell viability. In control hepatocytes, pharmacological stimulation with ATP, UTP and UDP, at a 100 μ M concentration, showed a tendency to increment the phosphorylation level of ERK (298.4% \pm 100.6%, 250.1% \pm 59.9% and 90.7% \pm 22.0 % of basal, respectively, ns); however, in hepatocytes from fibrotic mice, the same protocol promoted significant elevations in ERK phosphorylation (357.3% \pm 92.4% for ATP, $p = 0.02$; 557.3% \pm 152.4% for UTP, $p = 0.02$ and 222.4% \pm 44.9% for UDP, $p = 0.03$; Student's t -test) (Figure 4A).

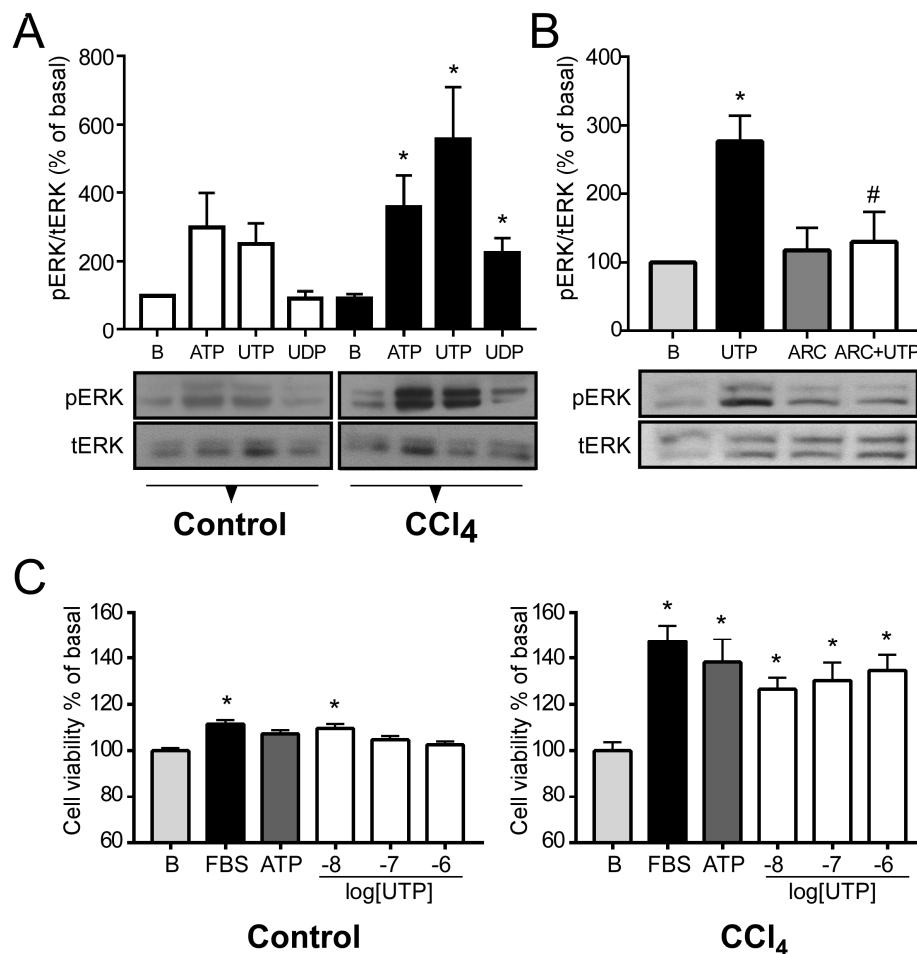


Figure 4. Analysis of P2Y2R function in primary cultured hepatocytes from control and fibrotic mice. (A) Induction of ERK phosphorylation by purinergic agonists in hepatocytes isolated from control and CCl₄-treated mice ($n =$ three controls and four treated). Hepatocytes were stimulated with 100 μ M of ATP, UTP and UDP for 5 min. Level of phosphorylated ERK (pERK) was analyzed by Western blot; membranes were striped and re-blotted against total ERK (tERK); the ratio pERK/tERK is shown. (B) Primary cultures of CCl₄-treated hepatocytes were stimulated for 5 min with 100 μ M of UTP with and without the P2Y2R antagonist ARC118925 (ARC) 1 μ M; the antagonist was preincubated for 20 min before the UTP addition ($n =$ three cultures). (C) Effect of FBS, ATP and UTP on cell viability in hepatocytes isolated from control and CCl₄-treated mice ($n =$ five for each group). Hepatocytes were isolated and cultured for 16 h; afterwards, they were cultured for 4 h in FBS-free culture medium. Then, they were cultured with the indicated stimulus for 24 h. Cell viability was estimated by the tetrazolium salt method (MTS). Data were normalized to control cells (cultured in FBS-free medium). * $p < 0.05$ Student's t -test vs. basal (B); # $p < 0.05$ Student's t -test vs. UTP.

To support the specificity of the UTP stimulus over P2Y2 receptor, we used the selective P2Y2R antagonist ARC118925 [13]; thus, ARC abolished the ERK phosphorylation induced by UTP ($277.1\% \pm 37.3\%$ and $130.2\% \pm 43.3\%$ of basal, respectively, $p = 0.04$, Student's *t*-test), showing that P2Y2R is mediating the UTP actions in primary cultures of mice hepatocytes (Figure 4B). The exclusive role of P2Y2R was supported by PCR analysis (Figure 2, Section 2.2) since no transcript of *P2ry4* was amplified in cDNAs of primary cultured hepatocytes, suggesting that P2Y4 is not expressed in this cell type.

In addition, we used the MTS assay to analyze the proliferative activity of primary hepatocyte cultures in response to different stimuli with the idea that mitochondrial activity would be directly related to cell proliferation. Although significantly different from basal levels (B) in both conditions, hepatocytes from CCl₄-treated mice were more sensitive to a mitogenic stimulus (FBS) than vehicle-treated hepatocytes ($147.4\% \pm 6.8\%$ vs. $111.0\% \pm 1.6\%$ of B respectively, $p < 0.0001$, Student's *t*-test) (Figure 4C). Stimulation with ATP only induced a response from hepatocytes from fibrotic livers ($138.2\% \pm 10.1\%$ vs $107.0\% \pm 1.6\%$ of B, for CCl₄ and control groups respectively, $p = 0.003$, Student's *t*-test). Hepatocytes from CCl₄-treated animals were more sensitive to stimulation with UTP. In hepatocytes from CCl₄-treated mice, 100 nM UTP elicited a response of $130.3\% \pm 7.6\%$ $p = 0.002$ vs B, Student's *t*-test; while in control hepatocytes the increment was only marginal, $106.5\% \pm 1.9\%$, ns. At 10 nM, values were of $126.5\% \pm 4.9\%$, ($p = 0.001$ vs B) and $111.1\% \pm 2.3\%$ ($p = 0.01$ vs B, Student's *t*-test) for CCl₄-treated and control groups respectively, (Figure 4C). Our results suggest that CCl₄ treatment sensitizes hepatocytes to purinergic stimuli, particularly those associated with P2Y2R signaling.

2.5. Analysis of Gene Expression in Response to UTP in Hepatocytes from CCl₄-Induced Fibrotic Mice

These results indicated that treatment with CCl₄ sensitized hepatocytes to show an enhanced response to P2Y2R-associated stimuli. Therefore, another aim of this project was to analyze changes in gene expression patterns induced by the UTP-activated P2Y2R, in order to identify the potential mechanisms of purine actions in the liver fibrotic context. To that end, we performed a microarray analysis in which almost 70% of the mouse genome was compared to cDNA obtained from primary cultures of hepatocytes that were isolated from CCl₄-treated or control animals and subsequently stimulated with UTP (100 μM) for 24 h (the data of this experiment were deposited in ArrayExpress-EMBL-EBI, accession number: E-MTAB-8302).

2.5.1. Differences in UTP-Dependent Transcriptional Response between Healthy and Fibrotic Hepatocytes

Evident changes were observed in the transcript identity pattern (Figure 5). Marked differences were identified in the number of transcripts that were up-regulated in hepatocytes from the CCl₄-treated group (541 vs. 411 in the control group; 32% increment, with 33 transcripts in common for both groups); as well as in the down-regulated transcripts, which showed the opposite outcome (191 vs. 374 for CCl₄-treated and control groups, respectively; a 49% difference, having 38 gene transcripts in common) (Figure 5). Differences were also observed in the transcripts that showed the highest degree of change, related to the z-score within the microarray, in up- and down-regulated transcripts comparing both conditions. Thus, transcripts modified in a control condition after UTP stimulation were related to activities associated with cell maintenance and metabolic pathways, whereas in fibrotic hepatocytes, UTP stimulation promoted a greater response in cell cycle- and DNA damage response-related transcripts (Supplementary Table S1). These results suggested that purinergic stimulation has a differential transcriptional effect on healthy and fibrotic hepatocytes.

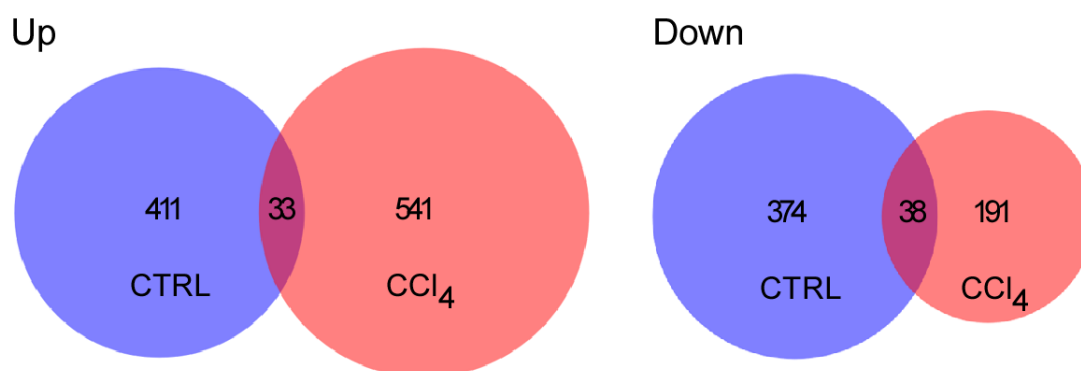


Figure 5. Analysis of gene expression patterns with microarrays of primary cultured hepatocytes stimulated with UTP, isolated from control and fibrotic mice. Venn diagrams representing number of transcripts up- and down-regulated in each condition after UTP stimulation, with the intersection representing the number of transcripts that changed in both settings.

2.5.2. Enhanced Proliferative Response in CCl₄-Treated Hepatocytes

Our results from the MTS experiments indicated that purinergic signaling through the P2Y₂R promotes proliferative activity in hepatocytes, therefore an analysis of our microarray results focused on evaluating whether this effect could be appreciated at a transcriptional level. We found several transcripts related with cell cycle and proliferation processes, which were up-regulated in a fibrotic condition after UTP stimulation, such as *Rpa3* and *Rbbp5*, involved in the progression of the cell cycle, as well as *Aatf* and *Zbtb17*, related to avoiding cell death or targeting cell cycle progression inhibitors (Table 1).

Table 1. Gene ontology analysis with the GeneCodis4 tool of signaling pathways and main transcripts modified by purinergic stimulation in CCl₄-treated hepatocytes.

Up-Regulated Transcripts			Down-Regulated Transcripts		
GO:0006281 DNA Repair			GO:0045944 Negative Regulation of Transcription by RNA Polymerase II		
Symbol	Z-score	Name	Symbol	Z-score	Name
<i>Fbxo18</i>	2.74	F-Box DNA Helicase 1	<i>Traf7</i>	−2.86	TNF Receptor Associated Factor 7
<i>Nthl1</i>	3.06	Nth Like DNA Glycosylase 1	<i>Rbl1</i>	−2.71	RB Transcriptional Corepressor Like 1
<i>Pold4</i>	3.81	DNA Polymerase Delta 4, Accessory Subunit	<i>Cdx4</i>	−2.65	Caudal Type Homeobox 4
<i>Rpa3</i>	5.51	Replication protein A	<i>Nfib</i>	−2.37	Nuclear Factor I B
<i>Eid3</i>	2.87	EP300 Interacting Inhibitor Of Differentiation 3	<i>Setdb1</i>	−2.21	SET Domain Bifurcated Histone Lysine
<i>Smc3</i>	3.05	Structural Maintenance Of Chromosomes 3	<i>Pkig</i>	−2.16	CAMP-Dependent Protein Kinase Inhibitor Gamma
GO:0006974 Cellular response to DNA damage stimulus			GO:0030336: Negative regulation of cell migration		
Symbol	Z-score	Name	Symbol	Z-score	Name
<i>Foxo1</i>	1.72	Forkhead Box O1	<i>Nkx2-1</i>	−2.21	NK2 Homeobox 1
<i>Aatf</i>	3.58	Apoptosis Antagonizing Transcription Factor	<i>Pdgfb</i>	−2.11	Platelet Derived Growth Factor Subunit B
<i>Zfp238</i>	2.27	Zinc Finger And BTB Domain Containing 18	<i>Dach1</i>	−2.06	Dachshund Family Transcription Factor 1
<i>Baz1b</i>	2.52	Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain 1B	<i>Erdr1</i>	−1.94	Erythroid differentiation regulator
<i>Uba6</i>	2.11	Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 6	<i>Arid2</i>	−1.89	AT-Rich Interaction Domain 2
<i>Rbbp5</i>	2.27	RB Binding Protein 5	<i>Rhob</i>	−1.9	Ras Homolog Family Member B

2.5.3. Detection of Potential Cellular Mechanisms Regulated by P2Y2R in Fibrotic Hepatocytes

Our aim was to then analyze the microarray results of purinergic stimulation on hepatocytes from CCl₄-treated animals, using the Gene Ontology tool GeneCodis4, with a focus on Biological Process analysis. Transcripts that showed up-regulated modification were annotated to the Biological pathways of DNA repair (GO:0006281) and cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974) while the down-regulated transcripts were mainly related to negative regulation of transcription by RNA polymerase II (GO:0045944) and negative regulation of cell migration (GO:0030336) (Table 1). Notably, most of the transcripts in the annotated pathways that showed a modification are related to the reparative response that allows for the replication processes (Supplementary Table S2). In addition, one of the results shown by the microarray analysis, in hepatocytes from CCl₄-treated mice, was the up-regulation of transcripts related to the Hypoxia-Induced Factor (HIF)-1 α pathway, such as both the α and β subunit of the HIF-1 complex (z-score = 1.5 and 2.28, respectively), as well as *Vegfa* (z-score = 1.5) which is a known target of the activation of this transcriptional regulator. This was an interesting finding as it was previously reported that the expression of P2Y2R is regulated by the α subunit of the HIF-1 complex [14] and suggests that this pathway could be a mechanism of regulation of the expression of the P2Y2R.

3. Discussion

Liver fibrosis is a pathological condition that constitutes the onset of many hepatic diseases with important clinical consequences. There is a growing body of evidence that associates purinergic signaling with the tissue damage response, including the liver [9,15]. Reports show that ATP can be released to the extracellular space by necrotic cells in both acute and chronic damage, promoting specific pathological responses associated with P2 receptors [16,17]. However, the underlying molecular and cellular mechanisms mediated by P2Y receptors in hepatotoxic-induced fibrosis remain to be elucidated. In the present work, we reproduced a well-known animal model of hepatic fibrosis (i.e., hepatotoxic CCl₄-administration for 4 weeks when fibrosis is still reversible) [10,11] and investigated the expression of P2YR transcripts. Results demonstrated that *P2yr2* and *P2yr6* transcript expression increased considerably in the fibrotic condition, whereas *P2yr13* transcript expression decreased (Figure 2). These observations indicate that the purinergic system is modified by the CCl₄-induced fibrotic process.

The enhanced expression of the *P2yr6* transcript in CCl₄-treated mice can correlate with the increase in ERK phosphorylation in response to UDP (Figure 4A), the most potent agonist of this purinergic receptor [18]. In contrast, the response to UDP was undetectable in hepatocytes from control animals, correlating with the low expression of P2Y6R in basal conditions (Figures 2 and 4A). Other reports have described the up-regulation of this receptor in acute and chronic states of inflammation in airway epithelial cells, and although this up-regulation has been associated with an inflammatory response [19,20], several findings have suggested that the role of P2Y6R, similar to that of the P2Y2R, could be mostly proliferative. UDP activation of this receptor can act as a growth factor in rat aortic smooth muscle [21] and also promote a proliferative response in rat theca cells [22,23], thus suggesting that P2Y6R also participates in the damage response in the initial events of the fibrotic process, perhaps by promoting proliferation as an adaptive response.

A decreased expression of the *P2yr13* transcript was also observed. P2Y13R belongs to a different subdivision of P2YRs because it couples to a G-protein with an α_i subunit [18]. P2Y13R in the liver has been associated with cholesterol metabolism, favoring the endocytosis of high-density cholesterol-carrying lipoproteins into hepatocytes, as well as their posterior excretion to the biliary duct [24]. It has been documented that elements of the cholesterol metabolism modulate the differentiation of immune cells in innate and adaptive immune systems, the response to inflammatory mediators, and their effects on macrophage migration and function [25]. This physiological process, which could potentially contribute to a successful damage resolution, may be attenuated in a pathological setting by down-regulating elements of this pathway such as P2Y13R. Nonetheless,

further experiments are required to assess any changes in the activation and functionality of P2Y₁₃R in the fibrotic condition.

Our results from qPCR, immunofluorescence and Western blot analyses showed an evident increased expression of P2Y₂R in the fibrotic condition. Since the signal associated with this receptor was mostly visible in hepatocytes, we performed a set of experiments in the primary cultures of these cells. However, further experiments are required to evaluate specific changes in the expression and function of purinergic signaling in other liver cell types.

To evaluate whether the elevated levels of P2Y₂R expression correlated with an increase in cellular responses, ERK phosphorylation and cell viability were analyzed after adding different purinergic agonists, including UTP in primary cultures of hepatocytes, and although this ligand is a selective agonist for P2Y₂ and P2Y₄R, we assumed that the effects are elicited mostly by P2Y₂R because the transcript of P2Y₄R was undetectable by qPCR. This was further confirmed by a blockade of the UTP-elicited increment in ERK phosphorylation with the P2Y₂R-specific antagonist, ARC 118925 (Figure 4B).

We showed that purinergic receptors in isolated mouse hepatocytes in primary cultures are activated by purinergic stimuli (ATP, UTP and UDP). However, when a proliferative response was evaluated in control conditions, there was no significant response to various doses of UTP, except for the smallest dose (10 nM). This unexpected result could be due to hepatocyte heterogeneity. It is well known that hepatocytes are a specialized cell type whose function varies depending on the hepatic lobule zone they occupy [26]. As we observed in our results (Figure 3), P2Y₂R in control conditions is not widely distributed throughout the entire tissue; on the contrary, the expression is mainly circumscribed to the pericentral zone. Hence, the effect of purinergic stimulation on hepatocytes in a control condition may comprise a heterogeneous and complex response. On the other hand, in hepatocytes stimulated with UTP (100 μM) from CCl₄-treated livers, the response of ERK phosphorylation increased more than 5-fold compared to controls. In this condition, we observed a proliferative response with FBS and from the lowest dose of UTP used, which could be due to the wide and homogeneous increase in P2Y₂R expression. Our results suggest that hepatocytes from CCl₄-treated mice are in a sensitized primed state to proliferate in response to purinergic stimuli. In this regard, it has been demonstrated that the reduction in the expression of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (ENTPD2), the enzyme that hydrolyses ATP to AMP, facilitated the proliferation of other liver cell types, such as bile duct epithelia [27]. This finding suggests that increasing nucleotide availability in the extracellular space could activate purinergic receptors, including P2Y₂R, which could then promote cellular proliferation. P2Y₂R is widely expressed in hepatocytes [28]; its activation promotes cellular survival during an inflammatory process associated with acute liver damage [16] and is required for cell cycle progression through the expression of cyclins and other essential elements for efficient hepatocyte proliferation [4]. Furthermore, several findings have associated P2Y₂R with proliferative and survival processes, such as partial hepatectomy [29] and hypoxic challenge [30,31], in animal models of liver growth. Supporting our findings, in a model of carcinogenesis-induction by DEN injection, it was recently described that in a P2Y₂R^{-/-} genetic background, DEN induced a smaller number of tumors and favored an early proliferative response upon toxic administration, indicating that cellular proliferation in response to liver injury, dependent on P2Y₂R, is relevant to the liver disease progression [8].

To better understand the potential mechanisms that can be mediated by P2Y₂R stimulated by UTP in a fibrotic condition, we used microarrays to evaluate potential variations in transcript expression patterns. First, the analysis showed that UTP promoted distinctive transcriptional patterns in both, control and CCl₄-treated hepatocytes, revealing notable differences in the role of extracellular purines and P2Y₂R activation. Particularly, in the fibrotic condition, transcripts that showed modification after purinergic stimulation were mainly related to proliferation and reparative responses to DNA damage as well as down-regulating the transcription of migration and proliferation inhibitors. These data correlated with our results from MTS experiments, suggesting that during a pro-fibrotic stimulus, purinergic stimulation could suppress inhibitory proliferation signals.

The hepatotoxic CCl_4 , after generating reactive aldehydes, can induce DNA stress and subsequent adduct-formation [32]. It has been demonstrated that elevating the availability of ATP, by attenuating the CD39 ectonucleotidase, promotes a protective response in a DNA-damage situation [33]. Furthermore, the stimulation of DNA damage responses and hepatocyte proliferation has been recently described using another murine model of hepatotoxic administration using DEN [8]. A reparative response to DNA stress for preventing cell death could be an important mechanism by which P2Y2R regulates the regeneration of damaged tissue.

An interesting observation was the down-regulation of transcripts related to the inhibition of the cell migration pathway. It has been described that hepatocytes are able to undergo the process of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and subsequent cell migration, after the activation of signaling pathways such as the TGF- β pathway [34]. Evidence shows that hepatocytes in primary culture can also sustain EMT after several days in culture, as a result of the loss of organ structure as well as interactions with the other liver cellular types [35]. Moreover, this effect has also been shown after treatment with the hepatotoxic CCl_4 [36]. Furthermore, it has been described that cellular proliferation, differentiation and migration are processes that play an important role in wound healing responses [37]. Hence, our results could suggest that, after treatment with a hepatotoxic, parenchymal cells show an enhanced phenotypical flexibility and that purinergic stimulation could then synergistically promote cellular migration as an early regenerative response to a stressful context.

On the other hand, among the transcripts that were up-regulated by UTP in hepatocytes from fibrotic livers, both subunits of the HIF-1 complex were detected. It has been widely described that, alongside other enzymatic and metabolic characteristics, oxygen regulates hepatocyte functions throughout the pro-oxidant gradient established between the highly oxygenated periportal zone and the lower oxygenated pericentral zone [26]. Previous evidence has demonstrated that P2Y2R is a direct target of HIF-1 α [14], and it is well described that this transcription factor induces the expression of other proliferative and survival genes in hypoxic conditions [38]. Hence, our findings suggest that the HIF-1 complex could be related to the expression of the purinergic receptor in a fibrotic condition to promote a proliferative response as part of the regenerative process after tissue damage. However, further investigations are needed to evaluate whether the increase in both expressions is oxygen-dependent or if there is an independent mechanism where HIF-1 α , along with purinergic signaling, can contribute to the onset and development of liver fibrosis.

Overall, in the present study we have demonstrated that, in the CCl_4 -induced fibrotic model, there is a differential expression of P2YRs, where uridine-sensitive receptors increase their expression. In this model, the P2Y2R-specific agonist, UTP, increased ERK phosphorylation and thus proliferative activity, suggesting that the enhanced purinergic signaling through P2Y2R activation in a fibrotic context could be promoting cell proliferation in the hepatic parenchyma during the early stage of hepatic chronic diseases as part of an abnormal regenerative response, and this role could account for the increase in its expression in this condition. Moreover, microarray analysis suggested that P2Y2R activity participates in the positive regulation of DNA-damage and repair responses and in promoting cellular migration by downregulating inhibitors of this process, undoubtedly opening new research directions.

4. Materials and Methods

4.1. Animals and Induction of Fibrosis with CCl_4

The induction of fibrosis was done based on previous reports [10,11]. Briefly, male C57BL/6 mice (6–8 weeks old) received CCl_4 diluted (1:3) in sterile corn oil (0.5 mL of the mix, equivalent to 1.6 g/kg body weight), administered via intraperitoneal (IP) injection three times a week for 4 weeks. Control animals received only corn oil. All the experiments were done in agreement with the Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999), a law that met the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook from the National

Institutes of Health-USA; the protocol was approved by the bioethics committee from Instituto de Neurobiología-UNAM (project number 84-A approved in November of 2015).

4.2. Histological Analysis

Liver sections were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Liver slices of 5 μm were stained using standard methods [39]. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used to assess tissue integrity, architecture, cytology and inflammation. Masson's Trichrome staining was used to outline collagen fibers with blue. The evaluation was done under histopathological criteria [40].

4.3. Mitotic Index

Liver samples were fixed in formalin and slices of 5 μm in thickness were obtained. Slices were stained with H&E. Mitotic events were counted in 72 fields from three livers per group (control or CCl_4) using a 40X objective. The mitotic index was defined as the average of the mitosis found per field [11].

4.4. Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

The expression level of *P2ry1*, *P2ry2*, *P2ry4*, *P2ry6*, *P2ry12*, *P2ry13* and *P2ry14* transcripts were analyzed by real-time PCR. After perfusion with phosphate buffer (PBS) (in mM: NaCl 136; KCl 2.7; Na_2HPO_4 10; KH_2PO_4 1.8, pH 7.4), a blood-free liver segment was collected, and total RNA was isolated by the guanidine isothiocyanate method [41]. RNA concentration was determined by spectrophotometry in a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and RNA integrity was corroborated by gel electrophoresis. Reverse transcription was performed from 1 μg of DNAase-treated RNA, with 0.25 μg of oligo dT and 200 U of reverse transcriptase M-MLV (Promega, WI, USA). Reactions of qPCR were made using 3 μL of a 1:5 cDNA dilution with 0.5 μM of oligonucleotides in a commercial qPCR master mix containing SYBR Green I (Roche, Mannheim, Germany), using a LightCycler 2.0 thermal cycler (Roche, Mannheim, Germany).

The oligonucleotides used for the reactions were: *P2yr1forward* TCCAAGAGTGAAGAAATGAC TC, *P2yr1reverse* GCTTCTTCTTGACCTGTGTAT, *P2yr2forward* ACCTGGAACCCTGGAATAG, *P2yr2reverse* AGGCGGCATAGGAAGATATAG; *P2yr4forward* CCTGGACTGGACTAAGGAA, *P2yr4reverse* TCAG AGGCAACAGGATGA; *P2yr6forward* TCTGGCACTTCCTCCTAAA, *P2yr6reverse* CTTGAAATCCTC ACGGTAGAC; *P2yr12forward* CAGTCTGCAAGTTCCACTAAC, *P2yr12reverse* TGGGTGATCTTGTA GTCTCTG; *P2yr13forward* GAGCTAGTAACTGCCACAAC, *P2yr13reverse* CAGGAAGACCACAGTAT AGAGA; *Cycaforward* AGCACTGGGGAGAAAGGATT, *Cycareverse* AGCCACTCAGTCTTGGCAGT; *Sod2forward* TGGACAAACCTGAGCCCTAA and *Sod2reverse* GACCCAAAGTCACGCTTGATA.

The amplification protocol was done as follows: an initial denaturation step of 600 s at 95 $^\circ\text{C}$, followed by 35 cycles at 95 $^\circ\text{C}$ for 10 s, 60 $^\circ\text{C}$ for 10 s and 72 $^\circ\text{C}$ for 12 s. Immediately, a melting analysis was realized with a 0.25 $^\circ\text{C}/\text{s}$ ramp from 55 to 95 $^\circ\text{C}$. Amplicons were sequenced and analyzed in the Blast platform (NIH, Bethesda, MA) to corroborate their identity. The best fit of housekeeping genes was determined with the Norm Finder software (Department of Molecular Medicine Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark). Transcript abundance was analyzed by the geometric mean of the Ct from two housekeeping genes (*Cyca* and *SOD2*). Relative quantification was calculated using the Pfaffl model [42].

4.5. Immunofluorescence

Liver tissue was fixed in 10% formalin, according to a previously reported protocol [43]. Liver slices of 5 μm were incubated with primary antibody against P2Y2R (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) at 1:150 dilution and with secondary antibody donkey anti-Rabbit IgG Cy3 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

We used ImagePro Plus software (Media cybernetics, MD, USA) to acquire images at 40 \times magnification and analyze fluorescence. The optical density (OD) was measured in negative (without primary antibody) and positive samples. To obtain the best representative data, we used stratified

sampling; three cytoplasmic measures of the same size per hepatocyte were obtained, analyzing 10 hepatocytes from the first line around the central or portal areas of the liver acinus. This procedure was repeated in five images per area for negative and five for positive reaction, both in central and portal areas. In the end, signal quantification involved 150 measurements from negative and positive slides. By subtracting the negative value from the positive signal, the relative levels of fluorescence for central and portal areas were obtained. Graphs represent an average of three mice per group (Control and CCl₄).

4.6. Hepatocyte Isolation

For hepatocyte isolation [44], C57BL/6 mice were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine (1:25 mg/kg of body weight) and placed in a thermostable bed at 37 °C to undergo a laparotomy. After the liver was localized, the hepatic-portal vein was cannulated, and the cava vein was cut to allow solution flow. The liver was then perfused with 50 mL of solution A (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 500 μM, Na₂HPO₄ 800 μM, HEPES 9.9 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, EGTA 500 μM, Glucose 5 mM, pH 7.4, at 37 °C) and 50 mL of collagenase (Worthington, Lakewood, NJ, USA) dissolved (1 mg/mL) in solution B (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄ 500 μM, Na₂HPO₄ 800 μM, HEPES 9.9 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, CaCl₂ 3.8 mM pH 7.4). Then, the liver was dissected in a Petri dish containing 20 mL of William's E Medium (Sigma Chemical, Saint Louis, MO, USA). Cell suspension was fractionated using Percoll at 10% in Hank's solution (pH 7.4) to obtain the hepatocyte fraction [45]. Cell viability was analyzed using trypan blue staining. Hepatocytes were cultured for a maximum of 24 h in DMEM-F12 complemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and a streptomycin-penicillin mixture at 37 °C in an atmosphere of 95% air with 5% CO₂.

4.7. Analysis of the Induction of ERK Phosphorylation and P2Y2R by Western blot

Detection of P2Y2R in mice homogenates as well as the induction of ERK phosphorylation by purinergic agonists in primary cultures of hepatocytes was accomplished by Western blot. For ERK phosphorylation, the induction protocol was as follows. Briefly, hepatocytes were cultured in 12-well plates for 16 h; afterwards, the medium was changed to serum-free medium for 3 h. Then, the experimental treatment (UTP (Sigma Chemical, USA) 100 μM; ARC118925 (Tocris Bioscience UK) 1 μM or both was applied and the hepatocytes were lysed in Laemmli solution (in mM: 125 Tris-HCl, 350 SDS, 200 glycerol, 20 β-mercaptoethanol and 0.03 bromophenol blue); homogenates were collected and boiled for 5 min. Total and phosphorylated ERK were detected through SDS-PAGE according to previously published protocols [22]. In a first blot, p-ERK was detected; afterwards the membrane was stripped with acid glycine solution (200 mM Glycine, 1% tween-20, pH 2.2) and blotted against t-ERK. Primary antibodies were from Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), anti-total ERK #4695 and anti-phosphorylated ERK #4370 were used in dilution 1:1000. Secondary antibodies (Invitrogen; Rockford, IL, USA), coupled to horseradish peroxidase (HRP), were used in a 1:5000 dilution. The signal was detected by chemiluminescence and autoradiography. The expression level of P2Y2 receptor in primary cultures of control or CCl₄-treated hepatocytes was also analyzed by Western blotting; the primary antibody utilized was from Novus Biologicals (Centennial, CO, USA), #NB110-39032 and the protocol used was identical to ERK detection.

4.8. Cell Viability Assay

MTS assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) was used to measure cell viability, following the manufacturer's protocol (Promega, USA). Briefly, hepatocytes were seeded into 48-well plates at a cell density of 1 × 10⁴ cells per well in DMEMF-12 with 10% FBS. Cells were then treated with UTP for 24 h. MTS reagent, diluted in serum free medium, was added to each well and incubated for 2 to 4 h until intracellular brown precipitates were visible; then, absorbance was recorded in a 96-well plate and quantified at 490 nm with a Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.9. cDNA Microarray Analysis

Microarrays were performed in the Microarray Unit at the Institute of Cellular Physiology (UNAM, CDMX, Mexico). Primary cultures of hepatocytes from control and CCl₄-treated animals were incubated for 24 h with medium or 100 μM UTP [46]. Briefly, RNA was purified through the Trizol method following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, cDNA synthesis was achieved with 10 μg of total RNA and using the First-Strand cDNA labeling kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), both dUTP-Alexa555 or dUTP-Alexa647 were incorporated. Fluorescence emission was analyzed at 555 and 650 nm for Alexa555 and Alexa647, respectively. Labeled cDNA was then hybridized against an array of 22,000 transcripts that comprise 70% of the mouse genome; the array contained 65-mer oligo library from Sigma-Genosys (<https://www.sigmaldrich.com/life-science/custom-oligos.html>). Array images were acquired and quantified using GenePix 4100A software (OMICtools, RRID:SCR_002250) from Molecular Devices (Sunnyvale, San Jose, CA, USA). Values of mean density of both fluorescent probes and mean background were calculated and microarray data analysis was performed with free genArise software (genArise, RRID:SCR_001346) developed in the Computing Unit of the Institute of Cellular Physiology (UNAM, Mexico) (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise identifies different gene expression patterns by calculating an intensity-dependent Z-score, where z stands for the number of standard deviations a datapoint is from the mean. Considering this criterion, elements with a z-score > 2 standard deviations would be the transcript genes significantly expressed differentially. To perform the bioinformatics analysis and with the aim of identifying the physiological roles of genes regulated by UTP in both conditions, control and fibrotic, we ran an ontological analysis with the available online software of Gene Ontology, GeneCoDis4 (<https://genecodis.genyo.es/>) (reviewed from January to February 2020) [47–49]. For gene annotation, information was obtained from the database Genecards (<https://www.genecards.org/>) (reviewed on February 2020). Data were deposited in ArrayExpress-EMBL-EBI, accession number: E-MTAB-8302.

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/7/2305/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, F.G.V.-C., E.V.-M. and M.D.-M.; methodology, F.G.V.-C., C.M.-A., A.G.-G. and E.V.-M.; validation, F.G.V.-C., E.V.-M. and M.D.-M.; formal analysis, E.V.-M., C.M.-A., A.G.-G. and O.V.-M.; investigation, F.G.V.-C., E.V.-M., C.M.-A., A.G.-G. and O.V.-M.; resources, F.G.V.-C., and M.D.-M.; writing—original draft preparation, F.G.V.-C. and E.V.-M.; writing—Review and Editing F.G.V.-C., E.V.-M. and M.D.-M.; supervision, F.G.V.-C.; funding acquisition, F.G.V.-C. and M.D.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by PAPIIT-UNAM, numbers IN201017 and IN 202620 to F.G.V.-C. and IN201618 to M.D.-M., and CONACyT-México, number 284-557 to M.D.-M.

Acknowledgments: We are grateful to Jessica González Norris for proofreading. We are also grateful to MVZ Martín García Servín, Alejandra Castilla León and Ing. Nydia Hernández Ríos. Erandi Velázquez Miranda is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received fellowship from CONACyT, number: 473519.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413–492. [PubMed]
2. Dixon, C.J.; White, P.J.; Hall, J.F.; Kingston, S.; Boarder, M.R. Regulation of human hepatocytes by P2Y receptors: Control of glycogen phosphorylase, Ca²⁺, and mitogen-activated protein kinases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313*, 1305–1313. [CrossRef]
3. Thevananther, S.; Sun, H.; Li, D.; Arjunan, V.; Awad, S.S.; Wyllie, S.; Zimmerman, T.L.; Goss, J.A.; Karpen, S.J. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* **2004**, *39*, 393–402. [CrossRef] [PubMed]

4. Tackett, B.C.; Sun, H.; Mei, Y.; Maynard, J.P.; Cheruvu, S.; Mani, A.; Hernandez-Garcia, A.; Vigneswaran, N.; Karpen, S.J.; Thevananther, S. P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *307*, G1073–G1087. [[CrossRef](#)]
5. Szabo, G.; Petrasek, J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *12*, 387–400. [[CrossRef](#)]
6. Adinolfi, E.; Giuliani, A.L.; De Marchi, E.; Pegoraro, A.; Orioli, E.; Di Virgilio, F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *151*, 234–244. [[CrossRef](#)]
7. Franceschini, A.; Capece, M.; Chiozzi, P.; Falzoni, S.; Sanz, J.M.; Sarti, A.C.; Bonora, M.; Pinton, P.; Di Virgilio, F. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J.* **2015**, *29*, 2450–2461. [[CrossRef](#)]
8. Schulien, I.; Hockenjos, B.; van Marck, V.; Ayata, C.K.; Follo, M.; Thimme, R.; Hasselblatt, P. Extracellular ATP and purinergic P2Y2 receptor signaling promote liver tumorigenesis in mice by exacerbating DNA damage. *Cancer Res.* **2019**, *80*, 699–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Iracheta-Vellve, A.; Petrasek, J.; Satishchandran, A.; Gyongyosi, B.; Saha, B.; Kodys, K.; Fitzgerald, K.A.; Kurt-Jones, E.A.; Szabo, G. Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 1147–1155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Mortezaee, K.; Sabbaghziarani, F.; Omid, A.; Dehpour, A.R.; Omid, N.; Ghasemi, S.; Pasbakhsh, P.; Ragerdi Kashani, I. Therapeutic value of melatonin post-treatment on CCl4-induced fibrotic rat liver. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2016**, *94*, 119–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hernández-Muñoz, R.; Díaz-Muñoz, M.; Suárez-Cuenca, J.A.; Trejo-Solís, C.; López, V.; Sánchez-Sevilla, L.; Yáñez, L.; De Sánchez, V.C. Adenosine reverses a preestablished CCl4-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* **2001**, *34*, 677–687. [[CrossRef](#)]
12. Dreisig, K.; Kornum, B.R. A critical look at the function of the P2Y11 receptor. *Purinergic Signal.* **2016**, *12*, 427–437. [[PubMed](#)]
13. Rafehi, M.; Burbiel, J.C.; Attah, I.Y.; Abdelrahman, A.; Müller, C.E. Synthesis, characterization, and in vitro evaluation of the selective P2Y2 receptor antagonist AR-C118925. *Purinergic Signal.* **2017**, *13*, 89–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kraus, A.; Grampp, S.; Goppelt-Struebe, M.; Schreiber, R.; Kunzelmann, K.; Peters, D.J.M.; Leipziger, J.; Schley, G.; Schödel, J.; Eckardt, K.-U.; et al. P2Y2R is a direct target of HIF-1 α and mediates secretion-dependent cyst growth of renal cyst-forming epithelial cells. *Purinergic Signal.* **2016**, *12*, 687–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hoque, R.; Sohail, M.A.; Salhanick, S.; Malik, A.F.; Ghani, A.; Robson, S.C.; Mehal, W.Z. P2X7 receptor-mediated purinergic signaling promotes liver injury in acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2012**, *302*, G1171–G1179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ayata, C.K.; Ganal, S.C.; Hockenjos, B.; Willim, K.; Vieira, R.P.; Grimm, M.; Robaye, B.; Boeynaems, J.M.; Di Virgilio, F.; Pellegatti, P.; et al. Purinergic P2Y₂ receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury. *Gastroenterology* **2012**, *143*, 1620–1629. [[CrossRef](#)]
17. Chatterjee, S.; Rana, R.; Corbett, J.; Kadiiska, M.B.; Goldstein, J.; Mason, R.P. P2X7 receptor-NADPH oxidase axis mediates protein radical formation and Kupffer cell activation in carbon tetrachloride-mediated steatohepatitis in obese mice. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 1666–1679. [[CrossRef](#)]
18. Von Kügelgen, I.; Harden, T.K. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv. Pharmacol.* **2011**, *61*, 373–415.
19. Warny, M.; Aboudola, S.; Robson, S.C.; Sévigny, J.; Communi, D.; Soltoff, S.P.; Kelly, C.P. P2Y(6) nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26051–26056. [[CrossRef](#)]
20. Vieira, R.P.; Müller, T.; Grimm, M.; von Gernler, V.; Vetter, B.; Dürk, T.; Cicko, S.; Ayata, C.K.; Sorichter, S.; Robaye, B.; et al. Purinergic receptor type 6 contributes to airway inflammation and remodeling in experimental allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *184*, 215–223. [[CrossRef](#)]

21. Hou, M.; Harden, T.K.; Kuhn, C.M.; Baldetorp, B.; Lazarowski, E.; Pendergast, W.; Möller, S.; Edvinsson, L.; Erlinge, D. UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y₆ receptors. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2002**, *282*, H784–H792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Vázquez-Cuevas, F.G.; Zárate-Díaz, E.P.; Garay, E.; Arellano, R.O. Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2010**, *8*, 88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zimmermann, H.; Mishra, S.K.; Shukla, V.; Langer, D.; Gampe, K.; Grimm, I.; Delic, J.; Braun, N. Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **2007**, *73*, 537–566.
24. Lichtenstein, L.; Serhan, N.; Espinosa-Delgado, S.; Fabre, A.; Annema, W.; Tietge, U.J.F.; Robaye, B.; Boeynaems, J.-M.; Laffargue, M.; Perret, B.; et al. Increased atherosclerosis in P2Y₁₃/apolipoprotein E double-knockout mice: Contribution of P2Y₁₃ to reverse cholesterol transport. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *106*, 314–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Spann, N.K.; Glass, C.K. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kietzmann, T. Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 622–630. [[CrossRef](#)]
27. Jhandier, M.N.; Kruglov, E.A.; Lavoie, E.G.; Sévigny, J.; Dranoff, J.A. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22986–22992. [[CrossRef](#)]
28. Beldi, G.; Wu, Y.; Sun, X.; Imai, M.; Enjyoji, K.; Csizmadia, E.; Candinas, D.; Erb, L.; Robson, S.C. Regulated catalysis of extracellular nucleotides by vascular CD39/ENTPD1 is required for liver regeneration. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 1751–1760. [[CrossRef](#)]
29. Graubardt, N.; Fahrner, R.; Trochsler, M.; Keogh, A.; Breu, K.; Furer, C.; Stroka, D.; Robson, S.C.; Slack, E.; Candinas, D.; et al. Promotion of liver regeneration by natural killer cells in a murine model is dependent on extracellular adenosine triphosphate phosphohydrolysis. *Hepatology* **2013**, *57*, 1969–1979. [[CrossRef](#)]
30. Tak, E.; Jun, D.Y.; Kim, S.-H.; Park, G.-C.; Lee, J.; Hwang, S.; Song, G.-W.; Lee, S.-G. Upregulation of P2Y₂ nucleotide receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *J. Int. Med. Res.* **2016**, *44*, 1234–1247. [[CrossRef](#)]
31. Carini, R.; Alchera, E.; De Cesaris, M.G.; Splendore, R.; Piranda, D.; Baldanzi, G.; Albano, E. Purinergic P2Y₂ receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J. Hepatol.* **2006**, *45*, 236–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Weber, L.W.D.; Boll, M.; Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* **2003**, *33*, 105–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aho, J.; Helenius, M.; Vattulainen-Collanus, S.; Alastalo, T.P.; Koskenvuo, J. Extracellular ATP protects endothelial cells against DNA damage. *Purinergic Signal.* **2016**, *12*, 575–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Caja, L.; Bertran, E.; Campbell, J.; Fausto, N.; Fabregat, I. The transforming growth factor-beta (TGF-β) mediates acquisition of a mesenchymal stem cell-like phenotype in human liver cells. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 1214–1223. [[CrossRef](#)]
35. Cicchini, C.; Amicone, L.; Alonzi, T.; Marchetti, A.; Mancone, C.; Tripodi, M. Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte. *Liver Int.* **2015**, *35*, 302–310. [[CrossRef](#)]
36. Zeisberg, M.; Yang, C.; Martino, M.; Duncan, M.B.; Rieder, F.; Tanjore, H.; Kalluri, R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 23337–23347. [[CrossRef](#)]
37. Aragona, M.; Dekoninck, S.; Rulands, S.; Lenglez, S.; Mascré, G.; Simons, B.D.; Blanpain, C. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14684. [[CrossRef](#)]
38. Ke, Q.; Costa, M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1469–1480. [[CrossRef](#)]
39. Lee, L.B.H. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *American Registry of Pathology*; McGraw-Hill Book Company: New York, NY, USA, 1968; Volume 3, p. 258.
40. McGavin, M.D.; Carlton, W.W.; Zachary, J.F. *Thomson's Special Veterinary Pathology*, 3rd ed.; Mosby Publication: Maryland Heights, MO, USA, 2001.
41. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156–159. [[CrossRef](#)]
42. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]

43. Rivera-Zavala, J.B.; Molina-Aguilar, C.; Pérez-Mendoza, M.; Olguín-Martínez, M.; Hernández-Muñoz, R.; Báez-Ruiz, G.A.; Díaz-Muñoz, M. Daytime restricted feeding modifies the daily regulation of fatty acid β -oxidation and the lipoprotein profile in rats. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117*, 930–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mederacke, I.; Dapito, D.H.; Affò, S.; Uchinami, H.; Schwabe, R.F. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 305–315. [[CrossRef](#)]
45. Vázquez-Victorio, G.; Caligaris, C.; Del Valle-Espinosa, E.; Sosa-Garrocho, M.; González-Arena, N.R.; Reyes-Cruz, G.; Briones-Orta, M.A.; Macías-Silva, M. Novel regulation of Ski protein stability and endosomal sorting by actin cytoskeleton dynamics in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 4487–4499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Martínez-Ramírez, A.S.; Díaz-Muñoz, M.; Battastini, A.M.; Campos-Contreras, A.; Olvera, A.; Bergamin, L.; Glaser, T.; Jacintho Moritz, C.E.; Ulrich, H.; Vázquez-Cuevas, F.G. Cellular Migration Ability Is Modulated by Extracellular Purines in Ovarian Carcinoma SKOV-3 Cells. *J. Cell. Biochem.* **2017**, *118*, 4468–4478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tabas-Madrid, D.; Nogales-Cadenas, R.; Pascual-Montano, A. GeneCodis3: A non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, W478–W483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Nogales-Cadenas, R.; Carmona-Saez, P.; Vazquez, M.; Vicente, C.; Yang, X.; Tirado, F.; Carazo, J.M.; Pascual-Montano, A. GeneCodis: Interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W317–W322. [[CrossRef](#)]
49. Carmona-Saez, P.; Chagoyen, M.; Tirado, F.; Carazo, J.M.; Pascual-Montano, A. GENECODIS: A web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R3. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).