

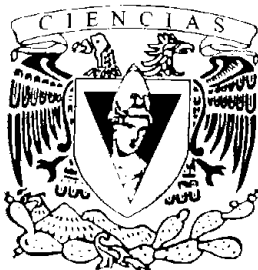


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE
LAS BMPs (PROTEÍNAS FORMADORAS DE HUESO)
DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

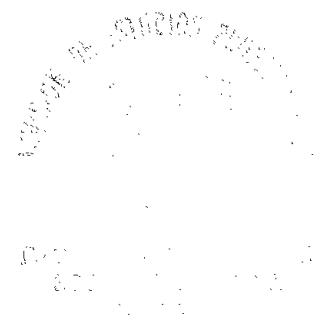
T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ENRIQUE GUTIERREZ SANCHEZ



DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARINA MACIAS SILVA

2005

m. 340673





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Adjunto a la Dirección General de Substitución de la
Ciudad a Ciudad en los casos de migración a seguir el
contenido de mi trabajo profesional.

NOMBRE: Enrique Gutiérrez

Sánchez

FECHA: 02-Febrero-05

FIRMA: [Firma]



VICERRECTORÍA NACIONAL
AVENIDA IT
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización de la vía de transducción de las BMPs (Proteínas Formadoras de Hueso) durante la regeneración hepática".

realizado por Enrique Gutiérrez Sánchez

con número de cuenta 8814479-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Marina Macías Silva

Marina Macías Silva

Propietario

Dra. Rocío Alcántara Hernández

Rocío Alcántara Hernández

Propietario

Biol. Marcela Sosa Garrocho

Marcela Sosa Garrocho

Suplente

M.V.Z. Héctor Alfonso Malagón Rivero

Héctor Alfonso Malagón Rivero

Suplente

Biol. David Garcíadiego Cázares

David Garcíadiego Cázares

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en G. Juan Manuel Rodríguez Chávez

Esta tesis fue realizada en el departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Marina Macías Silva.

Este proyecto fue apoyado por los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36676-N) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/DGAPA/UNAM (IN218501 y IN230504).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Instituto de Fisiología Celular y a la Facultad de Ciencias.

A la Dra. Marina Macías Silva mi más sincero agradecimiento por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y apoyarme con su acertada dirección en el desarrollo de esta investigación.

A mis profesores durante la carrera.

A la Bióloga Marcela Sosa por su enseñanza y por su colaboración técnica en la realización de este trabajo.

A mis compañeros Alicia Álvarez y José Miguel Ramos por su ayuda para la realización de este trabajo.

Al M. V. Z. Héctor Alfonso Malagón por toda su ayuda en el manejo de los roedores del Bioterio del IFC utilizados para la realización de este tesis.

A los integrantes de mi jurado por la lectura y acertados comentarios al trabajo: Dra. Marina Macías Silva, Dra. Rocío Alcántara Hernández, Biol. Marcela Sosa Garrocho, Biol. David Garcíadiego Cazares y M. V. Z. Héctor Alfonso Malagón Rivero.

A todos mis compañeros del laboratorio 225 Norte del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por brindarme su amistad y apoyo.

A todos aquellos que han contribuido en mi formación académica y que en este momento sin querer haya omitido.

Dedico esta tesis con mucho cariño a:

Mis padres, Clara y Julio, a quienes les debo todo lo que he logrado en la vida.

A mi esposa Martha Lidia, por su cariño, comprensión y paciencia.

A mis hijos Martha Jazmín y Luis Enrique por iluminar mi vida.

A mis hermanas Luz Elvira y Clara y a mis hermanos Gerardo, Rafael, Julio y Héctor por sus consejos y apoyo.

A todos mis familiares y amigos.

A todos quienes de alguna manera contribuyeron para el buen termino de mi licenciatura, también a quienes sin querer haya omitido, solo tengo que decirles
¡Gracias!

INDICE

Resumen.....	5
Abreviaturas.....	6
I. Introducción.....	8
1. La superfamilia del TGF- β	8
2. Funciones de las BMPs.....	10
3. Estructura de los miembros de la superfamilia del TGF- β	11
4. Vía de señalización del TGF- β	12
5. Las proteínas Smad.....	15
6. El hígado y sus funciones.....	16
7. Regeneración hepática.....	19
8. Hepatotoxicidad y acción del tetracloruro de carbono.....	21
9. Fibrosis hepática.....	23
II. Antecedentes.....	26
III. Objetivos.....	28
IV. Hipótesis.....	29
V. Materiales y Métodos.....	30
VI. Resultados.....	38

VII. Discusión.....	46
VIII. Conclusiones.....	50
IX. Referencias.....	51

RESUMEN

La vía de transducción de señales de las proteínas formadoras de hueso (BMPs) es importante durante la hepatogénesis, debido a que estas señales son necesarias en el endodermo para establecer un fenotipo celular hepático durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, se desconoce si las BMPs son importantes en el hígado adulto y durante el proceso de regeneración hepática, en donde se recapitulan algunas de las etapas de la hepatogénesis. El objetivo principal de este trabajo es estudiar la vía de señalización de las BMPs y caracterizar el estado de activación de la vía durante la regeneración del hígado después de provocarle un daño con tetracloruro de carbono (CCl₄), analizando principalmente el estado de activación de Smad1 durante este proceso. La idea de este trabajo surgió en estudios realizados por K. Flanders y A. Roberts, en donde observan que en hígados de ratones de 15 días de nacidos la vía BMP/Smad1 esta activada al localizar a las proteínas Smad1 dentro del núcleo de los hepatocitos (Flanders K, et al, 2001).

Utilizamos ratas Wistar, a las que se les inyectó una sola dosis de CCl₄ provocando un daño agudo que induce la regeneración hepática. Se colectaron muestras de hígado a distintos tiempos desde las 2 horas y hasta las 4 semanas después del tratamiento. Las muestras se procesaron tanto para aislar RNA total, como para obtener extractos de proteínas nucleares. Se analizaron los niveles de expresión de RNAs mensajeros de las BMPs y de las proteínas Smads mediante RT-PCR y Northern blot respectivamente. Los niveles de expresión de las proteínas Smad 1 y 4 fueron analizados mediante Western blot. También se aislaron diferentes tipos de células hepáticas y se estudio su respuesta a BMP-2. Los resultados muestran que la vía de las BMPs se encuentra activada tanto en hígado en estado quiescente como en hígado en proceso regenerativo, es decir se detectaron altos niveles de la proteína Smad1 fosforilada en tales condiciones. También se observó un ligero incremento en los niveles del RNAm de la BMP-7 al inicio del proceso regenerativo. Además, se observó que los hepatocitos y las células estrelladas hepáticas son sensibles a la BMP-2, puesto que el tratamiento con BMP-2 indujo la fosforilación de Smad1. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la vía de señalización de las BMPs se encuentra activada durante el proceso de regeneración del hígado, lo que puede considerarse de gran importancia para mantener una adecuada homeostasis y conservar el fenotipo en las células hepáticas.

ABREVIATURAS

ACE:	“Angiotensin Converter Enzyme” (Enzima convertidora de angiotensina)
ActR:	Receptor de activina
ALK:	“Activin like kinases” (Cinasas tipo receptor de activina)
AMPC:	Adenosín monofosfato cíclico
ATP:	Adenosína trifosfato
BAMBI:	“BMP and Activin membrane binding inhibitor” (inhibidor unido a membrana de activina y BMP)
BMP:	“Bone Morphogenetic Proteins” (Proteínas morfogenéticas de hueso)
BMPR:	Receptores de BMPs
CCl ₄ :	Tetracloruro de carbono
CCl ₃ :	Triclorometil
CDK:	“Cyclin Dependent Kinase” (Cinasa dependiente de ciclina)
CHX:	Cicloheximida
CO ₂ :	Bióxido de carbono
Dad:	“Daughters against dpp” (Hijas contra dpp)
DNA:	“Desoxirribonucleic acid” (Ácido desoxirribonucléico)
Dpp:	Decapentaplégico
EGF:	“Epidermal Growth Factor” (Factor de crecimiento epidérmico)
ET:	Endotelina
FGF:	“Fibroblast Growth Factor” (Factor de crecimiento de fibroblastos)
GDF:	“Growth Differentiation Factor” (Factores de diferenciación y crecimiento)
GDNFs:	“Glia Derived Neurotrophic Factors” (Factores Neurotróficos Derivados de la Glía)
GSK:	“Glucogen Synthetase Kinase” (Cinasa de la sintetasa del glucógeno)
HB-EGF:	“Heparin Binding Epidermal Growth Factor” (Factor de crecimiento epidérmico unido a heparina)
HP:	“Partial hepatectomy” (hepatectomía parcial)
HSC:	“Hepatic Stellate Cells” (células estrelladas hepáticas)
Id:	Inhibidor de diferenciación
IFN- γ :	Interferon- γ
IOR:	Intermediarios de oxígeno reactivo
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trifosfato
I-Smads:	Smads inhibidoras
KC:	“Kupffer cells” (células de Kupffer)
KGF:	“Keratinocyte Growth Factor” (Factor de crecimiento del queratinocito)
LAP:	“Latency Associated Peptide” (Proteína o péptido asociado a la latencia)
LTBP:	“Latent TGF- β Binding Protein” (Proteína unida al TGF- β latente)
MAD:	“Mother Against Dpp”
MCP:	“Monocyte Chemotactil Protein” (Proteína quimiotáctil del monocito)
MEC:	<u>Matriz extracelular</u>
MMPs:	Metaloproteinasas de matriz
NF:	“Nuclear Factor” (Factor nuclear)
NO:	“Nitric oxide” (Óxido nítrico)
PA:	“Plasminogen Activator” (Activador del plasminógeno)

PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAI:	“Plasminogen Activator Inhibitor” (Inhibidor del Activador del plasminógeno)
PBS:	“Phosphates buffer solution” (solución amortiguadora de fosfatos)
PDGF:	“Platelet Derived Growth Factor” (Factor de crecimiento derivado de plaquetas)
PUFA:	“Polyunsaturated fatty acid” (Ácido graso poliinsaturado)
RNA _m :	RNA mensajero
RNA:	“Ribonucleic acid” (ácido ribonucleico)
RTK:	Receptor con actividad de cinasa de residuos de tirosina
SDS:	“Sodium dodecyl sulfate” (Dodecil sulfato de sodio)
Smurf:	Factores reguladores de ubiquitinización de las Smads
STAT:	“Signal transducer-and-activator of transcription protein” (proteína transductora de señales y activadora de la transcripción).
TβR:	Receptores del TGF-β
TGF-α:	“Transforming Growth Factor alpha” (factor de crecimiento transformante alfa)
TGF-β:	“Transforming Growth Factor beta” (factor de crecimiento transformante beta)
TIMP:	“Tissue Inhibitors of Metaloproteinasas” (Inhibidores tisulares de Metaloproteinasas)
TNF:	“Tumor necrosis factor” (Factor de necrosis tumoral)

“CARACTERIZACION DE LA VIA DE TRANSDUCCION DE LAS BMPs (PROTEINAS FORMADORAS DE HUESO) DURANTE LA REGENERACION HEPATICA”

I. INTRODUCCION.

1. LA SUPERFAMILIA DEL TGF- β .

Los factores de crecimiento transformante- β , (TGF- β s), las activinas y las proteínas formadoras de hueso (BMPs) pertenecen a la superfamilia del TGF- β . El TGF- β es el miembro prototipo de la familia y es el más estudiado debido a la gran variedad de funciones celulares que desempeña. Su actividad es crítica en la regulación de los procesos homeostáticos y en el desarrollo de casi todos los seres vivos. Todos los miembros están relacionados estructuralmente, estos factores constan de dos unidades monoméricas unidas por un solo puente disulfuro. Cada monómero consta de un motivo o región invariable de siete residuos de cisteína que forman un anillo cerrado llamado “nudo de cisteínas”. Dentro de los procesos en los que participan los miembros de la superfamilia del TGF- β están: la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, la inflamación, la reparación de heridas y la formación de hueso, además contribuyen a la patogénesis de enfermedades tales como las autoinmunes, la fibrosis y el cáncer (Attisano L y Wrana JL, 2002). En gran parte podemos destacar la importancia del TGF- β debido a que tanto sus receptores como sus ligandos se expresan y secretan prácticamente en todos los tipos celulares (Flanders *et al*, 2000).

El TGF- β fue el primer miembro de estos polipéptidos secretados, se descubrió aproximadamente hace 20 años, desde entonces la familia ha crecido considerablemente y ahora comprende alrededor de 30 miembros en vertebrados y una docena de proteínas relacionadas funcional y estructuralmente en invertebrados como los gusanos e insectos. La familia del TGF- β contiene varias isoformas altamente homólogas; en mamíferos se encuentran los TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, la isoforma TGF- β 4 se expresa en el pollo (*Gallus gallus*) y el TGF- β 5 fue descubierto en *Xenopus laevis* (Flanders *et al*, 2000).

De la familia de las activinas podemos mencionar que están formadas por las inhibinas (Inh), β A y las β B que al asociarse forman el heterodímero β A β B llamado activina A, la cual es una potente citocina estimuladora de la producción de la hormona estimulante

del folículo (FSH) en las células de la pituitaria. Además, la activina juega un papel importante en la determinación del eje embrionario dorso-ventral (López-Casillas, 1998). En el hígado, el TGF β y la activina A controlan la proliferación y la muerte celular, sin embargo, bajo condiciones anormales, estos factores pueden contribuir al desarrollo de una fibrosis hepática. Por otro lado, las BMPs desempeñan un papel importante durante la hepatogénesis aunque en la actualidad se desconoce su papel en la homeostasis del hígado adulto y en el proceso de regeneración hepática (Rossmanith *et al*, 2001; Wrana, 1999).

En 1965 Marshall Urist descubrió a los factores responsables de la formación de hueso. En un experimento para recalcificar hueso, se implantaron fragmentos desmineralizados de forma subcutánea o intramuscularmente en conejos y ratas, y varias semanas después se observó que en los sitios del implante apareció cartílago y hueso nuevo. Este descubrimiento llevó a investigar cuáles agentes provocaban esta autoinducción en el hueso desmineralizado. Como resultado se identificaron sustancias solubles en agua con actividad osteoinductiva llamadas proteínas formadoras de hueso o BMPs (Azari *et al*, 2001). Las BMPs forman actualmente un subgrupo dentro de la superfamilia del TGF- β , ver Tabla 1 (Miller *et al*, 2000; Hogan, 1996).

SUPERFAMILIA DEL TGF- β	
SUBFAMILIA	FUNCIONES (ejemplos)
TGF-β: <ul style="list-style-type: none"> • TGF-β 1-3 • TGF-β4 (<i>pollo</i>) • TGF-β5 (<i>Xenopus</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores del crecimiento, inmunodepresores y moduladores de: la homeostasis celular, reparación de heridas, producción de matriz extracelular, diferenciación y apoptosis.
ACTIVINA: <ul style="list-style-type: none"> • Activina β A-E 	<ul style="list-style-type: none"> • Modulan el desarrollo embrionario, la inducción del mesodermo y la función de la pituitaria, entre otros procesos.
BMP: <ul style="list-style-type: none"> • BMP 2,4,5,6,7,8 • Dpp (<i>Drosophila</i>) • Vg1 (<i>Xenopus</i>) • GDFs 	<ul style="list-style-type: none"> • Modelan el desarrollo embrionario, la neurogénesis, en general la organogénesis, la formación de hueso, entre otros procesos.
MIEMBROS DIVERGENTES: <ul style="list-style-type: none"> • AMH/MIS • INHIBINA • GDNF 	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciación sexual (MIS) • Tumorigénesis y regulación de la pituitaria (Inhibina) • Supervivencia de neuronas dopaminérgicas (GDNF)

Tabla 1. Superfamilia del TGF- β y sus funciones más representativas. Todos los miembros fueron identificados en humano y/o ratón a menos de que se indique en otro organismo.

2. FUNCIONES DE LAS BMPs.

Existen evidencias de que las BMPs regulan diversos procesos biológicos como: apoptosis, proliferación, diferenciación celular y morfogénesis. Además en los vertebrados las BMPs están relacionadas con el desarrollo de casi todos los órganos y tejidos, incluyendo sistema nervioso, pulmón, riñón, piel, gónadas e hígado (Miller *et al*, 2000; Hogan, 1996). Las BMPs regulan muchos procesos durante la etapa embrionaria incluyendo proliferación y diferenciación celular, así como la apoptosis e interacciones epitelio-mesénquima, entre otras; sin embargo también actúan sobre tejidos blandos y duros de organismos de vida adulta. Las BMPs son morfógenas, ya que se distribuyen en un gradiente que afecta el desarrollo de células blanco de manera dependiente de la concentración y del tipo celular; por ejemplo, a bajas concentraciones pueden estimular la proliferación mientras que a altas concentraciones promueven la diferenciación (Hogan, 1996). A excepción de la BMP-1, que es una metaloproteasa, todas las demás BMPs son miembros de la superfamilia de los TGF- β s, ampliamente conservadas en el reino animal, incluyendo vertebrados, artrópodos y nemátodos. En los vertebrados, las BMPs juegan un papel importante en la formación del patrón dorso-ventral del mesodermo embrionario temprano y en la especificación de la epidermis. Las BMPs también desempeñan papeles en el desarrollo de las extremidades, la generación de células germinales primordiales, el desarrollo de los dientes y la regulación de la apoptosis (von Bubnoff *et al*, 2001).

Las BMPs son importantes para el organismo durante el desarrollo y/o crecimiento, por ejemplo, los ratones "knockout" de BMP-2 (eliminación del gen de BMP-2) mueren en el útero con muchas lesiones en su desarrollo, al nivel de estructuras embrionarias y extraembrionarias. Los ratones deficientes en BMP-7 mueren después del nacimiento, mostrando serias anormalidades de los huesos y tejidos blandos, como riñones subdesarrollados que carecen de glomérulo. Los ratones deficientes de BMP-5 son sanos, aunque tienen muchos defectos en tejidos blandos y esqueléticos, incluyendo la pérdida de un par de costillas, un pequeño oído externo y una capacidad reducida en la reparación de costillas fracturadas. Se sugiere que la señalización de las BMPs es particularmente relevante durante el desarrollo, cuando en las células se inicia el proceso de diferenciación. Estos ligandos se presentan en varios tejidos blandos y estructuras del esqueleto sugiriendo que su biología es más complicada de lo que se ha revelado con el

estudio de los fenotipos de los animales “knockout” hasta ahora disponibles. Se ha reportado que las BMP-2, 4, 5, 6, y 7 se expresan en tejidos de mamíferos adultos incluyendo: piel, corazón, hígado, riñón, pulmón y cerebro. La BMP-7 se expresa abundantemente en riñón adulto. Por otro lado, se ha visto que los ratones normales muestran una expresión epidérmica de BMP-6 durante el desarrollo y en la piel madura, mientras que ratones adultos que sobreexpresan BMP-6 desarrollan lesiones en la piel parecidas a la psoriasis (Miller *et al*, 2000).

3. ESTRUCTURA DE LOS MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA DEL TGF β .

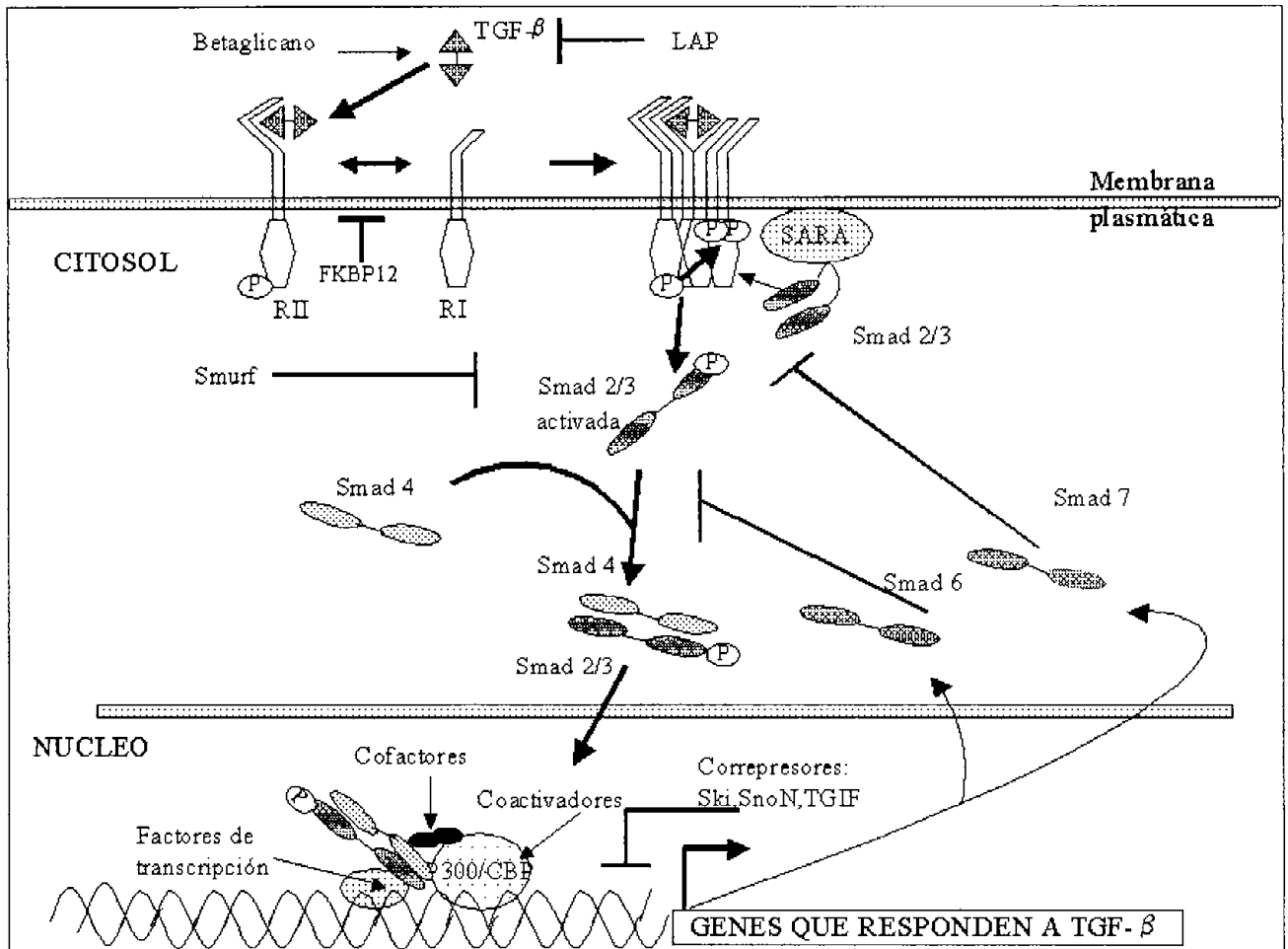
Los miembros de la superfamilia del TGF- β son sintetizados en forma dimérica y a partir de precursores que requieren de un procesamiento proteolítico para madurar y ser activos. Las isoformas del TGF- β son secretadas en forma de proteínas inactivas o “latentes” de 390 a 442 residuos de aminoácidos, que constan de una proteína LAP “Latency associated peptide” (péptido asociado a la latencia) de 392 aminoácidos, unida a la región biológicamente activa y/o madura del TGF- β formada por los 112 residuos de aminoácidos en el carboxilo terminal. El procesamiento proteolítico del TGF- β lo realiza la furina, una convertasa miembro de la familia de las endoproteasas de mamífero. El TGF- β existe como un dímero estable de 25 kDa enlazado mediante un puente disulfuro entre dos residuos de cisteínas. El TGF- β se secreta en el medio extracelular en forma latente e inactiva puesto que se mantiene unido a LAP, quien a su vez permanece asociada covalentemente a la proteína LTBP “Latent TGF- β binding protein” (proteína unida al TGF- β latente), la cual mantiene al complejo unido a la matriz extracelular mediante puentes disulfuro, formando en conjunto el gran complejo latente LLC (“large latent complex”). Para que se lleve a cabo la activación del TGF- β , se requiere que haya una disociación del factor maduro TGF- β de LAP (López-Casillas, 1998), ya que LAP evita la unión de la molécula madura a sus receptores. El TGF- β puede ser activado *in vitro* por acidificación, calentamiento o adición de proteasas. En el proceso *in vivo* pueden estar implicadas las acciones de la plasmina, fibronectina, trombospondina y otras proteasas (Border y Noble, 1995).

En el caso de las BMPs, es posible que proteínas de la familia de las furinas sean las responsables de la activación proteolítica de las BMPs, como ocurre con el TGF- β ,

donde son requeridas para liberar el dímero biológicamente activo de la proteína latente. En la actualidad no hay evidencias directas de formas latentes de alguna BMP, o que BMPs se encuentren asociadas con alguna proteína homologa a la proteína asociada a la latencia (LAP) (Hogan, 1996).

4. VIA DE SEÑALIZACIÓN DEL TGF β .

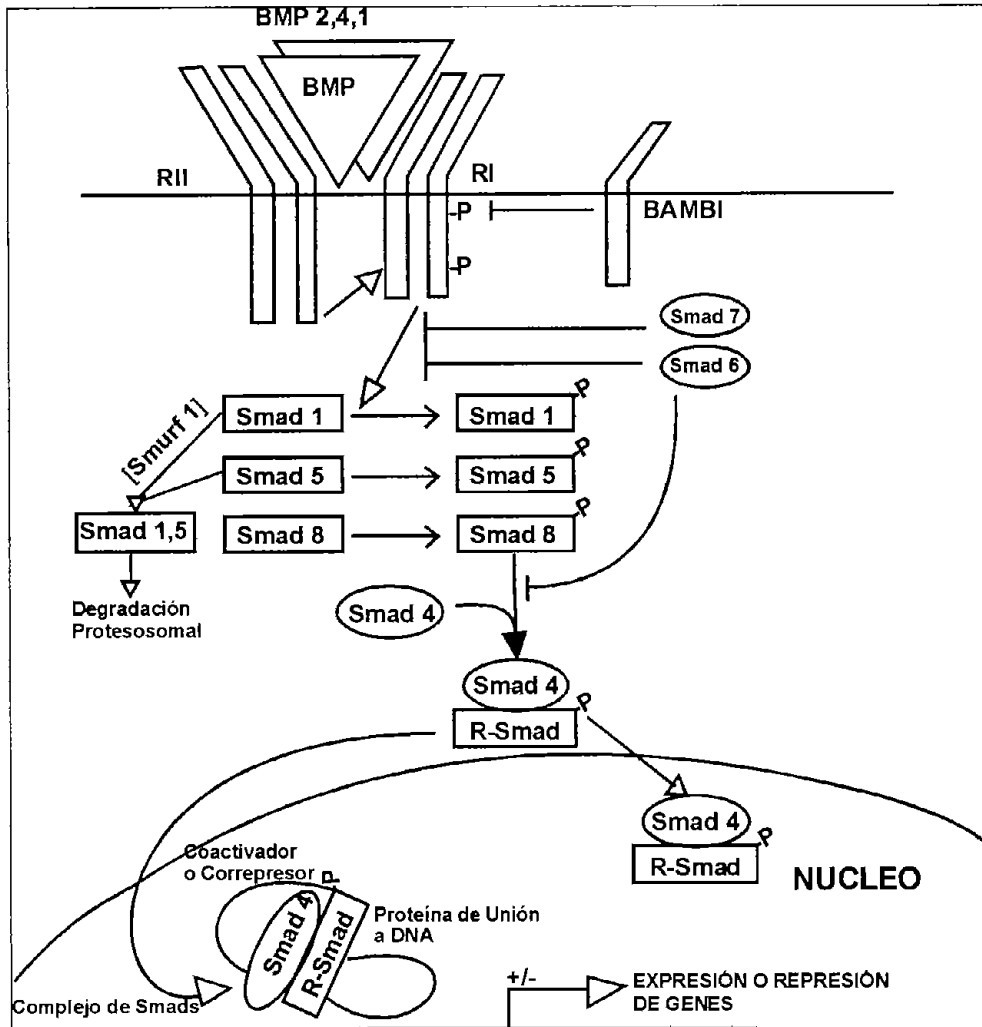
El mecanismo básico de la transducción de señales de esta vía ha sido bien caracterizado en años recientes (von Bubnoff *et al*, 2001). La transducción de las señales del TGF- β (ver Esquema 1), implica dos tipos distintos de receptores transmembranales, los receptores tipo I y tipo II, con actividad de cinasas de residuos de serinas y treoninas. El receptor tipo II se encuentra en un estado constitutivamente activo y une al ligando TGF- β , para así reclutar al receptor tipo I y conducir a la formación de un complejo ternario ligando/ receptor tipo II/ receptor tipo I. El receptor tipo II fosforila residuos de serina y de treonina en el dominio intracelular GS (rico en glicinas y serinas) del receptor tipo I (Wrana *et al*, 1994). Una vez activado, el receptor tipo I fosforila a miembros particulares de la familia de las proteínas Smad, llamadas Smads reguladas por el receptor (R-Smads), en los dos últimos residuos de serina del motivo SSXS conservado en el extremo carboxilo (Macías-Silva *et al*, 1996). Las R-Smads pueden ser subdivididas en dos clases: las Smad2 y 3 que transducen señales del TGF- β y activinas, mientras que las Smad1, 5 y 8 transducen las señales de las BMPs. Una vez fosforiladas, las R-Smads son liberadas del receptor e interactúan con Smad4 (también conocida como la Smad común ó Co-Smad), la cual parece ser compartida en todas las vías de transducción de la superfamilia del TGF- β . Esta interacción resulta en la formación de un complejo R-Smad/Co-Smad que es traslocado hacia el núcleo, en donde es capaz de reclutar diferentes factores transcripcionales y coactivadores o correpresores para así iniciar o evitar la transcripción de los genes blanco (von Bubnoff *et al*, 2001).



Esquema 1. Vía de señalización del TGF- β , en donde se pueden observar a algunos puntos de regulación negativa como I-Smads (Smad6 y 7), correpresores (Ski, SnoN, TGIF), LAP y FKBP12 y a los elementos que componen la vía: ligando, receptores, R-Smads (Smad2 y 3), co-Smad (Smad4), coactivadores (CBP o p300), proteínas de andamiaje como SARA y las proteínas Smurfs (que participan en vías de degradación por el proteosoma) (Tomado de Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004).

El modelo de activación de los receptores para las BMPs difiere del propuesto para el TGF- β , en este caso el ligando parece unirse cooperativamente a ambos receptores. La transfosforilación del receptor tipo I por la cinasa del tipo II en una región específica rica en glicinas y serinas (caja GS) del dominio citoplásmico dispara la cascada señal río abajo (ver Esquema 2) (Hogan, 1996). Con más de 15 proteínas BMPs identificadas en mamíferos hasta hoy, se han descrito solo tres distintos receptores tipo II: el receptor tipo II de BMPs (BMPRII) y los receptores tipo IIA y IIB de activina (ActRIIA y ActRIIB), además

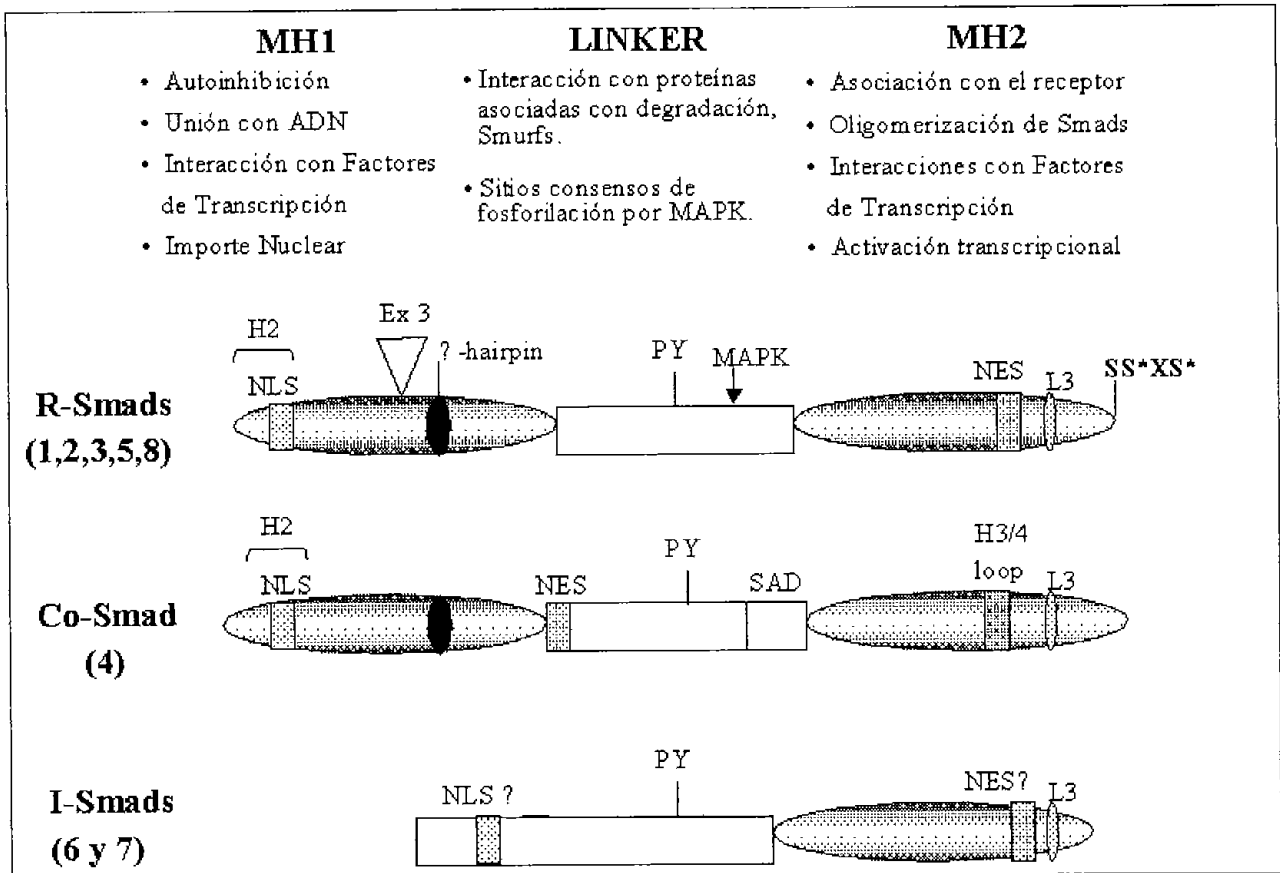
de tres receptores tipo I (quinasas parecidas a los receptores de activina): ALK2, ALK3/BMPRIA y ALK6/BMPRIB. ALK3 y ALK6 se activan por BMP-2, BMP-4 y BMP-7, mientras que a ALK2 se une a BMP-6 y BMP-7 pero con menor afinidad a BMP-2 o BMP-4. Los receptores de las BMPs activan a las Smads 1, 5 y 8 (BR-Smads). Se ha observado que ALK3 y ALK6 pueden activar a las tres BR-Smads, mientras que ALK2 parece sólo fosforilar a Smad1 y Smad5.



Esquema 2. Vía de señalización de las BMP-Smad en donde los dímeros BMP-2, -4 ó -7 se unen al complejo de receptores, conduciendo a la fosforilación del receptor tipo I (RI) por el receptor tipo II (RII), para después fosforilar a las R-Smad (Smad1, -5 u -8). Esta fosforilación hace que la R-Smad forme un complejo con la Smad común ó Co-Smad (Smad4) y este complejo R-Smad/Smad4 entra al núcleo para activar o reprimir genes blanco dependiendo de los cofactores nucleares presentes. (Tomado y modificado de von Bubnoff and Cho, 2001).

5. LAS PROTEINAS SMAD.

El nombre de Smad surge por la fusión de los nombres de los genes: *mad* (“Mothers against decapentaplegic”) en *Drosophila* y *sma* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Azari *et al*, 2001). A la fecha, se han identificado nueve genes diferentes que codifican para las proteínas Smad y se han clasificado en tres clases principales: Smad reguladas por receptor (R-Smads), Smad común o compartida por diferentes vías (Co-Smads) y Smads inhibitorias (I-Smads). Las R-Smads son fosforiladas por los receptores tipo I, y se ha establecido que las Smad1, 5 y 8 median la vía de las BMPs, mientras que Smad2 y 3 median las vías de las activinas y TGF- β s. A la fecha, Smad4 es la única co-Smad identificada en vertebrados y es un componente indispensable en estas vías de señalización (Cho, 1988). En contraste, las I-Smad se localizan principalmente en el núcleo en ausencia de ligando, pero se acumulan en el citoplasma bajo la activación del receptor (Flanders *et al*, 2001). Las proteínas Smad tienen tres dominios, el dominio amino terminal homólogo a Mad (MH1), un dominio “linker” divergente rico en serinas y prolinas, y el dominio carboxilo terminal homólogo a Mad (MH2) (ver Esquema 3). El dominio MH2 de las R-Smads está implicado en el reconocimiento del receptor tipo I, quien lo fosforila directamente en su motivo SSXS del carboxilo terminal. Este dominio, que es conservado en todas las Smad, es requerido para la oligomerización entre las R-Smads además de interactuar con Smad4, y se observa que también interactúa con adaptadores citoplásmicos y factores de transcripción nucleares. Las I-Smads carecen del dominio MH1 y del característico motivo SSXS en la región carboxilo-terminal. Las Smad inhibitorias se pueden unir al dominio intracelular del receptor tipo I evitando la fosforilación de las R-Smads por el receptor. También se ha sugerido que Smad6 inhibe la vía de las BMPs por competir con Smad4 por la unión a Smad1 activada, dando como resultado complejos Smad1-Smad6 inactivos (ver Esquema 1).

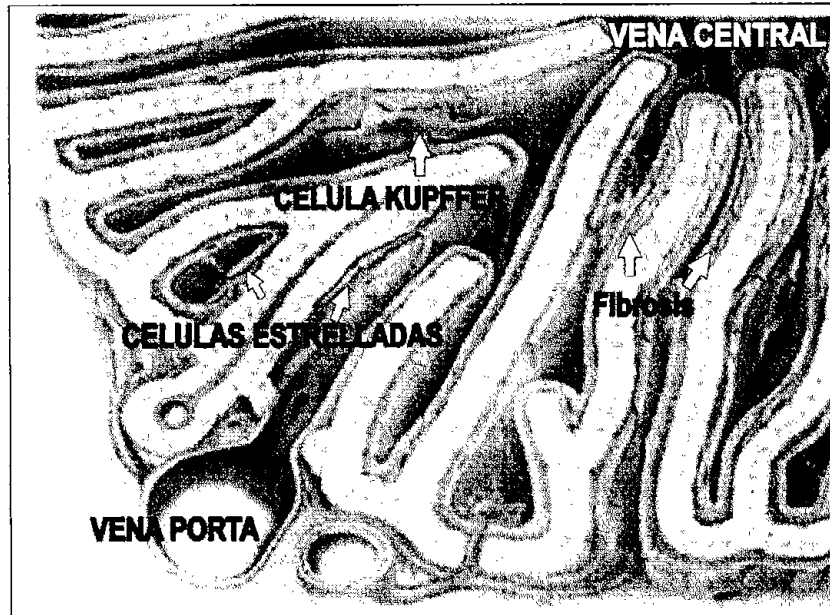


Esquema 3. Clasificación y características estructurales de las proteínas Smad. Se muestran los principales dominios presentes en las proteínas Smad y sus funciones (MH1, linker y MH2). Los principales motivos presentes son: NLS, señal de localización nuclear; NES, señal de exportación nuclear; PY, motivo reconocido por dominios WW; SSXS, sitio de fosforilación por el receptor tipo I; L3, asa L3 que participa en la interacción con el dominio de cinasa de los receptores tipo I (Tomado de Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004).

6. EL HÍGADO Y SUS FUNCIONES.

El hígado es un órgano filogenéticamente muy antiguo, apareció por primera vez en los celenterados (ej. anémonas), como un engrosamiento del mesodermo en la región del primordio intestinal, con una función importante en el metabolismo y almacenamiento de nutrientes (Berk y Chalmers, 1981). El hígado es la glándula de mayor tamaño en el humano y constituye aproximadamente del 2 al 5% del peso corporal en el adulto. La

organización estructural del hígado refleja sus funciones y está provisto de un aporte dual de sangre, que ingresa por la vena porta y la arteria hepática (ver Esquema 4). Estos canales importan una gran variedad de nutrientes, así como sustancias tóxicas provenientes del sistema digestivo, de tal forma que la función principal del hígado es la absorción eficiente de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas, así como su posterior almacenamiento, conversión metabólica y liberación de los productos de desecho a la corriente sanguínea y a la bilis (Leeson *et al*, 1990). De igual modo, el hígado es un sistema de defensa contra moléculas ajenas, así como contra bacterias, ya que en los sinusoides (capilares hepáticos) existen tipos celulares con función fagocítica (Wisse *et al*, 1988). La estructura de esponja y la gran capacidad vascular que tiene el hígado sirven como un almacén y participan en la regulación del volumen de la sangre y su flujo a través del cuerpo. La unidad estructural del hígado se conoce como lobulillo hepático, que al observarse al microscopio óptico presenta una forma hexagonal en cualquiera que sea la dirección del corte histológico en el tejido, por lo que se deduce que el lobulillo hepático es poliédrico. Este lobulillo está formado por el parénquima hepático y presenta en el centro una vena central, y en los vértices del hexágono una rama de la vena porta, otra de la arteria hepática, un conducto biliar y uno más de vasos linfáticos incluidos en el tejido conjuntivo, a este conjunto de haces se le conoce como triada portal (Leeson, 1990).



Esquema 4. Representación esquemática de la arquitectura general del sinusoides en hígado y localización de las células estrelladas y células de Kupffer. En hígado normal, los cordones de hepatocitos están rodeados por un revestimiento endotelial fenestrado. Las células estrelladas se encuentran dentro del espacio de Disse. Las células Kupffer son típicamente intrasinusoidales y adherentes a la pared endotelial. La activación de las células estrelladas puede conducir a la acumulación de matriz extracelular y desarrollo de fibrosis. (Tomado de Flanders *et al*, 2003).

El espacio sinusoidal es de mayor tamaño que el de los capilares (9 a 12 μm) y está rodeado por células endoteliales, y no está recubierto por una membrana basal continua sino por una membrana basal con fenestraciones, a través de la cual hay un intercambio de macromoléculas entre el torrente sanguíneo y los hepatocitos, los cuales están alineados a lo largo del sinusoides en filas de un hepatocito de grosor. El espacio que hay entre las células endoteliales y los hepatocitos se le denomina espacio de Disse, y en él se encuentran componentes de la matriz extracelular (MEC) y otros tipos celulares como las células de Kupffer y las células estrelladas (HSC). Hacia el otro extremo de la fila de hepatocitos, se distingue otro espacio entre una fila de hepatocitos y otra, este espacio es el canalículo biliar (Weibel *et al*, 1969).

Las funciones del hígado son diversas y esenciales para la homeostasis del organismo y entre ellas destacan las siguientes:

1. Es el principal órgano homeostático en la regulación del azúcar sanguíneo y del metabolismo de los carbohidratos.
2. Desempeña un papel importante en la síntesis y degradación de las proteínas y en la formación de urea a partir de desechos nitrogenados.
3. Está implicado en la síntesis, almacenamiento y utilización de las grasas.
4. Participa en la formación de la bilis, la cual es esencial para la digestión adecuada de las grasas.
5. Inactiva gran número de compuestos químicos, incluyendo hormonas y muchos venenos.

7. REGENERACIÓN HEPÁTICA.

Existen dos mecanismos para aumentar el tamaño de un órgano. El primero es aumentar el número de células (hiperplasia) y el segundo es conservar el número celular constante pero las células aumentan de volumen (hipertrófia). A veces una parte dañada o perdida de un organismo se puede renovar y en este caso el fenómeno recibe el nombre de regeneración. Para reemplazar la parte perdida, algunos órganos llevan a cabo una regeneración morfológica y sus estructuras son reemplazadas *in situ* por hiperplasia, mientras que otros órganos compensan la pérdida aumentando solamente el resto de su masa por hipertrófia. Hay órganos que nunca pierden la habilidad de hacer nuevas unidades funcionales de tipo celular. Su número es indeterminado, por lo que poseen potencialidades ilimitadas para crecer, esta regulación está bien ilustrada en la regeneración del hígado que produce la adición de cordones parenquimatosos en el lóbulo hepático (González-Morán, 1997).

El hígado tiene la capacidad de regular su tamaño y crecimiento, en respuesta a las demandas del cuerpo y en función del organismo. Cuando un hígado es trasplantado en un organismo receptor que originalmente tenía un hígado de mayor tamaño, crecerá hasta alcanzar una masa óptima en función del organismo receptor. Cuando sucede lo contrario, es decir, que el hígado trasplantado sea de mayor tamaño que el del organismo receptor, puede incluso llegar a disminuir de tamaño. La regeneración hepática después de una hepatectomía parcial (PH) difiere significativamente del proceso de cicatrización de heridas

en otros tejidos, puesto que es un proceso de hiperplasia compensatoria. El mejor modelo experimental para el estudio de la regeneración hepática fue el introducido por Higgins y Anderson, en donde con una simple operación (hepatectomía parcial) se remueven dos tercios del hígado de una rata, y los lóbulos restantes crecerán hasta recuperar la masa original del hígado, ya que los lóbulos removidos nunca crecerán de nuevo. Este proceso puede durar hasta 2 semanas. En este proceso, la masa hepática está regulada en forma precisa y las señales producidas por el organismo pueden tener efectos tanto positivos como negativos sobre ella hasta que alcance el tamaño correcto.

La regeneración hepática se lleva a cabo por la proliferación de todas las células maduras del hígado que incluyen hepatocitos, células epiteliales biliares, células endoteliales fenestradas, células de Kupffer y células estrelladas. Todas estas células proliferan hasta reconstruir el tejido hepático perdido. Los hepatocitos son los primeros en proliferar con un intervalo de 10 a 12 horas entre la hepatectomía parcial (PH) y el inicio de la síntesis de DNA. La regeneración del hígado no depende de células progenitoras o células madre como en otros tejidos, por ejemplo médula ósea o piel. El primer pico de síntesis de DNA en los hepatocitos ocurre aproximadamente a las 24 horas, con un pequeño pico entre las 38 y 48 horas. Las demás células del hígado la máxima síntesis de DNA, aproximadamente 12 horas después que los hepatocitos, con un pico a las 36 horas o después. La cinética de proliferación celular y los factores de crecimiento producidos por hepatocitos proliferando sugieren que los hepatocitos quizás den el principal estímulo mitogénico para la proliferación de las demás células.

La composición de la MEC también cambia y aumenta el contenido de laminina en comparación con la MEC típica del hígado maduro, que presenta una MEC escasa, conteniendo principalmente fibronectina, colágenas tipo 4 y 1 y otras proteínas, así como glicosaminoglicanos en baja concentración. Además de la capacidad de los hepatocitos para proliferar es notable también su capacidad para llevar a cabo todas las funciones para mantener la homeostasis hepática. Por otro lado, varios marcadores fetales aparecen en la regeneración hepática, idénticos a los expresados en hígado fetal (ver Esquema 5).

Diversas señales mitogénicas aparecen en la sangre durante la regeneración y una hipótesis para explicar el mecanismo de inicio de este proceso implica la aparición en la circulación de un estímulo mitogénico para los hepatocitos, que tiene cambios rápidos dentro de los primeros 30 minutos después de una PH. Los factores mitogénicos: HGF,

EGF, TGF- α , IL-6, TNF- α , norepinefrina e insulina contribuyen de alguna manera al paso de los hepatocitos de una fase G0 a las fases G1 y S del ciclo celular. Sin duda el HGF tiene un papel en este proceso regenerativo, capaz de generar una señal mitogénica completa en hepatocitos en cultivo sin otra citocina de señalización. El EGF también es un factor mitogénico para los hepatocitos, suministrado continuamente al hígado por la glándula de Brunner del duodeno (Michaelopoulos *et al*, 1997). El PDGF, FGF, IL-6 y TNF α tienen un papel importante en la reparación de tejidos. El PDGF es un potente estimulador para la proliferación celular, el FGF induce la formación de nuevos vasos sanguíneos y la IL-6 y el TNF α son proinflamatorios. El TGF- β , junto con estas citocinas coordina el proceso de reparación de tejidos, hasta que la reparación del tejido esté completa. La regeneración del hígado es un modelo ampliamente estudiado de proliferación celular. Muchos factores de crecimiento se han propuesto como iniciadores de la regeneración hepática, mientras que el TGF- β se ha propuesto como el principal candidato para detener la proliferación, una vez que la masa hepática funcional se ha recuperado (Michaelopoulos, 1996; Border y Noble, 1995).

8. HEPATOTOXICIDAD Y ACCION DEL TETRACLORURO DE CARBONO.

El tetracloruro de carbono (CCl₄) continua siendo una de las principales sustancias usadas para elucidar los mecanismos de acción de los hepatotóxicos y también para inducir la regeneración hepática. El daño dependerá del tiempo de exposición, de la dosis, de la presencia de agentes potenciadores y de la edad del organismo afectado. Cuando el daño no es muy severo, la regeneración puede tomar lugar y conducir hacia la recuperación total del hígado dañado. El CCl₄ es activado por los citocromos (CYP)2E1, CYP2B1, o CYP2B2 y posiblemente CYP3A, para formar el radical triclorometil CCl₃. El CCl₃ puede unirse a moléculas tales como los ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos, dañando procesos celulares cruciales como el metabolismo de lípidos y dando como resultado la degeneración de grasas (esteatosis). En el ámbito molecular, el CCl₄ participa en la activación del factor de necrosis tumoral (TNF α), de los factores de crecimiento transformante TGF- α y TGF- β , en la formación del óxido nítrico (NO) en las células, los cuales dirigen a las células hacia la autodestrucción o favorecen la fibrosis. El TNF α

induce apoptosis y los TGF- α y TGF- β inducen fibrosis. La IL-6, inducida por el TNF α , tiene claramente un efecto antiapoptótico y también la IL-10 contrarresta la acción del TNF α , por lo que ambas interleucinas tienen el potencial para iniciar la recuperación del hepatocito dañado por el CCl₄.

A bajas dosis de CCl₄, prevalecen efectos transitorios, tales como la pérdida de calcio, el deterioro de la homeostasis de lípidos, liberación de citocinas y eventos apoptóticos seguidos por la regeneración. Otros efectos ocurren a dosis altas o por una larga exposición y son permanentes, más serios, y se desarrollan durante largos periodos de tiempo, tales como la degradación de grasas, desarrollo de fibrosis, cirrosis e incluso cáncer. Por otro lado, también con dosis tóxicas agudas, la necrosis hepatocelular puede exceder a la capacidad regenerativa del hígado dando como resultado fallas hepáticas letales. Dado que existen diferentes resultados de toxicidad por los haloalcanos, tales como la muerte celular y/o la necrosis catastrófica y la degradación de grasas, cirrosis, fibrosis y cáncer, se asume que existen varios mecanismos fisiológicos de recuperación. La regeneración es un mecanismo de recuperación del daño de tejido inducido por CCl₄.

El daño hepático por CCl₄ es un proceso complicado que puede volverse un círculo vicioso, ya que cambios potencialmente reversibles (como la fibrosis) se sostienen por altas dosis o exposición por largos periodos de tiempo y el tóxico priva al hepatocito de su capacidad regenerativa. Interesantemente, muchos de los eventos inflamatorios y moleculares identificados después de la intoxicación con CCl₄ no son mediados por los hepatocitos, sino por dos tipos de células hepáticas no parenquimatosas, las células de Kupffer y las células estrelladas. Las células de Kupffer, macrófagos residentes del hígado, después de activarse por CCl₄, liberan TNF α , óxido nítrico, TGF- β e interleucinas 1, 6 y 10. Las células estrelladas en estado de reposo son células almacenadoras de grasa, pero después de ser activadas por agentes como el CCl₄ muestran una típica respuesta de fase aguda tomando la apariencia de miofibroblasto, y entonces liberan óxido nítrico y comienzan a sobreproducir colágena tipo I promoviendo así la fibrosis del hígado. El estado activado de las células estrelladas es típicamente detectado por el contenido y expresión de la α -actina de músculo liso.

El desarrollo de fibrosis también implica a las Smads. El TGF- β induce la fosforilación de Smad2 y Smad3, las cuales participan en la inducción de la síntesis de colágena. El

TGF- β también induce la síntesis de Smad7, la cual bloquea la activación de Smad2 y Smad3. Sin embargo, se cree que el TGF- β podría estar activando otras vías de transducción del tipo de las MAP cinasas para favorecer la acumulación de matriz extracelular durante la fibrosis. El papel del TGF- β como un iniciador de fibrosis está respaldado por la observación experimental de que la fibrosis hepática inducida por CCl₄ puede ser suprimida al inactivarse dicho factor con el receptor tipo II soluble del TGF- β (Weber L. *et al*, 2003).

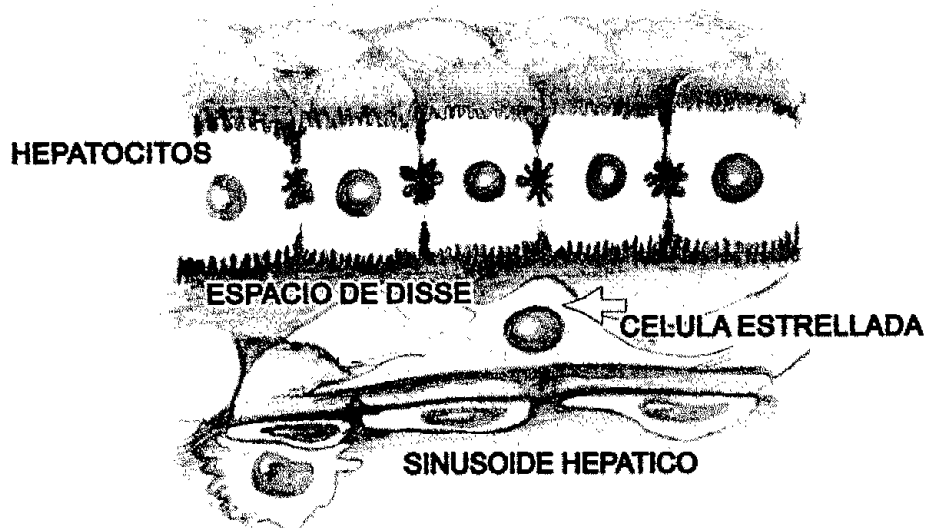
9. FIBROSIS HEPATICA.

En el hígado, luego de un daño se desencadena un proceso de reparación del tejido dañado. Un daño crónico conduce a una fibrosis en respuesta a una serie de daños, como pueden ser la hepatitis viral (especialmente la hepatitis B y C), abuso del alcohol, drogas, enfermedades metabólicas debidas a exceso de fierro o cobre, enfermedades autoinmunes y anormalidades congénitas. Típicamente este daño se encuentra presente desde meses hasta años hasta acumular una cicatriz considerable. La fibrosis es reversible mientras que la cirrosis, consecuencia final o resultante de la fibrosis, es generalmente irreversible. Las células estrelladas son las células fibrogénicas clave, estas células tienen una respuesta conocida como “activación” después del daño en el hígado; la activación consiste en la transición de un estado de reposo a un estado proliferativo, fibrogénico y contráctil, adquiriendo un fenotipo de tipo miofibroblasto (ver Esquema 5).

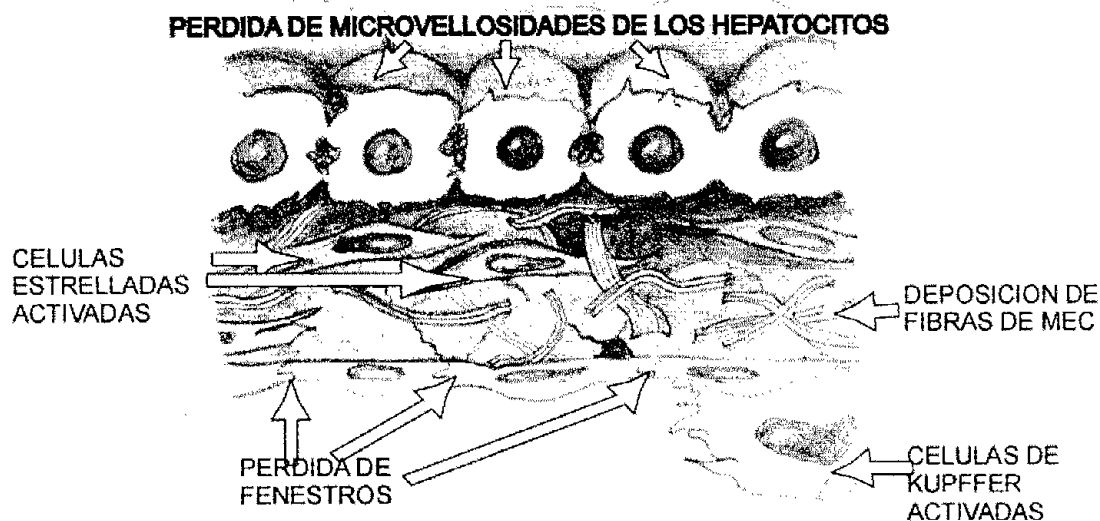
Cuando el hígado se vuelve fibrótico suceden cambios cualitativos y cuantitativos en la composición de la MEC hepática. El contenido total de colágenas y de otros componentes aumenta de 3 a 5 veces, acompañado por el cambio de tipo de MEC en el espacio subendotelial. De una membrana basal tipo matriz de baja densidad cambia a una membrana tipo intersticial que contiene colágenas que forman fibrillas. Este cambio en la composición de la MEC afecta el comportamiento de los hepatocitos, endotelio sinusoidal y células estrelladas. La formación de fibras en la MEC también acelera la activación de células estrelladas. Estos efectos son mediados no solo por la interacción con las integrinas, receptores clásicos de la MEC, sino también por la unión con RTKs (receptores con actividad de cinasas de residuos de tirosina). Algunas integrinas identificadas en la señalización de las células estrelladas son: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$.

El TGF- β es el estímulo principal para la producción de matriz extracelular por las células estrelladas. El papel del TGF- β tanto en perpetuar como en iniciar la activación de las células estrelladas, se ha establecido examinando el comportamiento de las células estrelladas en ratones deficientes en TGF- β que tienen un daño agudo del hígado. Como se esperaba, estos animales tienen una marcada reducción en la acumulación de colágena en respuesta al daño hepático, sin embargo tienen un aumento de la α -actina de músculo liso, indicando la activación de las células estrelladas. La pérdida de vitamina A intracelular es una de las características de la activación de las células estrelladas (ver Esquema 5) y el aumento en la producción y/o actividad de diversas citocinas es crítico para prolongar la activación de las células estrelladas (Friedman, 2000).

HIGADO NORMAL



HIGADO DAÑADO



Esquema 5. Eventos sinusoidales durante un daño hepático fibrosante. Cambios en el espacio de Disse subendotelial y en el sinusoides como el desarrollo de fibrosis en respuesta a un daño hepático, lo cual incluye alteraciones en respuestas celulares y en la composición de la matriz extracelular. La activación de las células estrelladas conduce a la cicatrización del tejido (formando fibrillas en la MEC). Este proceso contribuye a la pérdida de las microvellosidades de los hepatocitos y de los fenestros del endotelio, lo que resulta en el deterioro de la función hepática. La activación de las células de Kupffer (macrófagos) esta asociada al daño del hígado y contribuye a la activación paracrina de las células estrelladas (Tomado de Friedman, 2000).

II. ANTECEDENTES

Es importante realizar estudios acerca del papel de las BMPs en el hígado bajo el proceso de regeneración ya que se ha demostrado que junto con los FGFs, tienen un papel crucial en el desarrollo embrionario durante la formación de la placa primaria hepática en la hepatogénesis. La formación de la placa embrionaria se divide en dos etapas: en la primera, el sitio de formación de la placa se define dentro del eje del embrión en desarrollo y se establecen regiones de señalización de moléculas secretadas y en la segunda etapa se requiere de la proliferación de las células en respuesta a mitógenos y factores de crecimiento y del crecimiento morfogénico de la placa, es decir de la formación del divertículo hepático, donde luego de una inducción las nuevas células hepáticas proliferan, forman láminas y migran hacia la zona donde se formará el estómago (Duncan y Watt, 2001). La intención de este trabajo fue determinar si las BMPs participan en el proceso de regeneración en donde se observan procesos similares a los de la hepatogénesis, como el requerimiento de estos mitógenos para la proliferación celular y factores para un crecimiento compensatorio de la masa hepática.

La detección de receptores para BMPs en varios tejidos sugiere una amplia gama de papeles para las BMPs. Receptores para la BMP-2 han sido encontrados tanto en hígado como en otros tipos celulares y tejidos. El receptor para BMP-9 se ha encontrado en células HepG2, una línea celular de hepatoma. El Análisis por "Northern blot" demuestra la presencia de BMP-6 en células del hígado no parenquimatosas. Como muchas otras BMPs, BMP-6 induce crecimiento y diferenciación en tejidos embrionarios y actúa como un factor osteoinductivo en el organismo adulto. Trabajos de Knittel y colaboradores proponen un papel importante de BMP-6 en la regeneración hepática (Azari K, *et al*, 2001).

Además, se han detectado BMPs en mayor cantidad en pulmón y en menor cantidad en bazo, riñón, corazón, cerebro e hígado. Entre las diferentes poblaciones celulares hepáticas la expresión de BMP-6 esta confinada a células estrelladas hepáticas (HSC) y células de Kupffer (KC). Además de sus propiedades osteoinductivas, BMP-6 puede desempeñar un papel importante en el crecimiento y diferenciación del hígado, en particular después de un daño hepático. Igualmente, la BMP-6 tiene propiedades inhibitorias de crecimiento y fibrogénicas lo cual puede ser importante para la reparación del tejido hepático. Se ha observado la modulación de la expresión de BMP-6 por TGF- β 1 y por las citocinas proinflamatorias interferon- γ y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), lo

que enfatiza su papel potencial en el mantenimiento de la integridad de los tejidos (Knittel *et al*, 1997).

La BMP-9 recombinante, inhibe potencialmente la producción de glucosa hepática y la expresión de enzimas clave en el metabolismo de los lípidos. En ratones diabéticos sometidos a una dieta normal, una sola inyección subcutánea de BMP-9 reduce la glicemia a niveles normales, por lo que este ligando representa el primer factor hepático descrito para regular la concentración de glucosa en la sangre. Esta capacidad de BMP-9 está asociada con su capacidad para promover la liberación de insulina en células β del páncreas, y para regular la señalización por medio de la cinasa de la sintetasa del glucógeno (GSK) en músculo, así como para inhibir la producción de glucosa hepática. BMP-9 tiene un perfil de expresión hepático restringido, la proteína madura se expresa en el endotelio hepático, células de Kupffer y estrelladas. La proteína BMP-9 se une a células hepáticas endoteliales y de Kupffer, así como a hepatocitos primarios y a varias líneas celulares hepáticas incluyendo HepG2 (Chen *et al*, 2003). Entre los órganos y tejidos estudiados, es claro que en la rata adulta predomina la transcripción de BMP-9 en el hígado. Las señales de las BMPs se inician vía mecanismos autocrinos y/o paracrinos dentro del sinusoides hepático. El hecho de que células no parenquimatosas tengan la capacidad de unir y sintetizar BMP-9 implica que esta puede regular la función del sistema retículo-endotelial del hígado (Miller *et al*, 2000).

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la vía de transducción de BMP/Smad durante la regeneración del hígado de rata, a través de la cuantificación de los niveles de expresión de los RNA mensajeros de las Smad y de las BMPs, así como los niveles de expresión de las proteínas Smad1 y Smad4. Además, observar el estado de activación de la vía mediante la detección de los niveles de la proteína Smad1 fosforilada.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Reproducir en nuestro laboratorio el modelo de regeneración hepática en ratas macho Wistar para estudiar la vía de las BMPs, mediante el uso del agente tóxico CCl₄ que produce un daño hepático.
2. Detectar los niveles de expresión de los RNA mensajeros de Smad1, 4, 5 y 6, durante el proceso de regeneración del hígado después del tratamiento agudo con CCl₄, mediante Northern blots.
3. Detectar los niveles de expresión de los RNA mensajeros de las BMPs 2, 4, 6 y 7 durante la regeneración del hígado, por medio de RT-PCR.
4. Detectar los niveles de expresión de las proteínas Smad de la vía de las BMPs en extractos nucleares de hígado en regeneración, por medio de inmunoblots.
5. Evaluar el estado de activación de la vía de las BMPs mediante la cuantificación de los niveles de la proteína Smad1 fosforilada en extractos proteicos de hígados de rata en regeneración, mediante inmunoblots.
6. Estudiar que tipos celulares hepáticos responden a la BMP-2, mediante el tratamiento de células hepáticas aisladas con BMP-2 recombinante y la detección de la proteína Smad1 fosforilada.

IV. HIPÓTESIS

Las BMPs son importantes reguladores homeostáticos y participan en la determinación del fenotipo celular hepático durante la hepatogénesis, por lo que proponemos que la vía de las BMPs podría tener también un papel importante en la homeostasis y en el mantenimiento de un fenotipo celular hepático en el hígado adulto tanto en reposo como durante su regeneración.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

REACTIVOS: Las sustancias utilizadas en este proyecto fueron las siguientes: acrilamida, persulfato de amonio (APS), ampicilina, antipaina, aprotinina, benzamidina, β -glicerofosfato, β -mercaptoetanol, albúmina de suero bovino, cicloheximida, dietilpirocarbonato, DNA tipo XIV de testículos de arenque, DNA tipo I de timo de ternera, bromuro de etidio, leupeptina, 3-(N-Morfolino) ácido propanosulfónico (MOPS), paraformaldehído, pepstatina A, fenol, fenilmetilsulfonil-fluoruro (PMSF), Tween 20 (Polyoxietileno-sorbitan monolaurato), dodecil-sulfato de sodio (SDS), bicarbonato de sodio (NaH_2CO_3), Temed (N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina), Tris HCl, Tris base y Tritón X-100, todos estos reactivos fueron obtenidos de Sigma. El accudenz fue de Accurate. Los anticuerpos policlonales de conejo como anti-fosfo-Smad1, anti-Smad1, anti-Smad4 fueron de Upstate Biotechnology Inc., los anti-Smad1/5/8 (cabra), anti-fosfo-Smad1 (conejo) y anti-Smad4 (cabra) fueron de Santa Cruz Biotechnology. La antipaina, aprotinina, BamHI, DNAsa I y pronasa fueron de Roche y el Bactoagar de B. Dickinson. El "Biorad protein assay" fue de BioRad. La BMP-2 recombinante humana de R&D Systems. La agarosa, el reactivo Trizol, los desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs: dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 100mM, el "Nick-traslation kit" y la proteína G agarosa fueron de Gibco/Invitrogen. El butanol, tetracloruro de carbono, alcohol etílico y ácido clorhídrico (HCl) fueron de Merck, y las colagenasas tipo I y II de Worthington. El cloroformo, butanol, cloruro de calcio, fenol, formaldehído, glicerol, sulfato de magnesio, acetato de potasio, cloruro de potasio, hidróxido de potasio, fosfato de potasio dibásico y monobásico, carbonato y bicarbonato de sodio, e hidróxido de sodio, fueron todos de J.T. Baker. El agar, azul de bromofenol, EDTA, Isopropanol/2-propanol, metanol, cloruro de potasio, hidróxido de sodio, fosfato de sodio monobásico y dibásico fueron de Fisher. El dextrán sulfato, DEAE dextrán y los reactivos para quimioluminiscencia (ECL) fueron de Amersham. El α -dCTP [^{32}P] fue de NEN y el "kit" de purificación de plásmidos fue de QIAGEN.

MATERIAL BIOLÓGICO: Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 200 a 250 gramos. Estas ratas fueron mantenidas y alimentadas *ad libitum*, en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la

UNAM cumpliendo las condiciones conforme a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para el uso y manejo de animales de laboratorio). El desecho biológico de los roedores se cumplió conforme a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Protección Ambiental - Salud Ambiental-Residuos Biológico - Infecciosos-Clasificación y Especificaciones de Manejo).

DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR TRATAMIENTO CON TETRACLORURO DE CARBONO (CCl₄). La regeneración hepática en los animales fue provocada por un daño hepático agudo, el tratamiento consistió en la aplicación de una sola dosis de 50 µl de CCl₄ (tetracloruro de carbono) por vía intraperitoneal, utilizando 250 µl de aceite mineral como vehículo. Los tiempos de tratamiento fueron 2 h (horas), 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, además de 1, 2, 3 y 4 semanas. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se obtuvo un fragmento de hígado (~0.5 g) que se homogenizó en solución Trizol. La muestra se congeló a -70 °C y posteriormente se realizó la purificación del RNA total. Otro fragmento de hígado (~0.5 g) se utilizó para la preparación de extractos nucleares de proteína, que también fueron congelados a -70 °C.

AISLAMIENTO DE RNA TOTAL. El aislamiento de RNA total se hizo mediante una extracción con Trizol (siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, Gibco/Invitrogen) Primero las muestras fueron homogenizadas con el reactivo Trizol, el cual inactiva a las RNAsas y permite la separación del RNA de DNA, proteínas y demás componentes y/o contaminantes del tejido. Después a las muestras se les agregó cloroformo (0.2ml por cada ml de Trizol utilizado) y se mezclaron por agitación, luego se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente (T.A.) y se centrifugaron a 3500 rpm (revoluciones por minuto) por 45 minutos a 4 °C. La fase acuosa (superior) que contenía el RNA total se transfirió a otro tubo limpio libre de RNAsas y se le agregó isopropanol (0.5ml por cada ml de trizol utilizado). Las muestras se agitaron suavemente por inversión y se incubaron 10 minutos a T.A.; luego se centrifugaron nuevamente a 3500 rpm por 45 minutos y se recuperó la pastilla. Se agregó etanol al 75% en agua tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato), se agitaron las muestras hasta resuspender perfectamente las pastillas y se centrifugaron 5 minutos a 3500 rpm. Repetimos este último lavado una vez y las pastillas se dejaron secar

a T. A. los RNAs fueron resuspendieron en 50 a 100 μ l de agua tratada con DEPC, se calentaron a 65 °C por 5 minutos y se guardaron a -70 °C. La cuantificación del RNA total se realizó agregando 1 μ l de RNA en un ml de H₂O/DEPC y se determinó la concentración en un espectrofotómetro con luz UV a 260 y a 280 nm. La lectura a 260 nm permitió calcular la concentración de RNA en la muestra, ya que una densidad óptica igual a 1 corresponde aproximadamente a 40 μ g/ml de RNA total. La relación entre 260/280 nm indica el grado de pureza del RNA y esta fue entre 1.4 y 1.6 (Macías S *et al*, 2002; Sambrook *et al*, 1990).

OBTENCIÓN DE PLASMIDOS E INSERTOS DE DNA. Las bacterias DH5 α competentes (una alícuota de 50 μ l, de Invitrogen) se transformaron con 0.5 μ g de los plásmidos pCMV5 que contenían como inserto a diferentes cDNAs de interés. La transformación se realizó mediante un choque térmico de 20 seg a 37 °C, luego se incubaron 2 min en hielo y 1 hora a 37 °C en medio LB líquido sin ampicilina, después una alícuota de 50 μ l de bacterias transformadas se sembraron (plaquearon) en cajas de petri con medio LB sólido con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37 °C. Los plásmidos fueron aislados utilizando un kit comercial de DNA de Qiagen, y se cuantificaron en un espectrofotómetro a 260 nm. Una vez obtenido el plásmido (50-100 μ g) en cantidades suficientes, se aisló el inserto de interés del vector. El plásmido (5-10 μ g) se incubó toda la noche a 37 °C con las enzimas de restricción adecuadas para separar el inserto del vector. Una vez incubada la reacción, el inserto se separó del vector mediante una electroforesis en un gel de agarosa y el DNA se tiñó con bromuro de etidio. La banda correspondiente al inserto se aisló y purificó mediante un kit de "Gene-Clean". El proceso consistió en derretir dentro de un microtubo de 1.5 ml el trozo de gel cortado, que incluye al inserto, en 600 μ l de NaI por 5 min a 55 °C, luego se agregaron perlitas de vidrio y se incubó en agitación a 4 °C por 15 minutos. Las perlitas se centrifugaron a 14K rpm por 20 seg y se lavaron tres veces con 1 ml de solución de lavado fría. El inserto fue resuspendido en 20 μ l de agua miliQ estéril y se guardó a -20 °C. Al día siguiente, una de las colonias crecidas en el medio sólido de LB/agar, se inoculó en 250 ml de medio LB líquido con 15 mg de ampicilina, las bacterias se incubaron a 37 °C con agitación constante a 240 rpm toda la noche. Las bacterias crecidas se colocaron en hielo y se centrifugaron a 3500 rpm por 15

minutos a 4 °C. Después, utilizando un “kit” comercial de Qiagen, los plásmidos se aislaron y se resuspendieron en 100 µl de agua desionizada estéril y se cuantificaron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, el inserto posteriormente se utilizó como sonda (Sambrook *et al*, 1990).

MARCAJE DE SONDAS DE cDNA POR EL METODO DE “NICK TRANSLATION”.

Se marcaron las sondas de DNA de interés (Smad1, Smad4, Smad5, Smad6 y Smad8) con un isótopo radiactivo (P^{32}), utilizando la técnica de “Nick-translation”. Esto se logró mezclando: 30 µl de agua desionizada + 5 µl (0.5 a 1 µg) del fragmento de DNA que deseamos hibridar (inserto) + 5 µl de dNTP-dCTP + 5 µl de α dCTP [^{32}P] + 5 µl de la enzima DNA polimerasa. La mezcla se incubó por media hora a 15 °C para después purificar la sonda radiactiva usando una microcolumna de filtración (sefarosa G50), donde se agregó la mezcla de reacción y se centrifugó por 2 minutos a 3000 rpm; el eluato contenía la sonda purificada. De esta sonda se tomo 1 µl para cuantificarla en un contador de centelleo líquido. La membrana de nitrocelulosa con el RNA fue prehibridada en una solución de hibridación por 2 horas a 42 °C y después fue hibridada a 42 °C durante toda la noche con la sonda marcada con ^{32}P (8×10^6 - 10×10^6 cpm). Después de la hibridación, las membranas fueron lavadas dos veces con una solución fría (SSC 2x + SDS 0.5%), por 15 minutos cada vez y después una sola vez con una solución caliente a 55 °C (SSC 0.1x + SDS 0.1%) por 15 minutos. Una vez hechos los lavados la membrana se expuso a una placa intensificadora y fue escaneada después de una semana en un “Phosphorimager” tipo “Storm” o tipo “Typhon”. Las membranas fueron también expuestas a placas de autorradiografía X-OMAT con pantallas amplificadoras por dos o tres semanas a -70 °C. (Sambrook *et al*, 1990; Macías-Silva *et al*, 2002)

NORTHERN BLOT. Las muestras de RNA total cuantificadas se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% por aproximadamente 3 horas a 60 V (20-30 µg de RNA total por carril). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para visualizar las bandas de RNA ribosomales con luz UV. Los RNAs se transfirieron por capilaridad del gel a una membrana de nitrocelulosa, con una solución amortiguadora de SSC 20X (cloruro de sodio 175g y citrato de sodio 88g en 1 L de dH₂O), y la transferencia fue por un tiempo

aproximado de 48 horas. Después el RNA se entrecruzó a la membrana con luz UV (5 ciclos de 0.125 Joules/cm²) y esta membrana se almacenó a T.A. (Sambrook *et al* 1990; Macías-Silva *et al*, 2002).

RT-PCR. Se sintetizó el DNA complementario (cDNA) por transcripción reversa a 42 °C por una hora, en una mezcla de reacción que contenía: 5µg de RNA total, hexámeros al azar (100ng), dNTPs (ATP, CTP, GTP, TTP, 10mM de cada uno), ditiotreitól (0.01M), la enzima transcriptasa reversa Superscript II (200 unidades de Invitrogen) y el amortiguador de reacción (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂), todo en un volumen final de 20 µl. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo usando como templado cDNA (1.5 µl de la reacción de RT), en una mezcla de reacción que contenía los primers 5' y 3'específicos de cada gen (0.5 µM), además de MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (200 µM de cada uno) y la Taq DNA polimerasa (PCR Master Mix de Qiagen). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: una desnaturalización a 90°C por 30 s, el alineamiento (ver la tabla anexa) por 1 min y la extensión a 72 °C por 1.5 min. La secuencia de los primers, las temperaturas de alineamiento, el número de ciclos para cada pareja de primers y el tamaño del fragmento amplificado se especifican en la tabla anexa. La amplificación del gen para GAPDH se llevó a cabo para normalizar los resultados. El número de ciclos para cada reacción de PCR se escogió a partir de una estandarización inicial que confirmó que las reacciones de amplificación eran llevadas a cabo dentro de un rango lineal (King KE *et al*, 2003).

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	ALINEAMIENTO (°C)	TAMAÑO (pb)	CICLOS DE PCR
5' BMP-2	ggacgtcctcagcgagtttg	55	720	30
3' BMP-2	gtttggtttggcttgacgc			
5' BMP-4	acctcagcagcatcccagag	60	456	30
3' BMP-4	gatgctgggactacgcttg			
5' BMP-6	tcgctcccaaaggctacgct	60	540	30
3' BMP-6	ggggaggagaacactatggt			
5' BMP-7	agacgccaaagaaccaagag	60	323	30
3' BMP-7	gctgtcgtcgaagtagagga			
5'GADPH	ggtgtgaaccacgagaaatgac	55	351	18
5'GADPH	ctccaggcggcatgtcagatccac			

AISLAMIENTO DE EXTRACTOS NUCLEARES DE PROTEÍNAS. Se obtuvieron extractos nucleares de fragmentos de hígado de rata sin tratamiento y de ratas tratadas con CCl₄ por los tiempos mencionados anteriormente. El fragmento de tejido hepático se lavó con PBS frío para remover la sangre, después se cortó en trocitos en una solución amortiguadora hipotónica RSB (NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM y Tris 10 mM pH 7.4) con inhibidores de fosfatasa (NaF 1 mM, NaPPi 1 mM y NaVO₄ 1 mM) y de proteasas (PMSF 1 mM, inhibidor de tripsina 100 µg/ml, y 10 µg/ml de cada uno: pepstatina A, leupeptina, antipaina, benzamidina, aprotinina y β-glicerofosfato) finalmente se homogenizó y se incubó por 5 minutos en hielo. Se centrifugaron las muestras a 3500 rpm. a 4 °C. La pastilla fue resuspendida en 0.5 ml de solución amortiguadora "C" alta en sales (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, glicerol 25%) más inhibidores de proteasas y fosfatasa y se incubó en hielo por 2 a 3 horas. Después las muestras se centrifugaron por 5 min a 14,000 rpm en frío y los sobrenadantes (extractos nucleares) se almacenaron a -70 °C (Sambrook *et al* 1990; Macías-Silva *et al*, 2002).

CUANTIFICACION DE PROTEÍNAS. La concentración de proteínas se cuantificó en los extractos nucleares obtenidos de los hígados en regeneración. Primero se descongelaron las muestras, para después cuantificarlas en el espectrofotómetro utilizando el método de Bradford. Este procedimiento consistió en poner 1 µl de extracto de proteína + 800 µl de dH₂O + 200 µl de solución de Bio-Rad. El blanco consistió en agua + solución de Bio-Rad. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 595 nm y a partir de la densidad óptica obtenida se calculó la concentración de proteína, interpolando los datos en una curva patrón realizada con albúmina.

INMUNOPRECIPITACIONES. Se incubaron de 3 a 5mg de proteína de cada una de las muestras con 5 µl del anticuerpo policlonal específico; entre los anticuerpos que se usaron están los siguientes: αSmad1/5/8, αSmad1 y αSmad4. Las proteínas previamente fueron resuspendidas en 0.5 ml de solución amortiguadora de lisis TNTE 0.5% (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón 0.5% y EDTA 1 mM más inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se incubaron con el anticuerpo a 4 °C en agitación toda la noche. Después las muestras

se centrifugaron por 5 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se transfirió a microtubos conteniendo 60 μ l de proteína G agarosa (preparada 1:5 en TNTE 0.1%) y se incubaron por 1 a 2 horas a 4 °C en agitación constante. Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 10 seg y el sobrenadante se desechó. Las pastillas se lavaron 3 veces, cada una con 1 ml de solución amortiguadora de TNTE 0.1%; después se resuspendieron en 30 μ l de solución de Laemmli (Tris 50 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.05% y DTT 100 mM), se hirvieron por 5 minutos y se guardaron a -20 °C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

INMUNOBLOTS. La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 7.5% (SDS-PAGE), se realizó a 150 V por aproximadamente 2 horas. Además de las muestras, se pusieron 5 μ l de los marcadores de pesos moleculares preteñidos en uno de los pozos del gel como referencia. Después, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF, utilizando como solución de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. La transferencia se realizó a 100 V por una hora a 4 °C y con la solución de transferencia en agitación constante. Una vez hecha la transferencia, las membranas se etiquetaron claramente. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche en polvo sin grasas preparada al 5% con TBS-T (Tris base 20 mM pH 7.6, NaCl 137 mM, HCl 3.8 mM y Tween-20 0.05%), durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Después las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C en agitación constante. La dilución del anticuerpo fue de 1:1,000 en TBS-T. Al día siguiente, se hicieron tres lavados de la membrana con abundante TBS-T, por tres minutos cada vez a T.A. y en agitación constante; después se incubó con una dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano ("horseradish peroxidase", HRP de Zymed), por una hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, se repitieron los lavados descritos antes, y se reveló por quimioluminiscencia usando los reactivos del kit ECL de Amersham; para ello las membranas se incubaron con los reactivos por 1 minuto en agitación y después se expusieron a una placa de autorradiografía a T.A. (Sambrook *et al* 1990; Macías-Silva *et al*, 2002).

AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS, CELULAS ESTRELLADAS, CELULAS ENDOTELIALES Y DE KUPFFER. Los hepatocitos fueron aislados por el método de digestión con colagenasa descrito por Berry y Friend. Esta técnica consiste en canular la vena porta hepática y perfundir el hígado con una solución Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) sin calcio a 37°C, gaseada con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) para mantener un pH de 7.4 (Berry & Friend, 1969). El hígado canulado y perfundido fue digerido con colagenasa en KRB con calcio (1.2 mM). La suspensión de células obtenidas se lavó tres veces en KRB con calcio y la viabilidad de las células se evaluó con la prueba de exclusión de azul de tripano, al observarlas en el microscopio óptico.

En cuanto a las células estrelladas, endoteliales y de Kupffer, estas se aislaron con algunas modificaciones del procedimiento inicial (Ratziu et al, 1998). El hígado se perfundió simultáneamente con una mezcla de pronasa y colagenasa. Las células aisladas primero se centrifugaron a 400 rpm por 2 minutos, para excluir a los hepatocitos; luego fueron ultracentrifugadas en un rotor SW40 por 25 minutos a 20,000 rpm en gradientes de densidad de acudenz para separar a las células estrelladas (acudenz al 8.2%), de las endoteliales y de Kupffer (acudenz al 15.6%). Las células se lavaron con KRB-Ca⁺² y enseguida se utilizaron, o bien en el caso de las células estrelladas se cultivaron en cajas de petri por periodos de 2 días en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino más antibióticos (100 U/ml de cada uno: penicilina, estreptomycin y gentamicina), (Sambrook et al 1990).

VI. RESULTADOS.

Niveles de expresión de los RNAm de las Smads durante la regeneración hepática inducida con CCl₄.

La regeneración hepática es un proceso que implica muchos cambios en la expresión de diferentes genes, es por ello que como primer objetivo evaluamos los niveles de expresión de las proteínas Smad, que median las acciones de las BMPs. Para lograr detectar como cambian los niveles de expresión de los RNAm de las Smads que son componentes de la vía de las BMPs (Smad1, -5, -6 y -8, además de la Smad común, Smad4) durante la regeneración del hígado. Se indujo la regeneración del hígado, con un daño agudo causado con una sola dosis de tetracloruro de carbono (CCl₄) por diferentes tiempos que fueron de 2, 6, 24, 48, 72 y 120 horas (h), así como de 7, 14, 21 y 28 días (d). Luego se colectó un fragmento de hígado de las ratas tratadas y sin tratar (control de cero horas, 0h) para aislar RNA total de cada uno de los hígados en las diferentes etapas de regeneración. El análisis de los RNAs obtenidos se realizó por medio del método de Northern blot, usando cDNAs completos de Smad1, Smad4, Smad5 y Smad6 como sondas. Después de hacer los análisis del RNA por Northern blot, se observó una banda principal de RNAm para Smad1 (3.8 Kb), una banda para Smad5 (3.6 Kb) y también una banda de Smad6 (2.5 Kb), así como dos bandas principales de RNAm para Smad4 (3.8 y 5.8 Kb). Cabe mencionar que no se pudieron detectar los niveles de expresión del RNAm de Smad8 en hígados de rata mediante el método de Northern blot (datos no mostrados). La ATP-sintetasa fue utilizada como control de carga del RNA total, ya que no cambia su expresión durante la regeneración hepática, y se observa como una banda sencilla (1.9 Kb).

Los datos obtenidos muestran que los niveles de RNA mensajero de Smad1 no tienen cambios significativos durante el curso de la regeneración hepática con respecto al hígado control en estado quiescente, aunque se observa una ligera reducción en los niveles del RNAm en los primeros tres días posteriores al tratamiento con CCl₄ (Figura 1).

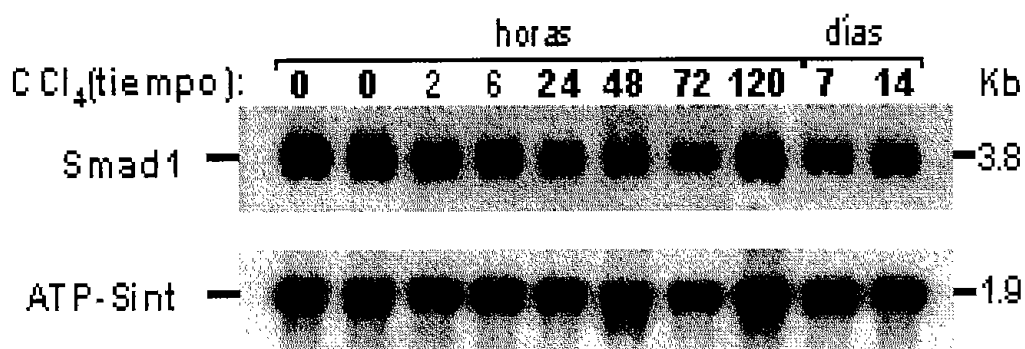


Figura 1. Niveles de expresión de los RNAm de Smad1. Los niveles de expresión de Smad1 muestran una ligera disminución en los primeros 3 días de la regeneración del hígado con respecto a los tiempos controles (0 h) de hígados normales. El RNA total de los hígados en regeneración, fue aislado a distintos tiempos luego del daño provocado con CCl₄. El análisis de Northern blot del RNAm de Smad1 se realizó usando como sonda el cDNA completo de Smad1. La cuantificación de los niveles del RNAm de la ATP-Sintetasa (ATP-Sint) se utilizó como control de carga del RNA total. Este es un experimento representativo de 3 realizados en las mismas condiciones.

En la figura 2 observamos los niveles de expresión del RNAm de Smad5 (3.5 kb) y del RNAm de Smad6 (2.5 kb) durante diferentes etapas de la regeneración hepática inducida por CCl₄. Los niveles de expresión del RNAm de Smad5 muestran una ligera disminución en los primeros 3 días posteriores al daño inducido con CCl₄, mientras que el RNAm de Smad6 no muestran cambios significativos durante el proceso de regeneración con respecto al hígado control (0 h).

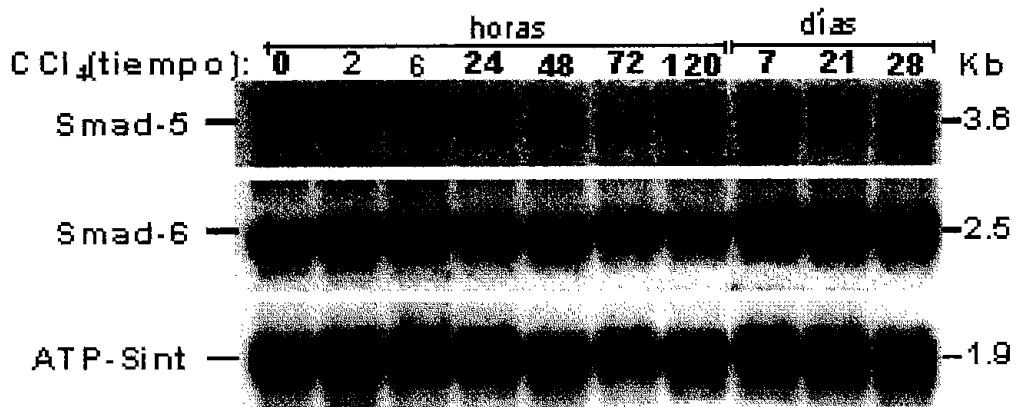


Figura 2. Niveles de expresión de los RNAm de Smad5 y Smad6. Los niveles de expresión de los RNAm de Smad5 y de Smad6 no muestran cambios significativos durante la regeneración del hígado. RNA total de hígado de rata en regeneración fue aislado a distintos tiempos luego de un daño provocado con CCl₄. El análisis de Northern blot de los RNAm de Smad5 y de Smad6 se realizó con cDNAs completos de Smad5 y Smad6 como sonda. El RNAm de la ATP sintetasa se utilizó como control de carga. Este es un experimento representativo de 3 realizados en las mismas condiciones.

Además de los RNAm de Smad1, Smad5 y Smad8, que son substratos del receptor tipo I de la vía de transducción de las BMPs, se analizó también la expresión de los niveles del RNAm de Smad6 y de Smad4 (Co-Smad o Smad común). En el Northern de Smad4 se presentan dos bandas (3.8 y 5.8 Kb) y se observa una ligera disminución de estos RNAm durante los primeros 2 y 5 días después del daño inducido con CCl₄ (Figura 3).

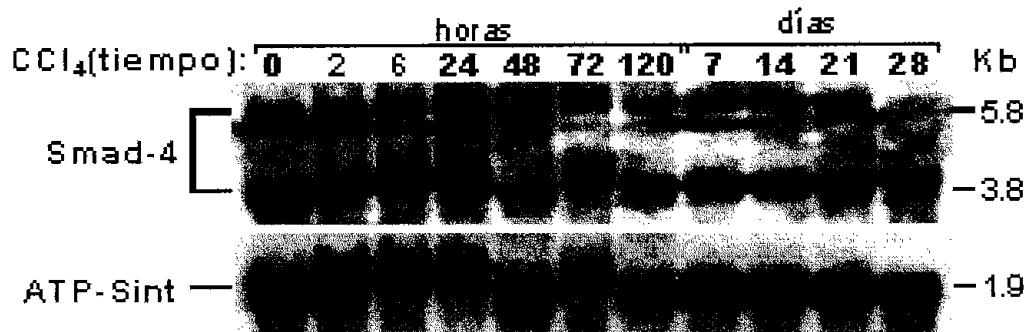


Figura 3. Niveles de expresión de los RNAm de Smad4. Los niveles de expresión de RNAm de Smad4 muestran ligeros cambios durante la regeneración del hígado. El RNA total de hígado de rata en proceso de regeneración fue aislado a distintos tiempos luego de un daño agudo provocado con CCl₄. El análisis por Northern blot del RNAm de Smad4 fue hecho con el cDNA completo de Smad4 como sonda. El RNAm de la ATP-Sintetasa (ATP-Sint) se utilizó como control de carga. Este es un experimento representativo de 3 realizados en las mismas condiciones.

Niveles de expresión de los RNAm de algunas de las BMPs durante la regeneración hepática inducida con CCl₄.

Para lograr conocer más acerca de la vía de las BMPs durante el proceso de regeneración hepática y ver su comportamiento, se pensó en detectar los niveles de expresión de los RNAm de algunas BMPs durante el proceso. Para lograr este objetivo se hizo la evaluación de los niveles de los RNA mensajeros de algunas BMPs: BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7 durante el proceso de regeneración hepática mediante el método de RT-PCR. Para ello, se sintetizó el cDNA total a partir del RNA total aislado de hígados en regeneración colectados en los tiempos indicados de tratamiento con CCl₄. Posteriormente, se amplificaron por PCR los fragmentos de cDNA de las BMPs seleccionadas, que corresponden a las más comunes en los tejidos. Se utilizó el RNAm de la GAPDH como control de carga de RNA, ya que es otro gen cuya expresión no se modifica durante el proceso regenerativo, como en el caso de la ATP sintetasa. Se observó de forma interesante un incremento pequeño y transitorio en los niveles de RNAm de BMP7 principalmente entre 2 y 48 horas después del tratamiento con CCl₄ (~1.7 veces

de inducción sobre el control de 0 horas). No se observaron cambios significativos en los niveles de los RNAm de BMP2, BMP4 y BMP6 durante las diferentes etapas analizadas del proceso de regeneración (Figura 4).

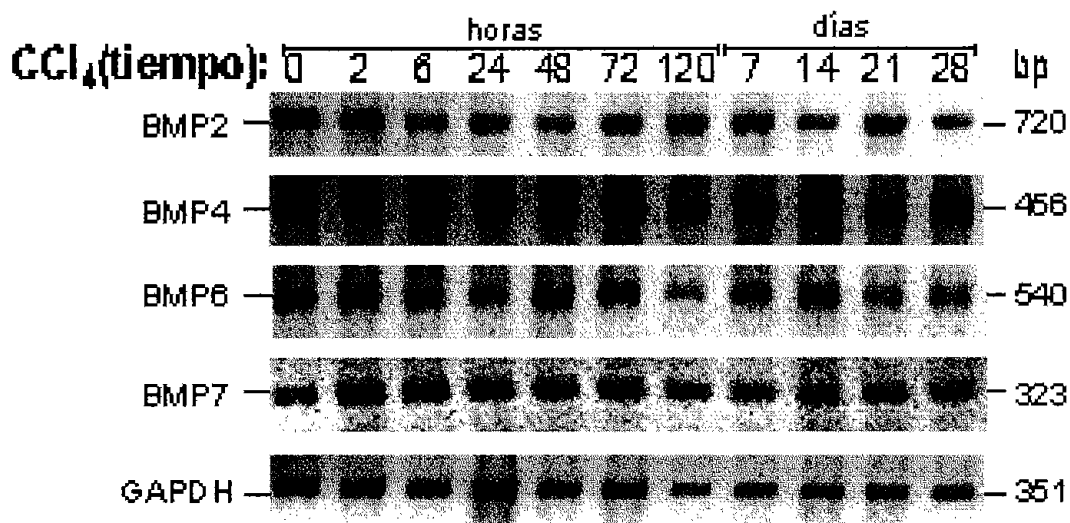


Figura 4. Niveles de expresión de los RNAm de las BMPs durante la regeneración hepática inducida con CCl₄. Los niveles de RNAm de BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7 se detectaron en hígado en reposo y en regeneración por medio de RT-PCR. Los niveles del RNAm de BMP7 son los únicos que presentan un ligero incremento entre 2 y 48 horas después del daño hepático, en las demás BMPs no se observan cambios significativos. Se colectó el hígado a distintos tiempos luego del tratamiento con CCl₄ y el RNA total fue purificado y procesado para realizar la técnica de RT-PCR. En este caso se usó GAPDH como RNA control. Este es un experimento representativo de 3 realizados en las mismas condiciones.

La vía de las BMP/Smads se encuentra activada tanto en hígado en estado de reposo como en hígado en regeneración inducida por CCl₄.

La vía de transducción de señales de las BMPs es importante durante el proceso de hepatogénesis y en la actualidad se desconoce si estas citocinas también participan durante la regeneración hepática. Para estudiar la actividad de las BMPs en el hígado es

crítico evaluar la activación de las Smad en el transcurso de la regeneración del hígado inducida mediante un daño agudo con CCl₄, es decir examinando los niveles de expresión de la proteína Smad1 así como los niveles de Smad1 fosforilada (fosfo-Smad1). Flanders y colaboradores demostraron la localización en el núcleo celular de Smad1 en hígados normales de ratones, sugiriendo que la vía de señalización de BMP/Smad1 en hígados en estado quiescente se encuentra activada, ya que se sabe que la translocación nuclear de Smad1 implica la activación de la vía (Flanders *et al*, 2001). En nuestro trabajo se obtuvieron extractos de proteínas nucleares de hígados en regeneración, inducida por un daño hepático por CCl₄ por diferentes tiempos. La proteína Smad1 fue inmunoprecipitada con anticuerpos específicos y los niveles de proteína Smad1 y de fosfo-Smad1 se analizaron por medio de Western blot. Los datos obtenidos muestran que los niveles de las proteínas Smad1 y Smad4 no cambian durante el curso de la regeneración. Sin embargo se detectaron altos niveles de la proteína Smad1 fosforilada tanto en hígado en regeneración como en hígado quiescente, confirmando la observación previa de Flanders y colaboradores (Flanders *et al*, 2001) y demostrando la activación de Smad1 también durante la regeneración del hígado. Por otro lado, los niveles de la proteína Smad4 permanecen sin cambio en el proceso de regeneración hepática inducida por CCl₄ (Figura 5).

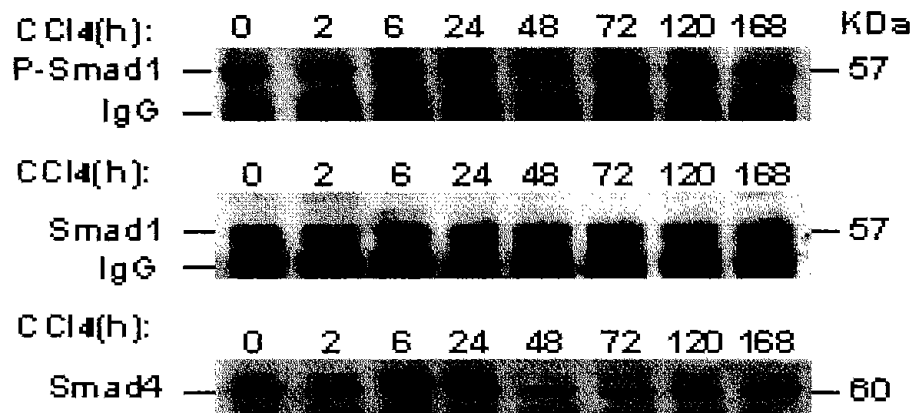


Figura 5. Activación de la vía de las BMPs/Smads en hígado quiescentes y en regeneración. La cuantificación de los niveles de las proteínas Smad1 y Smad4 no muestran cambios significativos, sin embargo se observan altos niveles de Smad1 fosforilado (P-Smad1) tanto en hígado en estado de reposo como en hígado en regeneración. Los hígados en regeneración fueron colectados a distintos tiempos de tratamiento con CCl₄ y se prepararon extractos de proteínas nucleares (EN). Los EN se usaron para inmunoprecipitar (IP) Smad1 y Smad4. Los niveles de las proteínas P-Smad1, Smad1 y Smad4 se detectaron por inmunoblot, utilizando anticuerpos policlonales específicos y un ensayo de quimioluminiscencia (ECL). Este es un experimento representativo de 3 realizados en las mismas condiciones.

BMP-2 induce la fosforilación de Smad1 en las células hepáticas.

Con el objeto de entender el papel de la vía de las BMPs en las células del hígado, exploramos si las células hepáticas son sensibles a BMP-2, para lo cual se examinó la fosforilación de Smad1 inducida con BMP-2 recombinante. Se utilizaron células frescas, recién aisladas tales como hepatocitos, células estrelladas, células de Kupffer y células endoteliales, así como cultivos primarios de células estrelladas (2 días) y células HepG2 (una línea celular de hepatoma). Todas las células fueron tratadas por 30 minutos en presencia o ausencia de 10 nM de BMP-2. En estos experimentos se logró detectar que BMP-2 indujo la fosforilación de Smad1 endógena en las células HepG2 y en algunas células hepáticas, principalmente en hepatocitos y en células estrelladas de 2 días de

cultivo primario. No se observó un incremento en la fosforilación de Smad1 en células estrelladas hepáticas aisladas frescas (0 d) ni tampoco en células endoteliales y células de Kupffer (Figura 6).

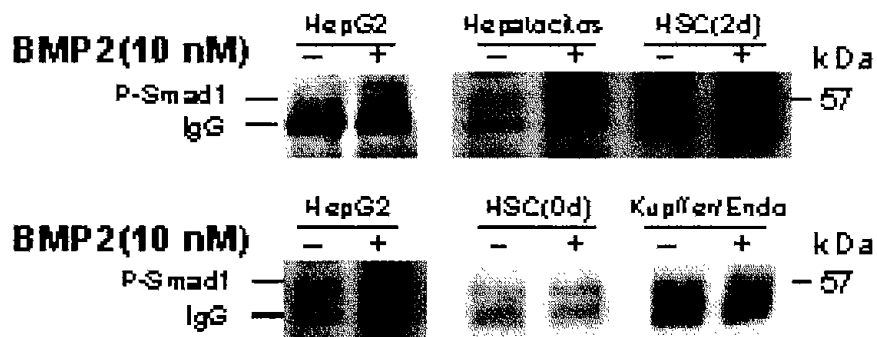


Figura 6. BMP-2 induce la fosforilación de Smad1 en células hepáticas. Hepatocitos recién aislados, células estrelladas frescas (HSC, 0d), células endoteliales y células Kupffer recién aisladas (Kupffer/Endo), y cultivos primarios de HSC de 2 días (HSC, 2d) así como células HepG2, controles y tratadas con 10 nM de BMP-2 por 1 hora. Después del tratamiento con BMP-2 las células fueron lisadas y la proteína Smad1 se inmunoprecipitó con anticuerpos policlonales específicos. Los niveles de Smad1 fosforilada (P-Smad1) se detectaron por un inmunoblot usando anticuerpos policlonales específicos y revelando por quimioluminiscencia (ECL). Solamente los hepatocitos, las células estrelladas cultivadas (2d), y las células HepG2 mostraron un aumento en la fosforilación de Smad1 en respuesta al tratamiento con BMP-2. Este es un experimento representativo de 3 realizados en las mismas condiciones.

VII. DISCUSIÓN.

Distintos estudios han demostrado que la vía de transducción de las BMPs tiene funciones importantes en muchos procesos durante la embriogénesis temprana (Zaret, 2001; Zaret, 1998; Duncan *et al*, 2001; Rossi *et al*, 2001). La extensa distribución de las BMPs en varios tejidos de organismos adultos, sugiere que las BMPs tienen un papel en la regulación del crecimiento y diferenciación de diversos órganos como es el caso del hígado (Flanders *et al*, 2001). Recientes estudios describen un efecto de las BMPs en células hepáticas y han demostrado que algunas BMPs se expresan en el hígado donde pueden tener diferentes funciones.

En este estudio se examinó la vía de las BMPs/Smad durante la regeneración hepática en ratas tratadas con CCl₄. El objetivo fue determinar el estado de activación de la vía de transducción de las BMP durante este proceso. Los resultados muestran que la proteína Smad1 está activada en hígado quiescente y durante el proceso total de regeneración hepática, lo cual apoya la hipótesis de que las señales de las BMPs están activas en este proceso y probablemente tengan un papel importante. Una hipótesis es que la vía de las BMPs en el hígado participa para mantener un fenotipo hepático, sin embargo se requieren de varios estudios para conocer a fondo este punto. Cabe señalar que este trabajo es uno de los primeros en estudiar la vía de transducción de señales de las BMPs durante el proceso de la regeneración hepática.

La regeneración hepática es un modelo ampliamente estudiado de proliferación celular. Mientras muchos factores de crecimiento se han propuesto como iniciadores del proceso de regeneración hepática, los miembros de la familia del TGF- β han sido propuestos como los principales candidatos para detener la proliferación cuando la masa funcional ha sido recuperada. Se sabe, que los niveles de proteínas y de RNAm del TGF- β y la activina A se incrementan pocas horas después de una hepatectomía parcial o de un daño tóxico, sin embargo aún no es claro si también se induce la vía de las BMPs. Los resultados de este trabajo muestran un incremento ligero y transitorio de RNAm de BMP-7 entre las 2 y las 48 horas después de un tratamiento con CCl₄, y no existe ningún cambio significativo en los niveles de RNAm de BMP-2, 4 y 6 con el mismo tratamiento. Pensamos que es necesario estudiar los niveles de las proteínas BMPs para concluir si existe alguna regulación de los niveles de BMPs durante el proceso de regeneración. Otra manera de

abordar este punto, es evaluar los niveles de fosfo-Smad1, lo cual refleja la actividad de las BMPs. Los resultados obtenidos claramente muestran altos niveles de Smad1 fosforilada en hígados en regeneración, lo que indica el estado activado de la vía de las BMPs y sugieren un papel importante de las BMPs en la homeostasis del hígado. Sería muy interesante determinar claramente las funciones de estas señales en la regeneración hepática.

No se observaron cambios significativos en los niveles de RNAm y de proteínas de las Smad1 y Smad4, lo cual puede sugerir que los niveles de estos componentes de la vía de las BMPs no están regulados durante la regeneración hepática. También se estudiaron de los niveles de expresión de RNAm de Smad6, pero no se encontraron cambios en su expresión durante el proceso de regeneración de hígado. Smad6 es un gen inducible por miembros de la familia del TGF- β , y esta proteína está implicada en la regulación de la señalización de las BMPs. Desgraciadamente, no existen anticuerpos específicos confiables que estén disponibles comercialmente para estudiar la expresión de la proteína endógena Smad6 en el hígado.

Por otro lado, también se examinó si las células hepáticas son sensibles o responden a la vía de las BMPs, y se utilizó a la BMP-2 recombinante que es uno de los ligandos que parece activar a todos los receptores tipo I de las BMPs. Los resultados muestran que BMP-2 induce la fosforilación de Smad1 en hepatocitos y en cultivos primarios de células estrelladas de 2 días. Por otra parte se encontró que las células endoteliales, Kupffer y estrelladas, recién aisladas, no responden a BMP-2. Es necesario examinar el efecto de otras BMPs sobre las células hepáticas, aunque podríamos esperar resultados similares a los de BMP-2 debido a que se supone que casi todas las BMPs pueden compartir el mismo complejo de receptores y la misma vía de las proteínas Smad. Sin embargo, muchos de los ratones deficientes en alguno de los componentes de la vía de las BMPs hasta ahora reportados mueren, lo que dificulta su uso para estudiar esta vía.

La activina A y el TGF- β son capaces de inhibir la proliferación de hepatocitos e inducir en ellos muerte celular. De manera interesante, varios datos sugieren un papel de la activina A o del TGF- β para mantener a las células hepáticas en la fase G0 del ciclo celular, en el hígado de reposo. También se ha sugerido que estos ligandos pueden participar en la remodelación de la arquitectura del hígado a través de la regulación de

proteínas de la matriz extracelular y en la terminación del proceso de regeneración. Recientemente estudios de nuestro laboratorio muestran que la vía del TGF- β esta activa en hígado de ratón en proceso regenerativo inducido por una hepatectomía parcial, lo que sugiere un papel activo de la vía del TGF- β en este proceso (Macías-Silva et al, 2002). En el caso de las BMPs existe poca información disponible sobre su papel en la homeostasis del hígado. Sin embargo, se propone que BMP-6 tiene un papel biológico ya que se sobreexpresa en cultivos celulares y en modelos in vivo. Un estudio reciente reporta que la expresión de BMP-6 es incrementada durante la activación de células estrelladas hepáticas y también se observó en células de Kupffer (Knittel et al, 1997). Sin embargo, el papel de BMP-6 en el hígado aún queda por ser aclarado. Por otra parte, se conoce que las isoformas de los TGF- β 1-3 son expresadas en el hígado así como las BMPs, incluyendo BMP-6 y BMP-9. El TGF- β se considera como un factor primordial en la progresión de los procesos fibrótico y regenerativo del hígado, mientras que el papel de las BMPs aún no es claro. Existe amplia evidencia de que citocinas de la superfamilia del TGF- β están presentes en el hígado de organismos adultos y que el TGF- β por sí mismo es parte integral de procesos asociados con enfermedades del órgano. Por esto, una futura caracterización de la vía de las BMPs en células hepáticas ayudará de manera importante en la comprensión de la utilidad fisiológica de esta familia de citocinas en el contexto de función y disfunción del hígado.

Por otro lado, de manera interesante varios estudios han mostrado que la vía de las BMPs tiene un papel importante durante el desarrollo del hígado y promueven que al menos dos vías de señalización den origen a diferentes tejidos, el FGF (mesodermo cardiaco) y las BMPs (septo transversal mesenquimal), que pueden converger en el endodermo ventral para conducir hacia el proceso de la hepatogénesis (Zaret, 1998). Las BMPs y el FGF actúan concertadamente, de manera que el endodermo ventral adopta una forma hepática. La ausencia de alguna de estas señales conduce a una forma pancreática del endodermo (Zaret, 1998; Duncan et al, 2001). Sin embargo aún se desconocen los componentes blanco, corriente abajo de la vía de las BMPs en el desarrollo del hígado (Rossi et al, 2001). Recientemente se encontró, un posible blanco de la vía de las BMPs, el gen Hex, en el cual ha sido identificado un elemento de respuesta a BMPs dentro de su promotor (Zhang et al, 2002). Además, ratones mutantes carentes de la expresión de Hex,

mueren debido al daño en el desarrollo del hígado; y por otro lado, la expresión de Hex en endodermo de pollo requiere de las señales de las BMPs en forma autocrina (Zhang *et al*, 2004). Los resultados de este trabajo demuestran que la vía de las BMPs se encuentra en estado activado tanto en hígado en reposo como en hígado regenerativo, sugiriendo que la vía de las BMPs puede contribuir de manera importante para mantener un fenotipo hepático en animales adultos y durante la regeneración del hígado, dada su importancia durante la hepatogénesis, sin embargo se requieren más estudios para comprobarlo.

Es claro que surgen muchas preguntas en cuanto al papel de las BMPs en el hígado, aunado esto a la escasez de información actualmente disponible relacionada a este tema, implica que se debe de hacer algún otro estudio más a fondo para tratar de resolver las dudas al respecto, y quizás es necesaria la planeación de diversos proyectos de investigación conjuntos, interdisciplinarios y a un nivel de posgrado.

Entre las perspectivas del trabajo se planea inicialmente estudiar la vía de las BMPs en el modelo de regeneración hepática inducida por una hepatectomía parcial y después aislar a las diferentes células hepáticas de hígados en regeneración y analizar como se encuentra la vía de las BMPs en cada una de las células hepáticas.

VIII. CONCLUSIONES

La vía de transducción de las BMPs/Smads se encuentra activada en estado quiescente y durante el proceso de regeneración del hígado de rata. El estado activado de la vía de transducción de las BMPs/Smad1 en hígado en reposo y durante la regeneración hepática nos hace pensar que podría también ser un proceso importante para mantener un equilibrio homeostático y la diferenciación de las células hepáticas en el tejido hepático establecido (adulto). Se destaca en el trabajo el hallazgo de que los niveles de fosforilación de Smad1 aumentan durante la regeneración en relación con los controles (hígados en reposo), señalando una actividad de las BMPs en el proceso, tal y como probablemente ocurre durante la hepatogénesis, lo cual apoya así nuestra hipótesis.

IX. REFERENCIAS

- Attisano L & Wrana J L. (2002) Signal Transduction by the TGF- β Superfamily. *Science*. Vol. 296: 1646-1647.
- Azari K, Doll BA, Sfeir Ch, Mu Y, Hollinger JO. (2001) Therapeutic potential of bone morphogenetic proteins. *Expert Opinion Investigation of Drugs*. 10(9):1677-1686.
- Berk PD, Chalmers TC (1981) Hepatology in the next seventy-five years., eds. *Frontiers in liver disease*. New York: Thieme Stratton; 336-339.
- Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
- Border W A. & Noble N A. (1995, Jan-Feb), TGF- β , *Scientific American* (Science and medicine), 68-77.
- Chen C, Grzegorzewski KJ, Barash S, Zhao Q, Schneider H, Wang Q, et al. (2003) An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol*; 21(3): 294-301.
- Duncan SA, Watt AJ. (2001) BMPs on the road to hepatogenesis. *Genes Dev*. 15(15): 1879-84.
- Flanders KC y Roberts AB. (2002) TGF β . En *Cytokine references*. Editores: S.K. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. A. Incola. Academic Press. pp: 719-739.
- Flanders KC, Kim ES y Roberts AB (2001), Immunohistochemical Expression of Smads 1-6 in the 15-Day Gestation Mouse Embryo: Signaling by BMPs and TGF- β s. *Developmental Dynamics*, 220:141-154.
- Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, Okada MH, Fujii M, Blalock TD, Schultz GS, Sowers A, Anzano MA, Mitchell JB, Russo A y Roberts AB. (2003) Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol*. 163(6): 2247-57.
- Friedman SL, (2000). Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury, *The Journal of Biological Chemistry*. Vol.275, N°4, 2247-2250.
- González-Mora M. G. (1997) Regulación en los mecanismos de crecimiento tisular. *Boletín de educación bioquímica*, 53-60.

- Hogan BLM. (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Dev*; 10: 1580-1594.
- Ken WY Cho & Blitz IL. (1998) BMPs, Smads and metalloproteasas: extracelular and intracelular modes of negative regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8:443-449.
- King KE, Iyemere VP, Weissberg PL, Shanahan CM. (2003) Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor b1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem*; 278(13): 11661-11669.
- Knittel T, Fellmer P, Muller L, Ramadori G. (1997) Bone morphogenetic protein-6 is expressed in nonparenchymal liver cells and upregulated by transforming growth factor- β 1. *Exp Cell Res*; 232: 263-269.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA (1990). *Texto/Atlas de Histología*. Interamericana: México, 475-498.
- López Casillas F. (1988) El lado oscuro y el lado brillante del TGF- β . *Mensaje bioquímico*. Vol XXII: 137-161.
- Macías-Silva M, Abdollah S, Hoodless PA, Pirone R, Attisano L, Wrana JL. (1996) MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell*; 87(7): 1215-24.
- Macías-Silva M, Li W, Leu JL, Crissey MA, Taub R. (2002) Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem*; 277(32): 28483-90.
- Michalopoulos GK, De Frances MC. (1997) Liver regeneration. *Science*; 276:60–66.
- Miller AF, Harvey SA, Thies RS, Olson MS. (2000) Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *Journal of Biological Chemistry*; 275(24): 17937-17945.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para el uso y manejo de animales de laboratorio).

- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Protección Ambiental - Salud Ambiental-Residuos Biológico - Infecciosos-Clasificación y Especificaciones de Manejo).
- Ratzliff V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL. (1998) Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(16): 9500-5.
- Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. (2001) Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*; 15(15): 1998-2009.
- Rossmanith W, Schulte-Hermann R. (2001) Biology of transforming growth factor beta in hepatocarcinogenesis. *Microsc Res Tech*; 52(4): 430-6.
- Sambrook J, Fritish E.F. y Maniatis T. (1990). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Edition.
- Sosa-Garrocho M. y Macías-Silva M. (2004). El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): Funciones y vías de transducción. *Revista de Educación Bioquímica*. Volumen de Marzo:1-23.
- von Bubnoff A, Cho KW. (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network. *Developmental Biology*; 239(1): 1-14.
- Weber Lutz W. D, Boll M, y Stampfl A. (2003) Hepatotoxicity and Mechanism of Action of haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model, *Criticals Reviews In Toxicology*, 33(2): 105-12.
- Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA. (1969) Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol*. 42: 68-91.
- Wisse, Geerts A, Bouwens L, Vanderkerken K, Van Goethem F. (1988) An attempt to review the IVth international Kupffer cell symposium. *Cell of hepatic sinusoid Anno*.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*; 370(6488): 341-7.
- Wrana JL. (1999) Transforming growth factor-beta signaling and cirrhosis. *Hepatology*; 29:1909–1910.

- Zaret K. (1998) Early liver differentiation: genetic potentiation and multilevel growth control. *Curr Opin Genet Dev*; 8(5): 526-31.
- Zaret KS. (2001) Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev*; 11(5): 568-74.
- Zhang W, Yatskievych TA, Baker RK, Antin PB. (2004) Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. *Dev Biol*; 268(2): 312-26.
- Zhang W, Yatskievych TA, Cao X, Antin PB. (2002) Regulation of Hex gene expression by a Smads-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*; 277(47): 45435-41.