



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMUNICACIÓN CELULAR MEDIADA POR NUCLEÓTIDOS
EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

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

PRESENTA:
ERANDI VELÁZQUEZ MIRANDA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. FRANCISCO GABRIEL VÁZQUEZ CUEVAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. BRENDA ANGUIANO SERRANO
INSITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

QUERÉTARO, JUNIO 2017



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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Erandi Velázquez Miranda, cuyo título es: "Comunicación celular mediada por nucleótidos en la fibrosis hepática", se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente:

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Secretario (Tutor):

Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Vocal:

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Suplente:

Dra. Yazmín Macotella Guzmán

Suplente:

Dr. Daniel Reyes Haro

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz
Coordinadora del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

RESUMEN

El 5'-adenosina trifosfato (ATP) y sus metabolitos pueden funcionar como *patrones moleculares asociados al daño* (DAMPs) en diversos tejidos como el hígado. Ante un daño, se desencadenan vías de señalización pro-inflamatorias, una de las cuales es a través de los DAMPs. En una condición de daño crónico, la respuesta de inflamación se mantiene y la cicatrización se convierte en aberrante estableciendo la condición patológica conocida como fibrosis hepática. Existe evidencia sobre la presencia de elementos de la comunicación purinérgica en el hígado en condiciones fisiológicas y bajo algunas condiciones de daño pero aún falta por dilucidar si participa en un cuadro fibrótico. Se obtuvo cultivo primario de hepatocitos en un modelo experimental de fibrosis hepática, a través de la administración del hepatotóxico tetracloruro de carbono (CCl₄), después de lo cual los cultivos recibieron la administración de agonistas de los receptores purinérgicos P2Y. Los resultados muestran que en el modelo de fibrosis hepática aumentó de manera significativa la cantidad relativa de transcrito de los receptores P2Y₂ y P2Y₆, mientras que la de los receptores P2Y₁₃ y P2Y₁₄ disminuyó de manera significativa. El análisis por inmunofluorescencia confirmó un mayor nivel de expresión del receptor P2Y₂ en el de CCl₄. Lo anterior fue consistente con el resultado de la respuesta a los agonistas purinérgicos del grupo de CCl₄, la cual fue significativamente mayor que el grupo vehículo. Con esto se concluye que la comunicación purinérgica está presente durante la fibrosis; sin embargo, es importante conocer el papel que tiene en esta patología.

SUMMARY

The 5'-adenosine triphosphate (ATP) and its metabolites can signal as *damage associated molecular patterns* (DAMPs), in different tissues such as the liver. When damage occurs, pro-inflammatory signaling pathways are activated and one of these pathways is through DAMPs signaling. In a chronic damage condition, the inflammatory response persists and scarring processes become aberrant, establishing the pathological condition of hepatic fibrosis. There is evidence about the presence of different elements of purinergic communication in the liver in physiological conditions and under several damage contexts, but the question of whether or not the purinergic system participates in fibrosis still remains. Since parenchymal cells constitute most of the liver tissue, we established a protocol for extracting and obtaining primary cultures of hepatocytes in an experimental model of liver fibrosis, through the administration of a hepatotoxic, carbon tetrachloride (CCl₄), after which cultures received administration of P2Y purinergic receptors agonists. Results demonstrated that in the hepatic fibrosis model, relative transcript expression of receptors P2Y₂ and P2Y₆ significantly increased, while P2Y₁₃ and P2Y₁₄ receptors significantly reduced their expression. Immunofluorescent analysis confirmed an increase in the expression of the P2Y₂ receptor in the CCl₄ group. These results were consistent with the response to the purinergic agonists in the group administered with CCl₄, which was significantly higher than the response displayed by the vehicle group. With this, we conclude that purinergic communication is present during hepatic fibrosis; nonetheless, it is important to investigate its role in this pathological condition.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas. El proyecto fue apoyado PAPIIT-DGAPA-UNAM, México (número IN201017 para FG V-C e IN200815 para Mauricio Díaz Muñoz). Erandi Velázquez Miranda recibió apoyo del CONACyT (589203).

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM

Al Dr. Francisco Vázquez Cuevas por su guía y enseñanzas y forjarme en esta etapa de desarrollo académico

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz por la crítica constructiva siempre con el objetivo de mejorar mi rendimiento académico y por el apoyo para realizar los experimentos dentro del Laboratorio de Fisiología Celular

A la Dra. Eva Olivia Vázquez Martínez por su apoyo técnico durante el desarrollo de estos experimentos

A la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y a la Dra. Brenda Anguiano Serrano por sus valiosas aportaciones al trabajo y contribuir en mi formación académica

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por el apoyo académico y guía para la realización de trámites escolares

A las secretarías Guadalupe Amador y Carmen Mendoza por todo el apoyo con respecto a la orientación y trámites realizados

Al personal de la Unidad de Proteogenómica

Dra. Anaid Antaramian por el apoyo otorgado con los experimentos realizados en la Unidad de Proteogenómica

M. en C. Adriana González Gallardo por el análisis de datos y la realización de experimentos.

Al personal del Bioterio

M.V.Z. José Martín García Servín, responsable del Bioterio

Dra. Alejandra Castilla León

DEDICATORIAS

A mi familia, a mis padres Elvia Miranda y Arturo Velázquez y a mi hermana Paulina, a quienes les debo todo lo que soy ahora.

A Marco Antonio Bravo, por compartir parte de este camino conmigo y hacerlo una experiencia muy especial.

A mis compañeros y amigos, en especial a Anaí Campos, Carolina Castañeda, Cristina Siller y Sofía Martínez, por todos los momentos compartidos en esta etapa.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a Mariana y Annie, por ser parte de mi crecimiento personal y académico.

A todos mis compañeros del laboratorio B-11, por todo el aprendizaje y por endulzar cada momento con un pastel.

INDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES	10
1. Sistema purinérgico.....	10
1.1 Receptores P2Y	12
2. ATP como patrón molecular asociado al daño (DAMP).....	16
3. Fibrosis hepática.....	18
3.1 Sistema purinérgico en la fibrosis hepática	22
3.1.1. El receptor purinérgico P2Y ₂ en el hígado.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
Objetivos específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Animales de experimentación.....	26
Materiales	26
Aislamiento y cultivo de hepatocitos.....	26
Western blot.....	27
Inducción de fibrosis hepática por la administración de CCl ₄	28
Análisis de la diversidad de receptores purinérgicos expresados en un cuadro fibrótico por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	29
Análisis de la expresión del receptor P2Y ₂ por inmunofluorescencia.....	30
Análisis estadístico	31

RESULTADOS	32
Inducción de fibrosis hepática por la administración de CCl ₄	32
Análisis de la expresión de receptores P2Y por qPCR	34
Expresión del receptor P2Y ₂ en rebanadas de hígado.....	35
Estandarización de cultivos primarios de hepatocitos	36
Caracterización de la respuesta 3 y 24h post-aislamiento.....	37
Respuesta purinérgica inducida por UTP o UDP en hepatocitos aislados de animales inyectados con CCl ₄ o vehículo.....	40
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES.....	45
PERSPECTIVAS.....	46
REFERENCIAS	47
LISTA DE FIGURAS.....	56
LISTA DE TABLAS.....	56

INTRODUCCIÓN

El ATP es un nucleótido que funciona como una molécula de intercambio de energía en la fisiología celular; sin embargo, está bien establecido su papel como molécula señalizadora que actúa sobre su propia familia de receptores para conformar lo que se conoce como comunicación purinérgica. Esta señalización participa en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos, por ejemplo como patrón molecular asociado al daño (DAMP) ante una lesión.

Una enfermedad en donde se puede observar esto es en la fibrosis hepática, la cual consiste en la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular como resultado de diversos tipos de daño al hígado. Ante una lesión hepatocelular, los hepatocitos y otras células del hígado liberan diversos mensajeros pro-inflamatorios y DAMPs, provocando un estado de inflamación crónica y como consecuencia una cicatrización aberrante que conduce al estado fibrótico (Arthur, 2000).

La información disponible sobre el papel de la comunicación purinérgica en los procesos de fibrosis no es clara, pues se han descrito efectos antifibrogénicos y profibrogénicos. Además, aún no se cuenta con la información completa de la presencia y papel de los diferentes tipos de receptores purinérgicos en los distintos tipos celulares hepáticos en un estado fibrótico. Por lo tanto, es importante identificar la presencia de estos receptores en un modelo de fibrosis hepática para entender su papel en este proceso, observando si los subtipos de receptores presentan o no efectos diferenciales.

ANTECEDENTES

1. Sistema purinérgico

El ATP fue descubierto hace 80 años de forma simultánea en Heidelberg y Boston. Poco tiempo después, se describió el papel central del ATP en los procesos energéticos celulares (Burnstock & Verkhatsky, 2010). Drury y Szent-Györgyi (1929) describieron por primera vez las acciones extracelulares de los nucleótidos y los nucleósidos purinérgicos en el sistema cardiovascular; en su trabajo, reportaron que las purinas extracelulares eran responsables de

dilatación de vasos coronarios y la inhibición de la actividad espontánea del músculo liso del intestino.

La primera evidencia de que el ATP podría ser un transmisor en el sistema nervioso autónomo surgió cuando se observó que el ATP liberado de los nervios sensoriales durante una estimulación nerviosa antidrómica provocaba vasodilatación en la arteria del oído del conejo (Holton & Holton, 1954). En 1972, Burnstock propuso la hipótesis del nervio purinérgico, con el ATP como la molécula responsable de la transmisión no-adrenérgica no-colinérgica en el músculo liso de las vísceras y la vejiga (Burnstock, 1972). Actualmente, se ha identificado que el ATP actúa tanto como neurotransmisor como un co-transmisor en la mayoría de los nervios tanto del sistema nervioso periférico como del central (Burnstock, 2007).

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

Actualmente se sabe que el ATP se libera al espacio extracelular a través de varios mecanismos que pueden tanto sistémicos con locales y que incluyen la exocitosis, a través de hemicanales formados por conexinas o panexinas y a través de la activación de receptores P2X₇ (Pankratov et al., 2007), en respuesta a diferentes estímulos ya sea mecánicos, cambios en el pH o estrés hipotónico, por ejemplo (Bodin & Burnstock, 2001). Además, diferentes tipos de estrés celular provocan la exocitosis de vesículas que contienen ATP (Feranchak et al., 2010) y también puede ser liberado por células no nerviosas y actuar como mensajero intracelular autocrino-paracrino (Burnstock & Verkhratsky, 2010).

Después de su liberación, el ATP y otros nucleótidos sufren una degradación enzimática por acción de las ectonucleotidasas, lo que es funcionalmente importante ya que los metabolitos del ATP funcionan como ligandos fisiológicos para varios receptores purinérgicos. Las ectonucleotidasas incluyen las E-NTPasas (ectonucleósidos trifosfato difosfohidrolasas), E-NPPs (ectonucleótido pirofosfatasa y/o fosfodiesterasas), las fosfatasas alcalinas y la ecto-5'-nucleotidasa (Zimmermann, 2006).

Se han identificado receptores para adenosina denominados receptores P1 y para los nucleótidos de adenina (ATP, ADP) y pirimidina (UTP, UDP), denominados receptores P2

(Cieslak et al, 2015). Los receptores P2 han sido divididos con base en su mecanismo de acción, farmacología e identidad de secuencia en: P2X que son canales catiónicos activados por ligando y P2Y, que son receptores acoplados a proteínas G (Abbracchio et al, 2008; Cieslak et al, 2015; Ralevic & Burnstock, 1998).

Los receptores P2X son canales catiónicos dependientes de ligando permeables a Na⁺, K⁺ y Ca²⁺. Son canales tríméricos formados de subunidades individuales codificadas por siete genes diferentes (designados P2X1 al 7, de acuerdo al orden histórico de su clonación) (Roberts et al., 2006).

Por otro lado, los receptores P2Y son GPCRs de 308 a 377 aminoácidos con una masa molecular de 41 a 53 kDa y a la fecha se han clonado 8 subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁₋₁₄ (von Kügelgen & Harden, 2011).

1.1 Receptores P2Y

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) pueden ser activados por un repertorio estructuralmente diverso de ligandos y sus señales se transducen a través de la interacción con las proteínas G, proteínas ubicuas denominadas así por su habilidad para unir nucleótidos de guanina e hidrolizar GTP a GDP. Estas proteínas G están compuestas por las subunidades α (la cual posee la actividad GTPasa) y el dímero β/γ , por lo que se denominan proteínas G heterotriméricas (Syrovatkina et al., 2016).

Las proteínas G pueden ser identificadas por sus subunidades $G\alpha$. Con base en la secuencia y en similitudes funcionales, las proteínas $G\alpha$ están agrupadas en 4 familias: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$. Existe una gran cantidad de datos que han establecido los efectores de la señalización para las proteínas G. Tanto la familia $G\alpha_s$ como $G\alpha_i$ regulan la actividad de la adenilato ciclasa, $G\alpha_s$ estimula que la adenilato ciclasa convierta ATP en AMP cíclico (AMPc) y $G\alpha_i$ puede inhibir ciertos isotipos de las adenilato ciclasas, llevando a la reducción de los niveles de AMPc (Wettschureck & Offermanns, 2005).

La familia $G\alpha_q$ activa las isoformas β de la fosfolipasa C (β 1-4); esta enzima actúa sobre el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato localizado en la membrana plasmática, generando inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ activa a sus receptores específicos localizados en la membrana del retículo endoplásmico liberando Ca²⁺ y el DAG activa a la proteína cinasa C

(Syrovatkina et al., 2016), una cinasa de serina-treonina con múltiples blancos celulares (Rui et al., 2017). Por su parte, las subunidades β y γ de las proteínas G heterotriméricas están fuertemente asociadas y pueden ser tratadas como una unidad funcional (Syrovatkina et al., 2016) y ejercen importantes acciones celulares. Por ejemplo, se ha mostrado que los receptores P2Y₂ tienen una dinámica de Ca²⁺ intracelular diferente de otros receptores acoplados a la misma subunidad G α_q (M₃) por acción del complejo $\beta\gamma$, el cual regula la permeabilidad del Ca²⁺ en la membrana plasmática después de ser estimulado por UTP (Hu et al., 2010).

Los GPCRs poseen siete dominios transmembranales (TM1 al TM7) conectados por tres asas intracelulares y tres extracelulares que están alternadas (Syrovatkina et al., 2016) y funcionalmente existen en un equilibrio dinámico entre estados monoméricos y diméricos/oligoméricos (González-Maeso, 2011). Una vez unido el agonista, los GPCRs llevan a cabo una serie de complejas reacciones para modular la transducción de señales (Tulapurkar et al., 2006). La modulación de la señalización de los GPCRs en presencia continua de agonista es a través de tres procesos: desensibilización, internalización y regulación a la baja (Luttrell & Lefkowitz, 2002). Estos procesos son iniciados a través de la fosforilación del receptor por cinasas activadas por segundos mensajeros o por cinasas de los GPCRs (GRKs) (Kohout & Lefkowitz, 2003).

Después de la unión del agonista con el GPCR y su consecuente fosforilación, proteínas adaptadoras denominadas arrestinas forman un complejo para la desensibilización e internalización del GPCR, los desacopla de las proteínas G heterotriméricas y los marca para su endocitosis. Se conoce que los receptores P2Y interactúan diferencialmente tanto a la β -arrestina-1 como a la β -arrestina-2 (Hoffmann et al., 2008). Una estimulación prolongada o repetitiva de las células puede resultar en una reducción en el número de receptores en la membrana plasmática por internalización del receptor. En ciertas circunstancias, los receptores secuestrados son reciclados y relocalizados a la membrana plasmática o degradados por lisosomas, siendo lo último el escenario más probable después de una exposición prolongada al agonista (Tulapurkar et al., 2006).

No obstante, está bien establecido que los complejos formados con las arrestinas son elementos importantes de señalización, que regulan la activación de diversas cinasas como Src, ERK y JNK (Hoffman et al., 2008). Se ha reportado la internalización inducida por agonista para algunos P2Y (Tulapurkar et al., 2006), así como su endocitosis dependiente de clatrina y el citoesqueleto de actina (Tulapurkar et al., 2005). Además, se ha mostrado que la fosforilación

del carboxilo terminal del receptor P2Y₂ regula la desensibilización inducida por el agonista (Flores et al., 2005).

La activación de la familia de los receptores P2Y depende de algunos residuos cargados positivamente en los TM3, 6 y 7. Estos residuos interactúan con las cargas negativas de los grupos fosfato de los nucleótidos (Abbracchio, 2006).

Los receptores P2Y se pueden clasificar en dos subgrupos, de acuerdo con la subunidad G α a la que están acoplados. Los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁ activan G α_q y por lo tanto promueven respuestas robustas de la señalización de IP₃ y DAG. Mientras que los receptores P2Y₁₂₋₁₄ activan G α_i llevando a la disminución de la concentración citoplasmática de AMPc y otras cascadas de señalización llevadas a cabo por las subunidades $\beta\gamma$ (von Kügelgen & Harden, 2011) (Figura 1).

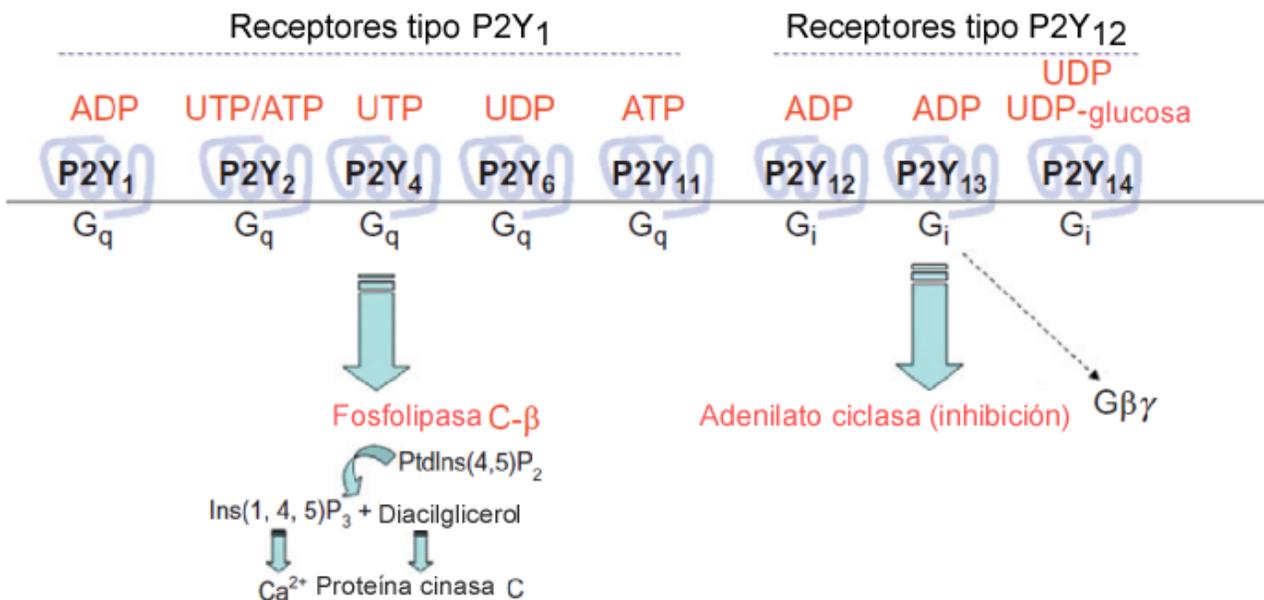


Figura 1. Principales vías de señalización de los receptores P2Y. (Modificado de von Kügelgen et al., 2010).

La activación de varios de los receptores P2Y está comúnmente asociada con la estimulación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), en particular la proteína cinasa regulada extracelularmente (ERK) 1/2, que puede ser activada por la proteína cinasa C (PKC); la PI3-K también se ha encontrado que está involucrada en la señalización activada por receptores P2Y (Abbracchio, 2006).

Algunas características de los receptores P2Y se resumen a continuación:

Tabla 1. Receptores P2Y que han sido clonados y la potencia de sus principales agonistas, así como su mecanismo de transducción (Modificado de Burnstock, 2007).

Receptor	Principal distribución	Potencia de agonistas	Mecanismos de transducción
P2Y ₁	Células epiteliales y endoteliales, plaquetas, células inmunes, osteoclastos	2MeSADP>ADP*>ATP γS>2MeSATP>ADPβS >ATP*	Gq/G ₁₁ ; activación de PLC-β
P2Y ₂	Células inmunes, células epiteliales y endoteliales, túbulos del riñón, osteoblastos	UTP*>ATP*>5BrUTP> Up4U	Gq/G ₁₁ y posiblemente Gi/Go; activación de PLC-β
P2Y ₄	Células endoteliales, intestino, glándula pituitaria y cerebro	UTP*>ITP>ATP*	Gq/G ₁₁ y posiblemente Gi; activación de PLC-β
P2Y ₆	Algunas células epiteliales, placenta, células T, timo, bazo	UDP*>5BrUTP>UTP*> ADP*>2-MeSATP	Gq/G ₁₁ ; activación de PLC-β
P2Y ₁₁	Bazo, intestino, granulocitos, cerebro	ATPγS> BzATP>dATP>ATP*>A DPβS>2-MeSATP	Gq/G ₁₁ y Gs; activación de PLC-β
P2Y ₁₂	Plaquetas, células gliales	2-MeSATP=2- MeSADP>ADP*>ATPγ S>ADPβS>2CIATP	Gα _i ; inhibición de adenilato ciclasa
P2Y ₁₃	Bazo, cerebro, nodos linfáticos, médula espinal, hígado, corazón	ADPβS=2-MeSADP=2- MeSATP>ADP*>Ap ₃ A> ATP*>IDP	Gi/Go
P2Y ₁₄	Placenta, tejido adiposo, estómago, intestino, regiones discretas del cerebro, bazo, pulmón	UTP glucosa*>UDP- galactosa*>UDP-ácido glucurónico*>UDP- <i>N</i> - acetilglucosamina*	Gi/Go

*ligandos endógenos

Probablemente por su origen antiguo dentro de los receptores purinérgicos, la extensa gama de los P2Y está ampliamente distribuida a través de las células y tejidos (Tabla 1). Sus acciones fisiológicas son igual de diversas, por ejemplo, la regulación de la vasodilatación o la contracción de diferentes tejidos (Picher & Boucher, 2003; Hourani et al., 1991) y en el hígado la estimulación de la glucogenólisis (Buxton et al., 1986).

2. ATP como patrón molecular asociado al daño (DAMP).

Durante un proceso de daño tisular, las primeras manifestaciones de estrés celular dan como resultado la liberación de diferentes moléculas denominadas *patrones moleculares asociados al daño* (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Burnstock et al., 2014; Ayata et al., 2012). Una vez que estas señales se difunden alrededor del tejido involucrado, se inician eventos celulares inmediatos incluyendo cambios en la forma celular, formación de actomiosina y reclutamiento de células inmunes (Cordeiro & Jacinto, 2013).

Los DAMPs pueden activar complejos multi-proteicos intracelulares que censan la presencia de patógenos y células dañadas, llamados inflamomas. Estos complejos inducen la activación de la caspasa-1, lo que resulta en la escisión, y por ende la activación, de las citocinas pro-inflamatorias interleucina (IL)-1 β y 18 (Strowig et al., 2012). Estas citocinas estimulan la fiebre, la vasodilatación y el reclutamiento de células inmunes innatas hacia el sitio de la infección, llevando a la resolución de la infección y la reparación del tejido (Santana et al., 2016).

La secreción de estas citocinas requiere de la activación de dos señales. La primera consiste en los *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMPs) que son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (por ejemplo, los receptores llamados Toll-like o TLRs), cuya activación lleva a que el factor de transcripción NF- κ B se trasloque al núcleo y promueva la transcripción de las citocinas inmaduras (pro-IL-1 β y pro-IL-18) (Latz et al., 2013).

La segunda señal consiste en los DAMPs liberados de células dañadas y son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones, entre éstos los receptores purinérgicos como el P2X₇, lo que lleva a la formación del complejo del inflamoma y la activación de caspasa-1 que permite la secreción de las citocinas maduras (Saïd-Sadier & Ojcius, 2012). Uno de estos DAMPs es el ATP que, después de un daño celular, es liberado de

las células (Tanaka et al, 2014) (Figura 2). El papel del ATP como señalizador de daño está evolutivamente conservado en varios sistemas de defensa biológica (Burnstock & Verkhratsky, 2010).

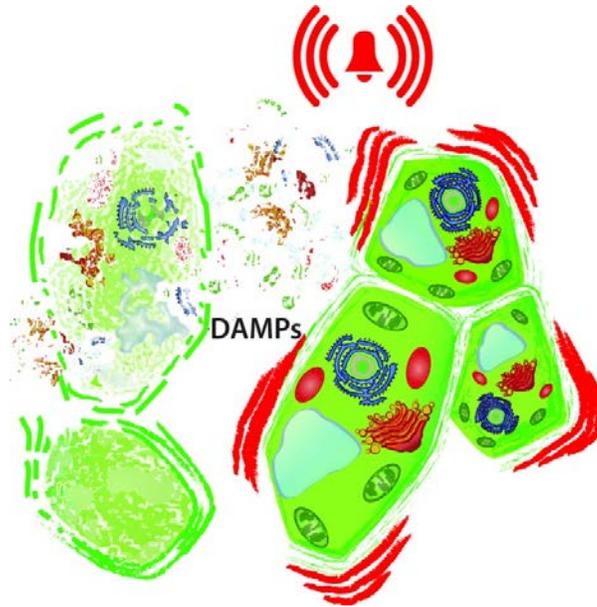


Figura 2. Representación del reconocimiento de patrones moleculares asociados al daño. La desintegración de las células libera moléculas intracelulares al espacio extracelular y expone macromoléculas a enzimas hidrolíticas. Estas nuevas y deslocalizadas moléculas pueden servir como DAMPs que preparan a la célula vecina intacta para el reconocimiento de patógenos y reparación del daño (Heil & Land, 2014).

La señalización purinérgica está íntimamente involucrada en la activación de la respuesta inmune periférica, siendo no sólo un estimulador sino un regulador preciso de la diferenciación y función de las células inmunocompetentes (Trautmann, 2009), así como una guía para la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y mastocitos (Di Virgilio et al., 2009). El ATP y sus análogos están directamente implicados en la remodelación tisular en respuesta a un daño, también tienen un papel esencial en la regulación de la reparación subsecuente y la regeneración (Burnstock & Verkhratsky, 2010).

Las concentraciones extracelulares de ATP son muy bajas en condiciones fisiológicas (en el rango nanomolar) ya que están altamente reguladas por la desfosforilación del ATP en sus diversos metabolitos (la Sala et al., 2003). Sin embargo, las concentraciones extracelulares del nucleótido pueden aumentar notablemente en condiciones de estrés celular como

inflamación, infección, hipoxia o trauma, debido a la liberación activa o pasiva por diferentes tipos celulares (Junger, 2011).

Uno de los sistemas donde el ATP podría estar teniendo funciones de DAMP es el hígado durante un proceso de fibrosis hepática. En el hígado, el inflammasoma puede ser activado directamente a través de diversos tipos celulares hepáticos, e indirectamente a través de muerte celular y un aumento en la exposición a los PAMPs (Wree & Marra, 2016).

3. Fibrosis hepática

El hígado normal contiene un componente epitelial (hepatocitos), un recubrimiento endotelial (que en el hígado está caracterizado por ser fenestrado o poroso), macrófagos residentes (células de Kupffer) y células mesenquimales perivasculares llamadas células estelares hepáticas (HSCs, por sus siglas en inglés) (Arthur, 2000).

El hígado está estructurado en lóbulos hepáticos y cada lóbulo consiste en una vena central y 6 tríadas portales que la rodean. Las llamadas tríadas portales están conformadas por los ductos biliares, una arteria hepática y una vena portal. Sangre mezclada de la arteria hepática y de la vena portal fluyen rodeando a los hepatocitos a través de los sinusoides, cubiertos por células endoteliales fenestradas, hasta la vena central. La bilis producida por los hepatocitos es recolectada en el canalículo biliar y fluye hacia el ducto biliar. El canal de Hering es la unión entre la placa hepática y los ductos biliares (Duncan et al., 2009) (Figura 3).

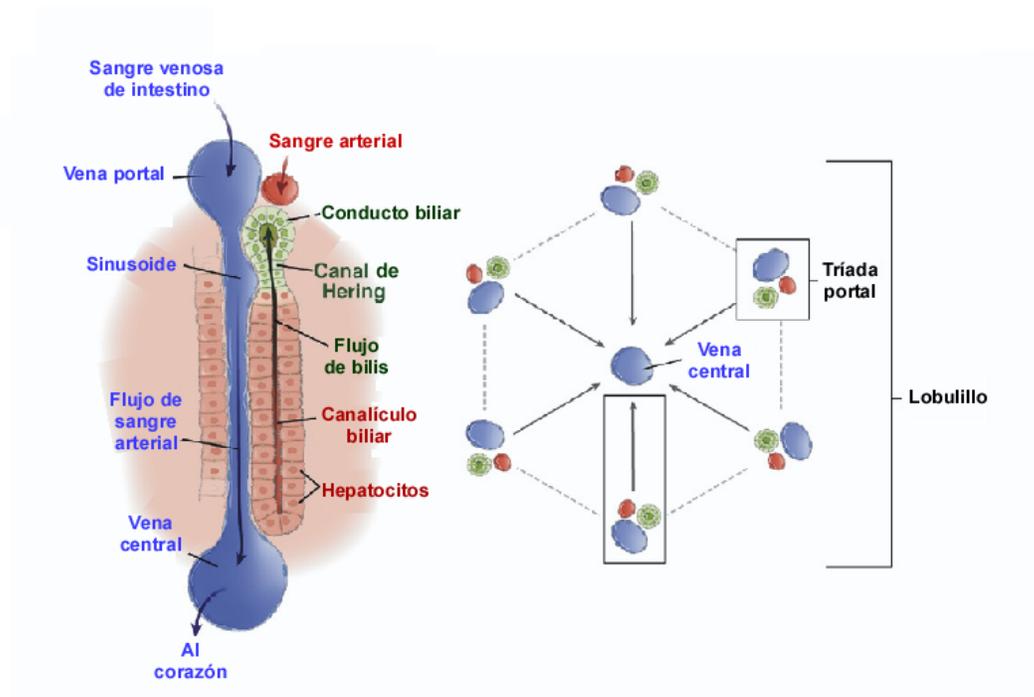


Figura 3. Representación esquemática de la estructura de los lóbulos hepáticos. (Modificado de Duncan et al., 2009).

El espacio de Disse sub-endotelial separa al epitelio del endotelio de tipo sinusoidal. Este espacio contiene una membrana basal compuesta de colágena no-formadora de fibrilla que incluye al tipo IV, VI y XIV. Esta matriz extracelular (ME) sub-endotelial basal es crucial para mantener las funciones diferenciales de las células residentes del hígado (Friedman, 2008).

La fibrosis del hígado por daño hepatocelular es una respuesta compleja, comprende diversos tipos celulares y mediadores, y lleva a la deposición de una cantidad excesiva de proteínas de la matriz en el espacio extracelular. Cuando este proceso se combina con una regeneración y reparación inadecuada o ineficiente (Arthur, 2000), así como infecciones, drogas, desórdenes metabólicos o ataques inmunes (Friedman, 2008) puede resultar en la Enfermedad Crónica del Hígado. Hay dos tipos generales de enfermedades crónicas del hígado, hepatocelular (daño a los hepatocitos, como hepatitis crónica viral y esteatohepatitis no-alcohólica) y coleostásica (obstrucción al flujo biliar, como cirrosis biliar primaria) (Bataller & Brenner, 2005). Modelos experimentales de fibrosis hepática en roedores han sido desarrollados para estudiar estos dos tipos de enfermedades crónicas del hígado: la administración repetida de tetracloruro de carbono (CCl_4) produce daño hepatocelular y la ligación del conducto biliar induce daño colestásico (Forbes & Parola, 2011).

Dentro de un cuadro fibrótico, hay un desbalance entre la síntesis y la degradación de ME, que junto con la necrosis hepatocelular llevan a la formación de conjuntos fibróticos (Ramadori & Saile, 2004). Además, la ME endógena sufre cambios: su abundancia aumenta de tres a cinco veces y pasa ser de baja densidad a ser de tipo intersticial, también llamada colágena fibrilar, la cual es rica en colágena tipo I, fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronato y proteoglicanos (Albanis & Friedman, 2001; Bataller & Brenner, 2005).

En el espacio extracelular, la degradación de la matriz ocurre normal y predominantemente como consecuencia de la acción de una familia de enzimas llamadas metaloproteasas de la matriz (MMPs, por sus siglas en inglés). Éstas son secretadas de las células hacia el espacio extracelular como pro-enzimas que son entonces activadas por un número de mecanismos específicos de escisión usualmente asociados a la superficie de la célula. Las enzimas activas son, a su vez, inhibidas por una familia de inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP-1 a -4). A través de estos mecanismos la degradación de la ME está altamente regulada; sin embargo, durante un cuadro fibrótico la ME depositada es parcialmente resistente a la actividad de las MMPs; además, aumenta la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 (Arthur, 2000) (Figura 4).

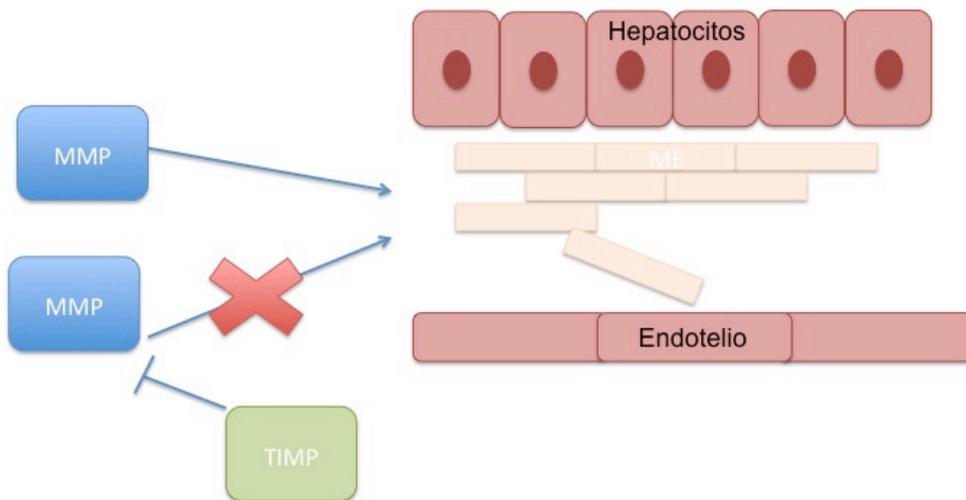


Figura 4. Representación de la actividad biológica de las MMPs. El rompimiento de la matriz extracelular está a cargo de las MMPs que son a su vez reguladas por los TIMPs, en este caso en el contexto hepático. Durante el establecimiento de la fibrosis, aumenta la cantidad de TIMPs lo que previene el rompimiento y por ende la acumulación de matriz extracelular (MMP, metaloproteasas de matriz; TIMP, inhibidores tisulares de metaloproteasas; ME, matriz extracelular).

La distribución de este material fibroso depende del origen del daño hepático. En la hepatitis viral crónica y los trastornos colestáticos crónicos el tejido fibrótico se localiza inicialmente alrededor de los tractos portales, mientras que en la enfermedad hepática inducida por alcohol se localiza en las áreas pericentrales y perisinusoidales (Bataller & Brenner, 2005).

Se ha demostrado que los macrófagos residentes juegan un papel en la iniciación de las respuestas inflamatorias durante un daño, mientras que los macrófagos infiltrantes derivados de monocitos llevan a una inflamación crónica del hígado y a la fibrogénesis (Tacke & Zimmerman, 2014).

Durante un proceso de inflamación, la cantidad de macrófagos hepáticos se expande y éstos secretan rápidamente citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas, como la IL-1 β y el factor de necrosis tumoral (TNF), resultando tanto en una activación parácrina de vías de señalización de hepatocitos, como en el reclutamiento de células del sistema inmunológico adicionales que amplificarán el daño hepático (Luedde & Schwabe, 2011), liberando factores pro-fibróticos, como TGF- β , que resultan en la activación de HSCs (Bansal et al., 2015).

Las HSC quiescentes están localizadas en el espacio de Disse y almacenan retinoides en vesículas lipídicas; también expresan marcadores gliales como la proteína ácido gliofibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés) (Bataller & Brenner, 2005). Existe evidencia que les atribuye un papel relevante en la inducción y el mantenimiento de la fibrosis, al sufrir una transdiferenciación a miofibroblastos, proceso conocido como activación (Li & Friedman, 1999). Como consecuencia de esta transdiferenciación, las HSCs promueven el aumento de la secreción de colágena, fibronectina y otras proteínas estructurales (Dranoff et al., 2007). Una vez activadas, son las principales células que producen colágena en el hígado afectado (Bataller & Brenner, 2005).

Además de las HSCs, los miofibroblastos portales y las células de origen de médula ósea también exhiben potencial fibrogénico (Ramadori & Saile, 2004) y pueden llegar a ser la principal fuente de miofibroblastos productores de colágena dependiendo del tipo de daño. Las HSCs quiescentes se activan principalmente en un cuadro hepatocelular, mientras que los miofibroblastos portales son los principales productores de colágena en un daño de tipo coleostático (Iwaisako et al., 2014).

3.1 Sistema purinérgico en la fibrosis hepática

Actualmente se comienza a reconocer al ATP extracelular como un factor que tiene influencia sobre múltiples funciones hepáticas de forma autócrina y parácrina (Woo et al., 2010). Se ha reportado la expresión de diferentes subtipos de receptores purinérgicos en hepatocitos humanos y de rata, cuya activación ha sido asociada a diferentes funciones celulares como la regulación del metabolismo y la proliferación (Vaughn et al., 2012), así como la regulación de la secreción de bilis (Burnstock, 2014).

Se ha demostrado que los hepatocitos, las células de Kupffer, las HSCs y las células vasculares endoteliales expresan receptores purinérgicos funcionales (Burnstock, 2014; Takemura et al., 1994). Además, se ha propuesto que la expresión de receptores P2Y tiene un papel en la activación de HSCs, pues las HSCs quiescentes de rata expresan los receptores P2Y₂ y P2Y₄, mientras que una vez activadas expresan al receptor P2Y₆; y se ha relacionado la actividad del receptor con la regulación positiva de la transcripción del gen que codifica para pro-colágena-1 (Dranoff et al., 2004).

La señalización purinérgica contribuye a modular las respuestas inmunes y de inflamación de forma que el daño al huésped sea eliminado de manera eficiente causando el mínimo daño a los tejidos sanos (Di Virgilio et al., 2009; Burnstock & Verkhratsky, 2010; Bours et al., 2006). Durante la inflamación que ocurre en la fibrosis hay una regulación a la alta de los receptores purinérgicos P2X, en particular del receptor P2X₇, el cual tiene un papel central en inflamación (Burnstock, 2016). El ATP liberado de las células dañadas aumenta la respuesta inflamatoria a través de la liberación de IL-1 β y TNF- α (Tschopp & Schroder, 2010), así como la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) a través del receptor P2X₇ (Fiebich et al., 2014).

El receptor P2X₇, al activarse, forma un largo poro de conductancia en la membrana celular, facilitando el flujo iónico y la activación subsecuente del inflammasoma (Burnstock, 2016). A través de este poro permite la liberación de las citocinas pro-inflamatorias, además de exosomas y microvesículas relevantes para la inflamación (Idzko et al., 2014). Otros receptores purinérgicos han sido asociados a acciones inflamatorias, por ejemplo el receptor P2Y₆ regula la inflamación vascular y los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ modulan la activación de las plaquetas (Burnstock, 2016). También el receptor P2Y₂ ha sido reconocido como un receptor con función de quimiotaxis para la atracción de neutrófilos durante la inflamación (Ayata et al., 2012).

Por otra parte, se ha mostrado que la adenosina, actuando a través de receptores A_{2B} , puede tener un papel en la inducción de la fibrosis promoviendo un aumento en la expresión de colágeno I en HSCs humanas (Zhong et al., 2007). Sin embargo, de manera sistémica se ha demostrado que la adenosina puede revertir la fibrosis hepática inducida por CCl_4 (Hernández-Muñoz et al., 2001).

3.1.1. El receptor purinérgico $P2Y_2$ en el hígado

Existen un buen número de evidencias que sugieren que el receptor $P2Y_2$ es la isoforma más abundante de los $P2Y$ encontrada en los hepatocitos y que su activación fisiológica favorece la sobrevivencia celular (Ayata et al., 2012) y se le ha atribuido un papel importante en la regulación de actividades fisiológicas del hígado como la secreción de la bilis, la comunicación del conducto biliar con los hepatocitos (Dranoff et al., 2001) y se sabe que contribuye a la regulación del metabolismo de glucosa (Burnstock et al., 2014).

Muchos efectos del ATP extracelular en el hígado son regulados por la activación del receptor $P2Y_2$, que estimula la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares y el flujo de Ca^{2+} a través de los canales en la membrana plasmática (Dolovcak et al., 2010; Schöfl et al., 1999). Se ha encontrado evidencia de la presencia del receptor $P2Y_2$ en diferentes tipos celulares hepáticos como hepatocitos, colangiocitos, células endoteliales, células de músculo liso vascular, HSCs, fibroblastos portales, células de Kupffer, linfocitos asociados al hígado y neutrófilos (Beldi et al., 2008a). Particularmente se ha reportado que en células de hepatocarcinoma (HCC) de humano existe un aumento en la expresión del receptor $P2Y_2$ comparado con hepatocitos de humanos sanos y que este receptor promueve la proliferación y migración celular (Xie et al., 2014). Asimismo, en otras líneas celulares de HCC el receptor $P2Y_2$ promueve proliferación y sobrevivencia ante un reto de hipoxia (Tak et al., 2016; Carini et al., 2006).

Se ha reportado también que el receptor $P2Y_2$ contribuye en la modulación de la velocidad de la migración de los neutrófilos en respuesta a señales quimio-atrayentes liberadas por patógenos y tejidos dañados (Corriden & Insel, 2012). Por otro lado, ante un reto de hepatectomía parcial, se observó que hay un incremento de ATP extracelular y que el receptor $P2Y_2$ induce la proliferación de hepatocitos (Graubardt et al., 2013), activando la vía de ERK 1/2 después de 5 minutos (Tackett et al., 2014). Asimismo, después de una hepatectomía parcial, el

receptor P2Y₂ también participa en la regulación de respuestas de crecimiento vascular, induciendo la fosforilación rápida en residuos de tirosina del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2 (VEGFR2) (Seye et al., 2004), para lo cual es importante la degradación del ATP/UTP en sus metabolitos, a través de la acción de ectonucleotidasas que evitan la desensibilización del receptor P2Y₂ modulando la disponibilidad del ligando (Beldi et al., 2008b).

En el contexto del daño hepático, al receptor P2Y₂ se le ha atribuido un papel importante en algunos modelos, como daño agudo inducido por endotoxinas en ratones (Burnstock et al., 2014). De la misma forma, la inducción de la expresión de este receptor también se ha observado en modelos animales de hepatitis aguda y daño hepático por acetaminofén, en donde la expresión del receptor es necesaria para la infiltración de neutrófilos en el hígado y daño hepático subsecuente (Ayata et al., 2012). También se ha observado que activa la vía de otras cinasas parte de la familia de las MAPK, las cinasas JNK, que también han sido relacionadas con procesos de proliferación celular en otros modelos (Wang et al., 2014, Thevananther et al., 2004).

Ya que la evidencia acerca de la presencia y el papel de los receptores P2Y durante un cuadro fibrótico es mínima y algunas veces poco concluyente, es claro que la información hasta ahora no es suficiente para explicar estos procesos por lo que es necesario el uso de otros modelos de fibrosis hepática para aportar evidencias sobre este tema.

JUSTIFICACIÓN

La liberación de ATP endógeno hacia el compartimiento extracelular y la subsecuente activación de los receptores purinérgicos es cada vez más reconocida como una de las principales vías de señalización involucradas en la regulación de respuestas ante un daño. La modulación de la respuesta de estos receptores en un contexto patológico puede brindar una herramienta terapéutica que coadyuve en el tratamiento de padecimientos como la Enfermedad Crónica Hepática, la cual comienza su desarrollo con el establecimiento de fibrosis hepática, condición que recibió poca atención por muchos años, a pesar de que casi toda la morbilidad de las enfermedades del hígado puede ser vinculada a la cicatrización progresiva.

La comunicación mediada por nucleótidos participa en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular en muchos tejidos, y estas funciones junto con la regulación de la respuesta al daño pueden ser las vías por las que participa en los procesos de la fibrosis hepática, por lo que los receptores involucrados en mediar estas respuestas podrían funcionar como blancos terapéuticos en esta patología.

HIPÓTESIS

Existe una expresión diferencial de los receptores P2Y en el hepatocito, durante la fibrosis hepatocelular y la señalización mediada por estos receptores incide en el proceso fibrótico.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el papel de los receptores P2Y en el hepatocito durante la fibrosis hepática, tras determinar su expresión diferencial y funcionalidad durante un cuadro fibrótico.

Objetivos específicos

1. Estandarizar un protocolo de inducción de fibrosis hepatocelular con CCl₄.
2. Analizar el nivel de expresión de los transcritos de los receptores P2Y en homogenados de hígados de animales fibróticos y controles.

3. En cultivo primario de hepatocitos, analizar la integridad funcional de los receptores purinérgicos evaluado la fosforilación de p42/p44 ERK como respuesta inducida por un estímulo con agonistas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

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

Materiales

Los compuestos ATP, UTP y UDP fueron obtenidos de Sigma-Aldrich; los anticuerpos anti MAPK-ERK fueron de Cell signalling technology (phospho-ERK #4370, y ERK total #4695), el anticuerpo anti P2Y₂ fue de Alomone (#APR-010), la transcriptasa reversa, la *Taq* polimerasa, los oligonucleótidos sintéticos y otros reactivos de biología molecular fueron de Invitrogen, el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), el suero fetal bovino (SFB), la L-glutamina y el antibiótico fueron de Life Technologies.

Aislamiento y cultivo de hepatocitos

La purificación de hepatocitos de hígado de ratón utilizada en este trabajo está basada en un protocolo previamente establecido para la extracción y el aislamiento de HSCs (Mederacke et al., 2015), con algunas modificaciones. El protocolo se divide en dos etapas principales secuenciales: 1) Perfusión del hígado *in situ* con colagenasa a través de la vena porta hepática, lo que permite que la solución salga a través de la vena cava y 2) Separación basada en

gradiente de densidad de los hepatocitos de otras poblaciones hepáticas; el principio que subyace es que el parénquima hepático puede ser separado fácilmente de otras células basado en su peso considerablemente mayor con respecto a otros tipos celulares en el hígado (Mederacke et al., 2015).

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

Posteriormente se perfundieron 50 ml de una solución de colagenasa (1 mg/ml) (# 4189, Worthington) disuelta en *solución de enzima* (NaCl 137 mM, KCl 5 mM, NaH₂PO₄-H₂O 500 μM, Na₂HPO₄ 800 μM, HEPES 9.9 mM, NaHCO₃ 4.1 mM, CaCl₂ 3.8 mM pH 7.4).

El hígado fue disecado y dispersado en medio de Williams E, la suspensión celular obtenida fue fraccionada en un gradiente de Percoll al 10% en solución de Hanks pH 7.4. Los hepatocitos vivos, acumulados en el botón celular fueron separados utilizando una pipeta serológica para ser cultivados.

Una vez aislados, se cuantificó el número de células viables por exclusión de azul de tripano. Los hepatocitos se colocaron en cajas de 12 pozos y en cada uno se colocaron 5x10⁴ células en medio DMEM adicionado con SFB al 10% inactivado, una combinación del antibiótico estreptomicina y L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ por 24 horas antes de retarlos con el agonista purinérgico en las diferentes condiciones.

Western blot

El análisis de la fosforilación de ERK 1/2 se realizó por Western blot. Con este fin, los cultivos de hepatocitos fueron lisados en solución de Laemmli (TrisCl 125mM, SDS 350 mM, Glicerol 200 mM, β-mercaptoetanol 20 mM, azul de bromofenol 0.03mM, ddH₂O), las muestras hervidas por 5 min y centrifugadas a 5000 g por 5 min. Los extractos celulares fueron fraccionados en geles de poliacrilamida al 10% mediante electroforesis de acuerdo a protocolos ya publicados (Vázquez-Cuevas et al., 2010).

Brevemente, los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) aplicando 200 mA por 105 min en una cámara de transferencia húmeda (Biorad). Las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente en solución TBS-T (Tris 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.05%) con 5% de leche descremada y lavadas con TBS-T. Posteriormente fue incubada toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo específico (Cell Signaling Technology #4370 o #4695), en este caso para la proteína p42/p44 MAPK en su forma fosforilada (dilución 1:1000).

Posteriormente, las membranas se lavaron e incubaron por 2 horas, a temperatura ambiente, con anticuerpo secundario (cabra anti IgG de conejo) acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) en dilución 1:5000 y detectadas por quimioluminiscencia y autoradiografía.

Inducción de fibrosis hepática por la administración de CCl₄

Con el fin de estudiar los cambios en la expresión de los receptores P2Y en la fibrosis temprana, se utilizó un modelo de daño hepatotóxico bien caracterizado (Mortezae et al, 2015; Hernández-Muñoz et al., 2001). Se inyectaron intraperitonealmente ratones macho de la cepa C57BL/6 de 6 semanas de edad con CCl₄ (0.5 ml/kg) tres veces por semana, durante 4 semanas. Como vehículo se utilizó aceite de maíz, el cual es un agente emulsionante que permite la disolución del CCl₄ y no presenta toxicidad u otra actividad biológica o farmacológica con respecto al daño hepático. Este protocolo modela el curso natural de la Enfermedad Crónica Hepática; inicialmente se observa hepatitis crónica que conduce a fibrosis para posteriormente desarrollarse el proceso canceroso (Novo et al., 2015); sin embargo, para fines de este proyecto sólo se administra durante cuatro semanas para obtener muestras en etapa de fibrosis.

Para confirmar que el modelo de CCl₄ es capaz de inducir fibrosis hepática en los animales, se tomaron muestras de ambos grupos experimentales y se hicieron cortes del tejido para posteriormente ser teñidos mediante Hematoxilina y Eosina. Después, se llevó a cabo la técnica de *Tricómica de Masson*, la cual permite visualizar claramente las fibras de colágena tipo I. Brevemente, después de teñir con hematoxilina, se trata al tejido con la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico y azul de anilina, ya que estos ácidos proveen de medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, por lo que las fibras de colágena se teñirán de dicho color (Nayagam et al., 2013).

Se llevó a cabo también una RT-PCR de punto final para analizar la presencia de los indicadores de fibrosis como son los transcritos de COL-1 y α -actina de músculo liso (SMA), éste último como un indicador de HSCs activadas. Para este procedimiento se utilizó GAPDH como transcrito consuetivo.

Análisis de la diversidad de receptores purinérgicos expresados en un cuadro fibrótico por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Con el propósito de caracterizar la expresión de algunos receptores purinérgicos P2Y en el hígado de los ratones con fibrosis inducida por CCl₄ y comparadas con muestras control, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa. Con este fin ratones intactos, inyectados con aceite de maíz o CCl₄, fueron perfundidos a través de la vena porta hepática; una vez drenada la sangre, un trozo de 3 mm² fue disecado y colocado en solución *RNA later* (*Promega, Fitchburg, WI*) y posteriormente se obtuvo el RNA total de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todos los RNAs tuvieron un cociente de absorbancia 260/280 de 1.9 a 2.1; por cada individuo se utilizó 1 μ g de RNA para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa, para lo cual se utilizó el estuche comercial *Reverse Transcription System* (*Promega, Fitchburg, WI*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, el RNA total fue tratado con DNasa I de alta pureza, la cual fue inactivada por calentamiento a 65°C por 10 min, a continuación se agregó como cebador oligo dT, mezcla de hexanucleótidos al azar y la enzima reverso transcryptasa. La reacción fue incubada 1h a 42°C. El análisis de la abundancia relativa de cada transcrito se realizó utilizando como transcrito de referencia el de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) debido a que presenta una secuencia genética altamente conservada entre especies debido a que su expresión es necesaria para la supervivencia de las células (Zelko et al., 2002). Se utilizaron oligonucleótidos específicos y se amplificaron fragmentos de los receptores de interés utilizando como patrón los cDNAs sintetizados previamente (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de la secuencia de los cebadores utilizados en la RT-qPCR

Receptor	Acceso NCBI	Oligos	Base blanco	Longitud (pb)
P2Y1	NM_008772.5 NM_008772.5	Forward: TCCAAGAGTGAAGAAATGACTC Reverse: GCTTCTTCTTGACCTGTGTAT	1711-1731 1886-1846	175
P2Y2	NM_001302347.1 NM_001302347.1	Forward: ACCTGGAACCCTGGAATAG Reverse: AGGCGGCATAGGAAGATATAG	302-320 476-456	174
P2Y4	NM_020621.4 NM_020621.4	Forward: CCTGGACTGGACTAAGGAA Reverse: TCAGAGGCAACAGGATGA	268-286 406-389	138
P2Y6	NM_183168.2 NM_183168.2	Forward: TCTGGCACTTCTCCTAAA Reverse: CTTGAAATCCTCACGGTAGAC	323-341 475-455	152
P2Y12	NM_027571.3 NM_027571.3	Forward: CAGTCTGCAAGTTCCACTAAC Reverse: TGGGTGATCTTGTAGTCTCTG	286-306 448-428	162
P2Y13	NM_028808.3 NM_028808.3	Forward: GAGCTAGTAACTGCCACAAC Reverse: CAGGAAGACCACAGTATAGAGA	12-31 181-160	169
P2Y14	NM_001287124.1 NM_001287124.1	Forward: CGTGAAGGAGTTCATGTAAGG Reverse: TGGTTTGGAGGGTCTGT	186-206 328-312	142

Análisis de la expresión del receptor P2Y₂ por inmunofluorescencia

Se llevó a cabo una inmunofluorescencia para la detección de la expresión del receptor P2Y₂ en tejidos de animales inyectados con vehículo (aceite de maíz) o CCl₄. Brevemente, todos los animales fueron perfundidos con solución amortiguadora de fosfatos (PBS: NaCl 136 mM; KCl 2.7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) a través de la vena porta hepática. Se disecaron los hígados y se fijaron en solución de formalina al 10%. Después se embebieron en parafina y se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor en un microtomo (Leica). Estos cortes fueron montados en portaobjetos de vidrio gelatinizados. Posteriormente las muestras fueron desparafinizadas colocándolas en un horno a 60°C por 20 minutos.

A continuación los cortes fueron lavados y rehidratados pasándolos por un tren de xilol, alcohol y agua, tras lo cual fueron lavados con TBS-T (Tris 20 mM pH 7.4, Tween 20 0.05%) y hervidos en solución amortiguadora de citratos (Citrato de Na 0.3mM, Tween 20 0.1%, ddH₂O). Para realizar el marcaje, el tejido fue incubado a temperatura ambiente en una solución TBS-T con 5% de leche descremada por 1 hora con el fin de bloquear sitios de unión inespecífica. El tejido fue incubado con el anticuerpo primario (anti P2Y₂ 1:50, desarrollado en conejo, Alomone, Jerusalem) durante toda la noche a 4°C y luego con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo 1:300 acoplado a la molécula fluorescente Alexa fluor 488 (Life Technologies) por 2 horas a temperatura ambiente. El control negativo se realizó omitiendo el anticuerpo primario. Para capturar las imágenes se utilizó el software *Image-Pro Plus*; los tiempos de exposición se mantuvieron constantes para todas las condiciones.

Análisis estadístico

Todos los datos numéricos se expresaron como la media \pm el error estándar. Los datos fueron sometidos a pruebas de homogeneidad de varianzas y de normalidad para determinar si tenían una distribución normal. En los experimentos de Western Blot, se cuantificaron las bandas obtenidas por densitometría y se normalizó al valor del basal. Posteriormente, los valores se analizaron por una prueba de ANOVA de una vía. Se utilizó el programa *GraphPad Prism* para la realización de las pruebas estadísticas. Se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Inducción de fibrosis hepática por la administración de CCl₄.

En primer término establecimos un modelo *in vivo* de fibrosis hepática a través de la administración de CCl₄ durante 4 semanas. Para determinar el estado estructural del tejido se llevó a cabo una tinción con hematoxilina-eosina en rebanadas de hígado de ambos grupos experimentales (n=3). En estas tinciones se observó que el tejido hepático de los animales a los que se les administró el hepatotóxico presentó hepatocitos con forma irregular, núcleos picnóticos e infiltración de células inmunes alrededor tanto de las zonas portales como de las zonas centrales (Figura 5).

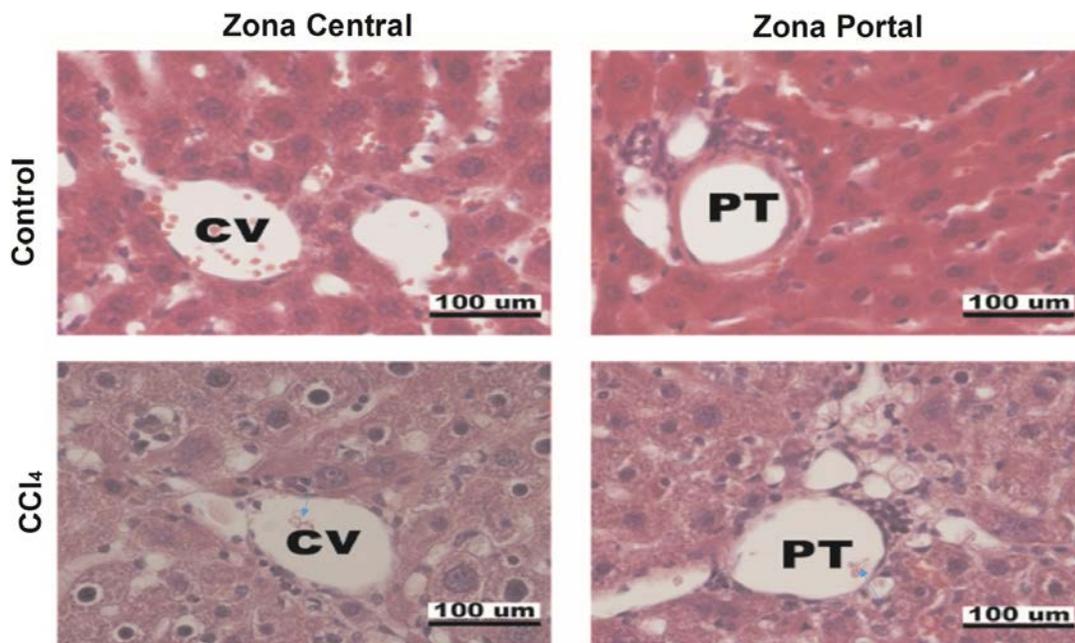


Figura 5. Tinción de hematoxilina-eosina de tejidos hepáticos de ambos grupos. Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina-eosina de tejidos del grupo Control (Control) y del grupo experimental que fue administrado con el hepatotóxico (CCl₄), tanto de una zona central como de una zona portal. Nótese la pérdida de estructura del parénquima hepático en el grupo tratado con CCl₄, así como los agregados de células del sistema inmune infiltrados (flechas) al lobulillo hepático en ambas zonas. (CV= vena central, PT= tracto portal).

En las preparaciones a las que se les realizó la tinción de *Tricrómica de Masson* (Figura 6A) se observaron abundantes fibras de colágena en las muestras del grupo tratado con CCl₄, teñidas de color azul alrededor de las venas portales y centrales en el tejido hepático (n=6). Para determinar el tipo de colágena teñida por la técnica anterior se llevó a cabo un análisis por RT-PCR semicuantitativo del transcrito de colágena-1, característico de un estado de fibrosis (Figura 6B y C).

Asimismo se analizó el transcrito de α -actina de músculo liso (α -SMA), éste último como marcador de HSCs activadas (Inoue et al., 2016), principal fuente de matriz extracelular en un estado fibrótico, ambos transcritos fueron regulados a la alta en los hígados de animales tratados (Figura 6B y C).

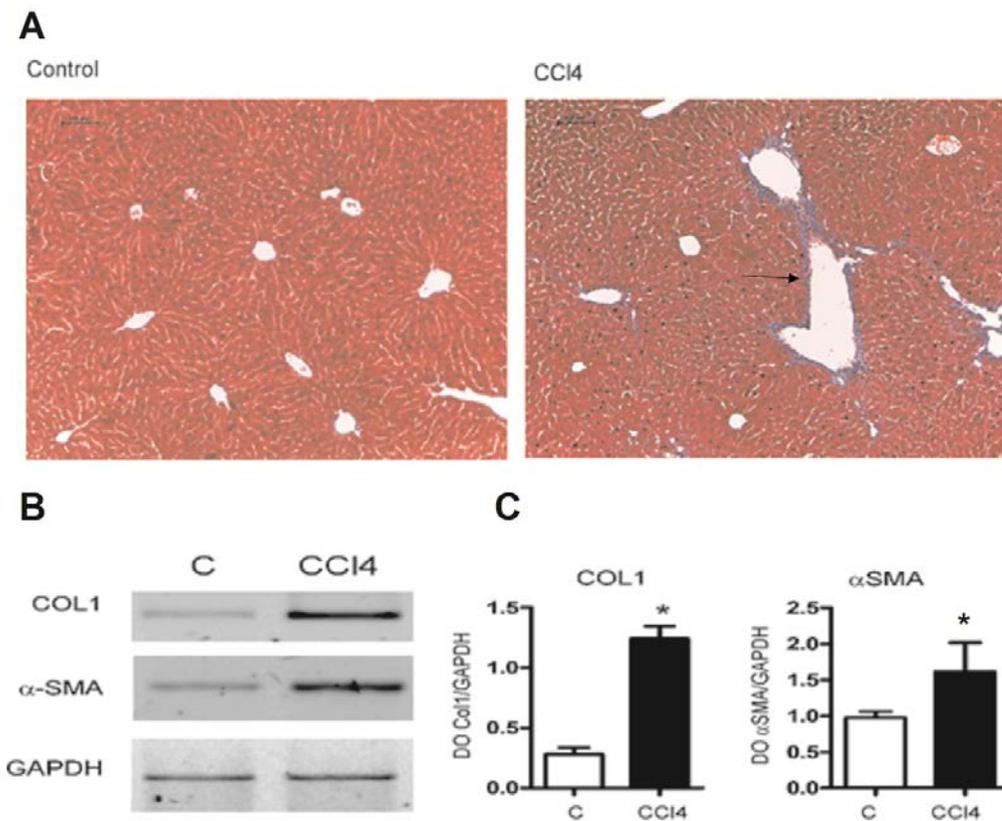


Figura 6. Establecimiento de fibrosis hepática. A. Se observa un corte de hígado representativo de un ratón control y uno al que se le administró CCl₄ durante cuatro semanas. Nótese las fibras de colágena (flechas) teñidas de azul entre el parénquima y alrededor de las venas centrales y portales. B. Imágenes representativas de un gel de agarosa y C. Análisis de RT-PCR de punto final de la expresión de los mRNAs de COL-1 y α -SMA, GAPDH como transcrito constitutivo (n=6).

Análisis de la expresión de receptores P2Y por qPCR

Con el fin de analizar si el proceso fibrótico modifica la expresión de los receptores P2Y, analizamos por RT y qPCR la expresión de los transcritos de dichos elementos. Los cDNAs utilizados fueron sintetizados a partir de RNAs obtenidos de homogenados de hígado de animales intactos, animales inyectados con CCl₄ o con vehículo.

Previo al análisis por qRT-PCR; en todos los casos, los amplicones fueron secuenciados y analizados con la herramienta BLAST (NCBI) para corroborar su identidad, siendo positiva esta confirmación. El receptor P2Y₁₁ no fue analizado ya que está bien establecido que no se expresa en roedores (Dreisig & Kornum, 2016).

Las reacciones de PCR diseñadas para detectar los transcritos de los receptores P2Y₁ y P2Y₄ no fueron eficientes por lo que no se incluyen en los resultados.

Nuestros resultados mostraron que los receptores P2Y₂ y P2Y₆ aumentaron significativamente su expresión en los animales tratados con CCl₄ en comparación con animales intactos, y que el receptor P2Y₆ aumentó en comparación con animales a los que se les administró vehículo (Figura 7A y B). Esto concuerda con reportes previos sobre el aumento del receptor P2Y₂ en un contexto de HCC (Xie et al., 2014).

Por otro lado, se observó que los receptores P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ al contrario de los anteriores, disminuyeron su expresión en los animales administrados con CCl₄, aunque en el caso del P2Y₁₂ esta disminución no fue significativa (Figura 7C). El receptor P2Y₁₃ disminuyó su expresión en el grupo tratado en comparación con ambos grupos (Figura 7D). En el caso del receptor P2Y₁₄, éste disminuyó su expresión significativamente tanto en el grupo que sólo fue administrado con aceite como en el de CCl₄, en comparación con el grupo intacto (Figura 7E).

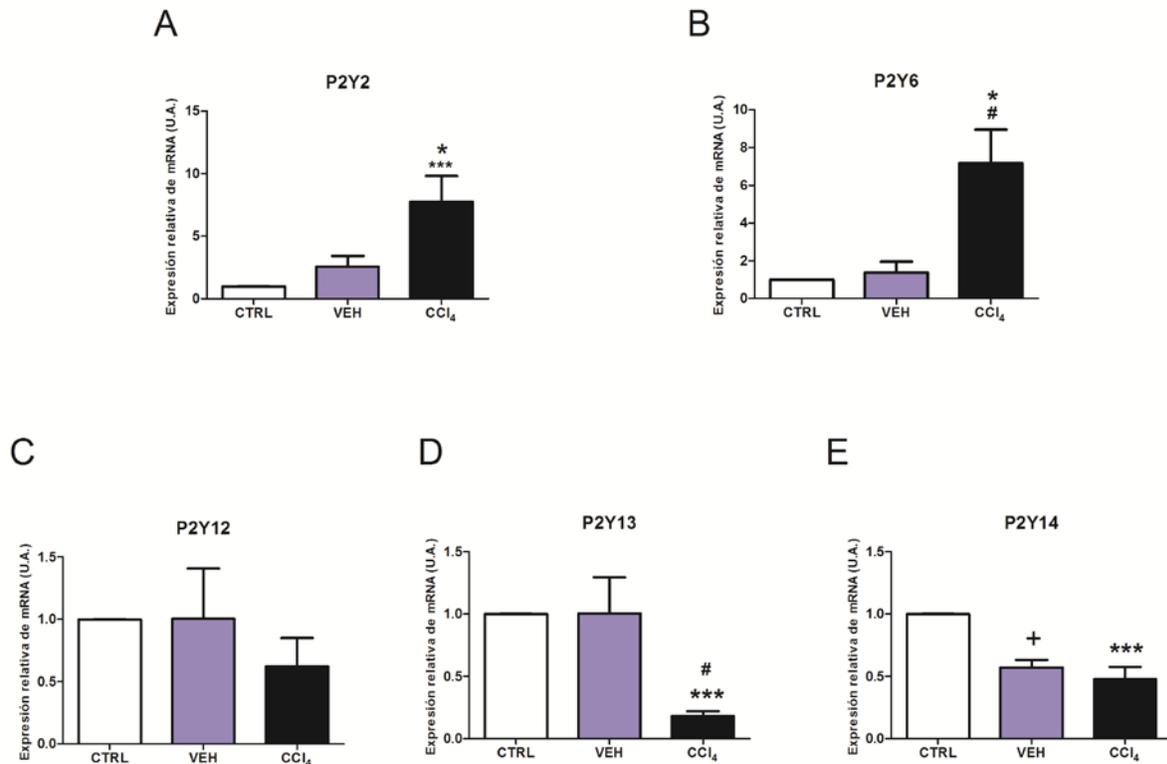


Figura 7. Análisis de la expresión relativa de los transcritos de los receptores P2Y. Los receptores purinérgicos A. P2Y₂, B. P2Y₆, C. P2Y₁₂, D. P2Y₁₃ y E. P2Y₁₄ amplificados de cDNAs de animales intactos, inyectados con vehículo (aceite de maíz) o tratados con CCl₄. Todos los transcritos fueron normalizados contra un transcrito constitutivo, el cual fue la superóxido dismutasa (SOD)2. Las barras representan medias \pm EEM (n=6, *p < 0.01 Intacto vs CCl₄; #p < 0.05 Vehículo vs CCl₄; ***p < 0.001 Intacto vs CCl₄; +p < 0.05 Intacto vs Vehículo, ANOVA de una vía).

Expresión del receptor P2Y₂ en rebanadas de hígado

Tras observar los resultados de los experimentos de qRT-PCR y observar la expresión diferencial de algunos receptores purinérgicos, se realizaron experimentos exploratorios para observar la distribución de los receptores P2Y (n=3).

En primera instancia nuestro interés se dirigió al receptor P2Y₂, debido a que en reportes previos se observó que este receptor está implicado en procesos tanto fisiológicos como patológicos del hígado, entre ellos la inducción de proliferación celular, (Ayata et al., 2012; Xie et al., 2014; Graubard et al., 2013) por lo tanto, esta función podría estar regulada de forma aberrante en este modelo.

Se realizó una inmunofluorescencia en cortes de tejido hepático de animales a los que se les administró el hepatotóxico o sólo el vehículo. Se tomaron imágenes, con la ayuda de un microscopio de epifluorescencia, de ambos grupos de las zonas central y portal (Figura 8). Se puede observar que la expresión del receptor P2Y₂ en animales inyectados con vehículo se mantiene delimitado a la zona central, mientras que la exposición al hepatotóxico promueve la pérdida de esta zonación y el aumento de la expresión de forma generalizada en el tejido hepático.

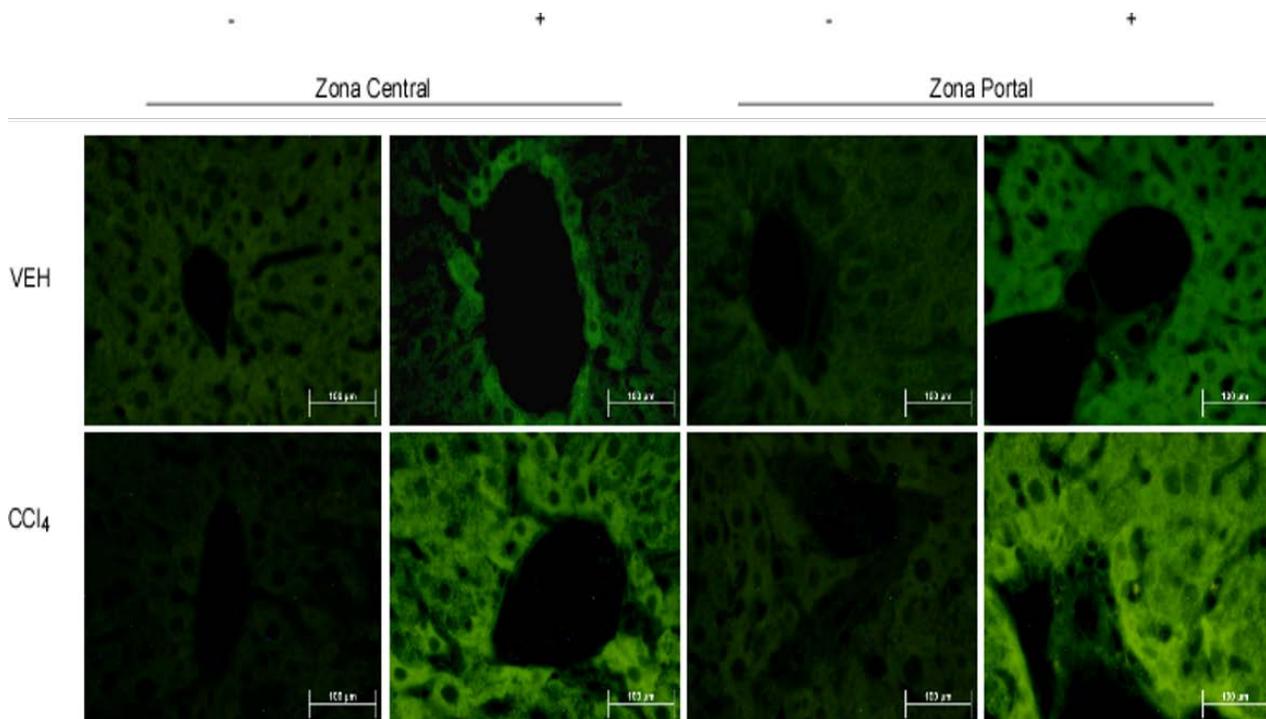


Figura 8. El receptor P2Y₂ en rebanadas de hígado. Detección del receptor P2Y₂ por inmunofluorescencia en rebanadas de hígado de animales inyectados con vehículo o CCl₄. El anticuerpo secundario se encuentra acoplado a Alexa fluor 488 (verde). Se muestra una imagen representativa de un tejido con (+) y sin (-) anticuerpo primario, éste último como control negativo de la detección del receptor. Esto tanto para la zona peri-central y peri-portal del lobulillo hepático de ambos grupos.

Estandarización de cultivos primarios de hepatocitos

Dado que los cambios en la expresión del receptor P2Y₂ son claramente observables en hepatocitos, aunado a que este tipo celular comprende cerca del 80% del total de células que conforman el hígado y, como parte del tejido parenquimal del órgano, se encargan del metabolismo de toxinas, pueden ser de los primeros tipos celulares afectados durante un daño,

decidimos estudiar las respuestas purinérgicas en hepatocitos aislados; por tanto, nos enfrentamos a la necesidad de estandarizar un método eficiente de obtención de hepatocitos del hígado de ratón. Para obtener dichos cultivos utilizamos como base el método de extracción de HSCs, en cual se perfundió el hígado por la vena porta y se administró colagenasa (Mederacke et al., 2015) y aislamos los hepatocitos utilizando un protocolo de separación de células parenquimales bien establecido (Vázquez-Victorio et al., 2015). Finalmente obtuvimos preparaciones de hepatocitos con un 99% de viabilidad.

Caracterización de la respuesta 3 y 24h post-aislamiento

Al realizar varios experimentos exploratorios y con la finalidad de evitar cualquier efecto inherente al proceso de purificación, se estableció un tiempo de 3 horas de reposo para las células, tras lo cual recibían el estímulo con el agonista. Se utilizaron tres agonistas purinérgicos: ATP, UTP y UDP.

El primer agonista que se utilizó fue el ATP. Debido que existe una gran diversidad de receptores purinérgicos con diferentes afinidades por el agonista, se realizó primeramente una curva concentración-respuesta de concentración desde 100 nM hasta 1 mM, con un tiempo de exposición al estímulo de 5 min para todas las concentraciones, tiempo reportado en otros sistemas para observar la respuesta de inducción de fosforilación de la proteína p42/p44 ERK (Figura 9).

Se observaron diferencias significativas al comparar la respuesta basal (100.7 ± 1.202 Densidad Óptica, D.O.) con las respuestas a las concentraciones de 1 mM y 100 μ M (175.7 ± 25.06 y 118.7 ± 3.712 D.O., respectivamente). Sin embargo, el nivel basal elevado impidió observar diferencias en concentraciones menores a 1 mM, lo cual no hizo factibles estas condiciones para los experimentos.

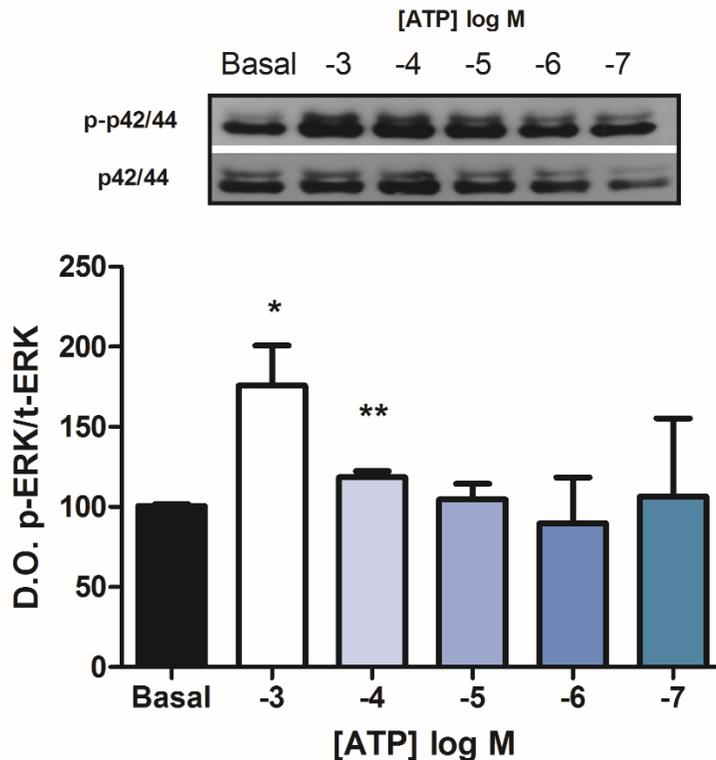


Figura 9. Curva concentración-respuesta a ATP en cultivos primarios de hepatocitos. En la parte superior se observa un Western-Blot representativo de la respuesta a este agonista a nivel de la fosforilación de la proteína MAPK p42/p44. La gráfica muestra la proporción de la Densidad Óptica (D.O.) calculada semicuantitativamente de la forma fosforilada de la proteína con respecto a su forma total, tras un estímulo de ATP a concentraciones: 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} log M durante 5 minutos. Las barras representan la media \pm error estándar de la media (EEM). (n=6, *p<0.05 vs Basal, prueba t; **p<0.01 vs Basal, prueba ANOVA).

Posteriormente se llevó a cabo un curso temporal para observar el tiempo en el que ocurría la mayor respuesta al estímulo de ATP. Para ello se utilizó la concentración de $100 \mu\text{M}$ del agonista y cada pozo de células estuvo expuesto al estímulo un período de tiempo diferente: 1, 3, 5, 15, 30 y 60 minutos, ya que se ha reportado que a estos tiempos se puede observar la fosforilación de p42/p44 ERK; aunque en estos datos no se observaron diferencias significativas, se observó una tendencia de una respuesta mayor a los 5 minutos comparado con otros tiempos, lo cual es consistente con estudios previos (Vázquez-Cuevas et al., 2010) (Resultados no mostrados).

Otro agonista utilizado para observar la respuesta purinérgica fue el UTP, ya que existen receptores que responden a este nucleótido. Se realizó un curso temporal para observar la respuesta de este agonista a una concentración de $100 \mu\text{M}$ a tiempos de 1, 3, 5, 15 y 30 min de estimulación y una curva de concentración, como se había realizado para ATP. Aunque no se

observaron diferencias significativas, se observó una tendencia a una mayor respuesta a 1 y 3 minutos, misma que regresa al basal conforme al tiempo (Resultados no mostrados).

En resumen, el análisis de las respuestas que obtuvimos utilizando hepatocitos a las 3 horas post-aislamiento nos llevó a sugerir que los valores basales de fosforilación de p42/p44 ERK eran muy elevados; además, los resultados de los experimentos no fueron consistentes. Con este fundamento ampliamos el periodo de cultivo post-aislamiento a 24 horas.

Con estas nuevas condiciones se realizaron experimentos exploratorios de tiempo y concentración de los tres agonistas utilizados. Se determinó, tras estandarización, la concentración de 100 μ M y 5 minutos de estimulación de los agonistas. Observamos que 24 h fueron suficientes para reducir el valor de fosforilación de p42/p44 ERK basal (100 ± 46.22 D.O.) de tal forma que se pudieran hacer comparaciones subsecuentes después de un estímulo con ATP, UTP y UDP (242.4 ± 108.4 , 385.4 ± 291 , 475.5 ± 349.8 D.O., respectivamente) (Figura 10).

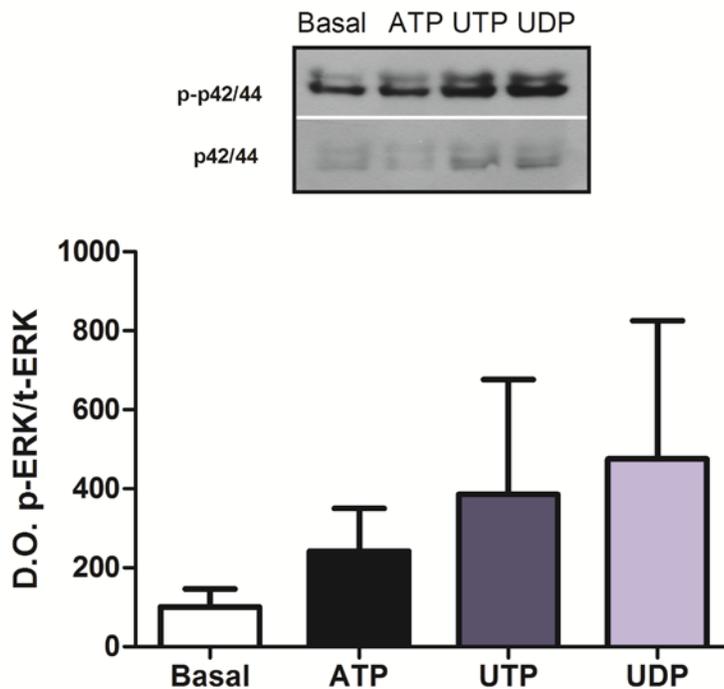


Figura 10. Respuesta generada por ATP, UTP y UDP en cultivos primarios de hepatocitos. En la parte superior se observa un Western-Blot representativo de la respuesta a este agonista a nivel de fosforilación de la MAPK p42/p44. La gráfica muestra la proporción de D.O. de la forma fosforilada de la proteína en relación a su forma total, tras un estímulo de cada uno de los tres agonistas a una concentración de 100 μ M durante 5 minutos. Las barras representan la media \pm error estándar de la media (EEM) (n=3).

Respuesta purinérgica inducida por UTP o UDP en hepatocitos aislados de animales inyectados con CCl₄ o vehículo

Los datos referentes a la abundancia de los receptores P2Y sugieren que el tratamiento con CCl₄ induce cambios importantes, debido que la mayor parte de los antecedentes existentes se han centrado en el papel de los receptores P2Y₂ decidimos analizar funcionalmente, en hepatocitos aislados las respuestas a nucleótidos de uridina.

En este contexto sabemos que los receptores P2Y₂ y P2Y₄ son activados por UTP y los receptores P2Y₆ son responsivos a UDP. Así, analizamos la respuesta inducida por dichos agonistas sobre la fosforilación de la proteína p42/p44 ERK, efector bien caracterizado de los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ (Vázquez-Cuevas et al., 2010, Tackett et al., 2014).

Se obtuvieron cultivos primarios de hepatocitos de animales tratados con CCl₄ y con el fin de comparar la respuesta se colocó el mismo número de células en cada pozo de cada experimento. De manera macroscópica, estos hepatocitos se encontraban sanos y viables.

En experimentos exploratorios previos se estandarizó el tiempo de 24 h de reposo posterior a la extracción para obtener niveles basales adecuados de p42/p44 ERK, después de lo cual fueron sometidas a condiciones de privación de suero durante 4 horas en medio DMEM. Transcurrido ese tiempo las células fueron estimuladas con los agonistas ATP, UTP o UDP durante 5 minutos a una concentración saturante (100 μM). La respuesta de fosforilación de la proteína p42/p44 ERK fue medida por Western Blot (Figura 11).

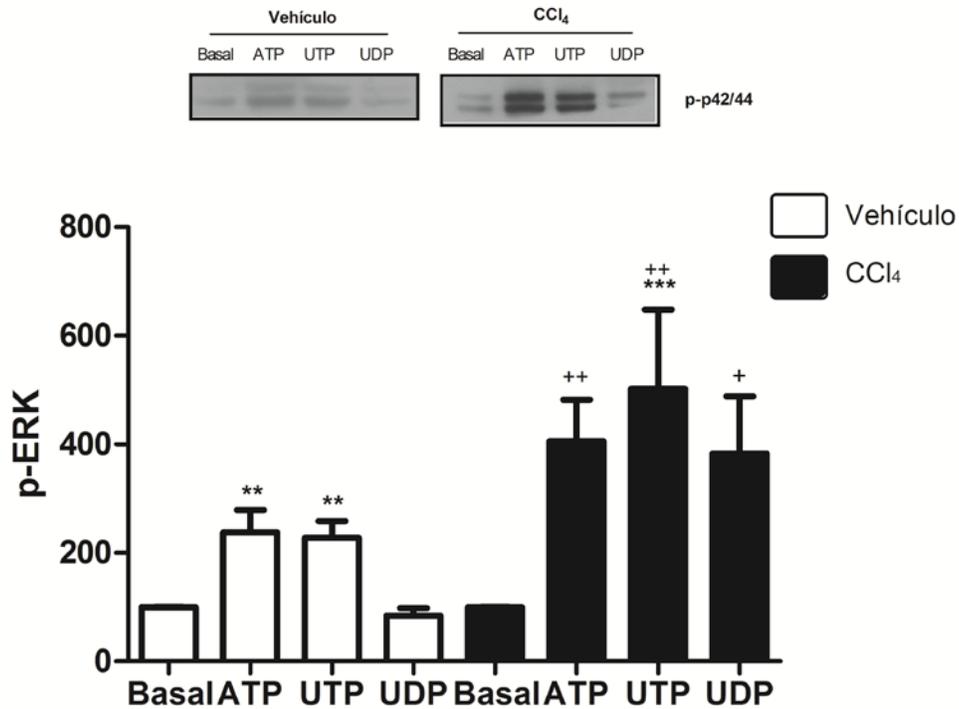


Figura 11. Respuesta de ambos grupos a agonistas purinérgicos en cultivo primario de hepatocitos. En la parte superior se observan Western-Blots representativos de la proteína MAPK p42/44 en su forma fosforilada. En la gráfica se observa la D.O. de la forma fosforilada de esta proteína en respuesta a diferentes estímulos: ATP, UTP y UDP durante 5 min (100 μ M). Las barras representan medias \pm EEM (n=5, $p < 0.0001$ ** ATP Vehículo, UTP Vehículo vs Basal Vehículo; ++ ATP CCl₄, UTP CCl₄ vs Basal CCl₄; *** UTP Vehículo vs UTP CCl₄; + UDP Vehículo vs UDP CCl₄, ANOVA de una vía).

Resulta evidente que en hepatocitos provenientes de animales inyectados con vehículo el UTP induce un aumento en la fosforilación de ERK, mientras que el UDP no tiene efecto (227.6 \pm 30.85 y 84.14 \pm 14.13 D.O., respectivamente). En hepatocitos provenientes de animales tratados con CCl₄ la respuesta con UTP alcanza 5 veces el basal (505.2 \pm 146.2 D.O.) y la respuesta alcanzada con UDP es 3 veces el basal (84.14 \pm 14.13 vs 383 \pm 105 D.O., respectivamente) (Figura 11). Estos cambios revelan que las diferencias de expresión detectadas por qPCR (para P2Y₂ y P2Y₆) y por inmunofluorescencia (para P2Y₂) implican una respuesta exacerbada, haciendo a los hepatocitos fibróticos muy responsivos a la estimulación purinérgica.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se inició el estudio de la posible contribución de los receptores P2Y en la fibrosis hepatocelular. Dado que información creciente vincula la señalización mediada por purinas en la respuesta al daño tisular, consideramos pertinente analizar su papel en el contexto hepático.

En primera instancia establecimos exitosamente la inducción de fibrosis hepática a través de la administración de CCl₄, la administración de este hepatotóxico es un modelo bien establecido de inducción de fibrosis hepática (Novo et al., 2015) que nos permite estudiar desde el inicio la Enfermedad Crónica Hepática. La presencia de fibrosis en los hígados de estos animales se corroboró con base en el análisis histológico, por medio de las tinciones de hematoxilina-eosina y de *tricrómica de Masson*. Además documentamos, utilizando RT-PCR, que los transcritos de *col-1* y α SMA se encuentran aumentados en la condición fibrótica. Estas observaciones, en conjunto, confirman que la inducción de fibrosis fue efectiva con nuestro protocolo.

Cabe mencionar que no existen estudios previos que indaguen sobre el papel de los receptores P2Y en el daño hepatotóxico. Como paso inicial del proyecto se decidió hacer un análisis completo de la expresión de los transcritos de los receptores P2Y por qPCR en muestras de animales intactos, tratados con CCl₄ o administrados sólo con vehículo.

Con estos experimentos se observó que los transcritos de los receptores P2Y₂ y P2Y₆ aumentan significativamente su expresión en condiciones de fibrosis hepática, mientras que los receptores P2Y₁₃ y P2Y₁₄ disminuyen de manera significativa en esta condición (Figura 7). Estas observaciones sugieren que el sistema purinérgico se modifica en el proceso fibrótico.

La información disponible sobre las acciones de los receptores P2Y en el hígado se centra principalmente en el receptor P2Y₂, ya que se ha reportó que este receptor es la isoforma más abundante de los P2Y encontrada en hepatocitos (Beldi et al., 2008a); además, su activación fisiológica favorece la sobrevivencia celular y regula la quimio-atracción de neutrófilos al hígado durante la inflamación después de un daño (Ayata et al., 2012); por lo tanto proponemos que ocurre un aumento en su expresión como parte de la respuesta ante un daño,

que favorece la proliferación celular, durante el proceso fibrótico, y que participa en la respuesta inflamatoria inherente al daño hepatocelular.

Así, el siguiente paso en este estudio fue analizar en rebanadas de hígados fibróticos la expresión del receptor P2Y₂ por medio inmunofluorescencia. Nuestras primeras observaciones indican que en los animales del grupo vehículo, la expresión del receptor se encuentra cerca de la zona peri-central del lobulillo hepático, mientras que en los animales a los que se les indujo fibrosis, en concordancia con los datos de la qPCR, parece expresarse en mucha mayor cantidad y que esta delimitación de zonas se pierde y se expresa de forma generalizada en todo el tejido, por lo que podemos afirmar que el receptor P2Y₂ aumenta su expresión en el hígado fibrótico (Figura 8). De estos análisis concluimos que la variación en la expresión de P2Y₂ es claramente observable en los hepatocitos; aunque debe llevarse a cabo un análisis detallado para entender los cambios en los otros tipos celulares hepáticos.

Para observar si, en el hepatocito, este aumento en la expresión del receptor P2Y₂ correlaciona con una mayor respuesta celular, realizamos experimentos en hepatocitos aislados, observando los niveles de fosforilación de p42/p44 ERK (Figura 11).

Observamos que la estimulación de hepatocitos fibróticos con UTP, un agonista selectivo de los receptores P2Y₂, induce una respuesta casi cuatro y seis veces mayor de la observada en hepatocitos de animales vehículo. Esta observación es muy relevante debido a que existen abundantes evidencias que relacionan al receptor P2Y₂ con procesos de proliferación y sobrevivencia celular, tanto en líneas celulares de HCC (Xie et al., 2014), ante un reto de hipoxia (Tak et al., 2016; Carini et al., 2006), así como en modelos de hepatectomía parcial (Graubardt et al., 2013). Este receptor podría promover procesos de proliferación en el parénquima hepático en etapas tempranas de la Enfermedad Crónica Hepática como es la fibrosis, y podría ser una posible explicación para su regulación a la alta.

Otra de las observaciones interesantes del estudio es el aumento en la expresión del transcrito del receptor P2Y₆, efecto que correlacionó con el aumento en la fosforilación de p42/p44 ERK en respuesta a UDP, el agonista más potente de este receptor (von Kügelgen et al., 2011). Se observó que los niveles de expresión del receptor fueron bajos en el tejido y la respuesta a UDP fue indetectable en hepatocitos de animales vehículo; estas observaciones sugieren que el receptor P2Y₆ es un elemento característico de respuesta al daño y que participa en los eventos iniciales del proceso fibrótico. Al respecto se reportó que monocitos

producen quimiocinas como la IL-8, en respuesta a este nucleótido, a través de la activación de este receptor (Warny et al., 2001) por lo que puede tener un papel en la señalización del inicio del daño.

También se ha observado que, a través del receptor P2Y₆, el UDP funciona como factor de crecimiento en células de músculo liso de aorta de rata (Hou et al., 2002), y promueve la proliferación celular en células de la teca del ovario (Vázquez-Cuevas et al., 2010) lo que podría darnos una pista sobre su posible función al aumentar su expresión.

A pesar de que estas observaciones son iniciales podemos proyectar nuevos estudios bajo la premisa de que el receptor P2Y₆ es un marcador del daño hepatocelular, lo cual podría tener repercusiones clínicas.

Los receptores P2Y₁₃ y P2Y₁₄ pertenecen a otra subdivisión de la familia de receptores P2Y, los cuales están acoplados a proteínas G α_i , por lo que señalizan inhibiendo a la enzima adenilato ciclasa y promoviendo otras respuestas de señalización celular, mientras que los receptores P2Y₂ y P2Y₆, están acoplados a proteínas G $\alpha_{q/11}$ (von Kügelgen et al., 2011).

El receptor P2Y₁₃ está relacionado de forma fisiológica con el metabolismo del colesterol, permitiendo la endocitosis de lipoproteínas acarreadoras de colesterol de alta densidad dentro de los hepatocitos y su posterior excreción en el conducto biliar (Lichtensten et al., 2015). Se sabe que los componentes de la vía del metabolismo del colesterol, entre los que se encuentra el receptor P2Y₁₃, actuando a través de factores de transcripción y proteínas reguladoras que se unen a elementos de respuesta en el DNA, pueden modular la diferenciación y la expansión de células del sistema inmunológico tanto innato como adaptativo, su respuesta a mediadores inflamatorios, sus efectos sobre funciones de los macrófagos y la migración de células inmunes (Spann & Glass, 2013). Esta función fisiológica, que podría contribuir a una resolución exitosa del daño, podría estar alterada en un cuadro fibrótico, al disminuir la presencia del receptor P2Y₁₃ en este contexto.

El receptor P2Y₁₄, al igual que el receptor P2Y₆, puede activarse con el nucleótido UDP; sin embargo, tiene una afinidad mayor para los azúcares de UDP (UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-*N*-acetilglucosamina, entre otros) (Lazarowski & Harden, 2105). Se ha encontrado que este receptor se expresa en muchos tejidos epiteliales y que las respuestas inflamatorias en estos tejidos involucran la activación del receptor P2Y₁₄ para la liberación de

citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, quedan por establecerse sus funciones tanto fisiológicas como patológicas en otros sistemas como el hígado (von Kügelgen et al., 2001).

En este trabajo también se comprobó que los receptores purinérgicos se encuentran en los hepatocitos, aislados en cultivos primarios, y que responden a estímulos purinérgicos (ATP, UTP y UDP). De la misma manera, existe evidencia de que los receptores P2Y están involucrados en la producción y liberación de especies reactivas de oxígeno (Díaz-Vegas et al., 2015) y estos compuestos pueden comenzar a desencadenar la lipoperoxidación de las membranas de las células (Weber et al., 2003) y dar inicio al daño hepático. Es importante investigar a través de herramientas farmacológicas la acción que tienen los receptores purinérgicos presentes en un cuadro de fibrosis hepática.

Uno de los aspectos más importantes es que los resultados obtenidos en este estudio abren diversas interrogantes que serán investigadas y permitirán aportar para conocer el papel del ATP extracelular en el proceso fibrogénico.

CONCLUSIONES

- El modelo de administración de CCl₄ es efectivo para inducir fibrosis hepática, comprobado con la realización de varias técnicas histológicas y de biología molecular.
- La expresión de los transcritos de los receptores receptor P2Y se modifica de manera importante en el proceso fibrótico, siendo P2Y₂ y P2Y₆ regulados a la alta y P2Y₁₃ y P2Y₁₄ a la baja.
- En el tejido hepático el receptor P2Y₂ presenta zonación, característica que se pierde en el tejido fibrótico y su nivel de expresión aumenta notablemente.
- La fosforilación de ERK 1/2 en respuesta a los agonistas purinérgicos es de mayor magnitud en los hepatocitos que provienen de un contexto fibrótico.
- En conjunto, nuestras observaciones indican que la comunicación mediada por los receptores P2Y₂ y P2Y₆ está exacerbada en el tejido fibrótico.

- Resulta evidente que la comunicación purinérgica se reconfigura durante la inducción de fibrosis y es necesario ahondar en el significado fisiopatológico de estos cambios.

PERSPECTIVAS

Las observaciones generadas en el presente proyecto, aunque iniciales, abren un amplio panorama; a continuación se enlistan algunas perspectivas generales que deben ser abordadas experimentalmente.

- El receptor P2Y₂ puede ser un mediador de proliferación que contribuya a la inducción y el mantenimiento de la fibrosis hepatocelular.
- Dado que el receptor P2Y₆ en el tejido sano se expresa en un nivel muy bajo y no es responsivo y en el tejido fibroso su nivel de expresión y sus respuestas son claramente detectables, el receptor P2Y₆ puede representar un marcador de daño hepático con valor clínico.
- La actividad fisiológica mediada por la activación de los receptores P2Y₁₃ y P2Y₁₄ en el hígado puede estar comprometida en un estado fibrótico.

REFERENCIAS

1. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A & Zimmermann H. 2008. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32(1):19-29.
2. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA & Weisman GA. 2006. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors. From molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):281-341.
3. Albanis E & Friedman SL. 2001. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis.* 5(2):315-34, v-vi
4. Arthur MJ. 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(2):G245-9
5. Ayata CK, Ganai SC, Hockenjos B, Willim K, Vieira RP, Grimm M, Robaye B, Boeynaems JM, Di Virgilio F, Pellegatti P, Diefenbach A, Idzko M & Hasselblatt P. 2012. Purinergic P2Y2 receptors promote neutrophil infiltration and hepatocyte death in mice with acute liver injury. *Gastroenterology.* 143(6):1620-1629.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2012.08.049
6. Bansal R, van Baarlen J, Storm G & Prakash J. 2015. The interplay of the Notch signaling in hepatic stellate cells and macrophages determines the fate of liver fibrogenesis. *Sci Rep.* 14;5:18272. doi: 10.1038/srep18272
7. Batailler R & Brenner DA. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 115(2):209-18
8. Beldi G, Enjoji K, Wu Y, Miller L, Banz Y, Sun X & Robson SC. 2008a. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. *Front Biosci.* 13:2588-603.
9. Beldi G, Wu Y, Sun X, Imai M, Enjoji K, Csizmadia E, Candinas D, Erb L & Robson SC. 2008b. Regulated catalysis of extracellular nucleotides by vascular CD39/ENTPD1 is required for liver regeneration. *Gastroenterology.* 1751-60. doi: 10.1053/j.gastro.2008.07.025.
10. Bodin P & Burnstock G. 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* 26(8-9):959-69.
11. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN & Dagnelie PC. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 112(2):358-404.

12. Burnstock G. 2016. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signal*. 12(1):59-67. doi: 10.1007/s11302-015-9493-0
13. Burnstock G, Vaughn B & Robson SC. 2014. Purinergic signaling in the liver in health and disease. *Purinergic Signal*. 10(1):51-70
14. Burnstock G & Verkhratsky A. 2010. Long-term (trophic) purinergic signaling: purinoreceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis*. 1:e9. doi: 10.1038/cddis.2009.11
15. Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. 87(2):659-797
16. Burnstock G. 1972. Purinergic Nerves. *Purinergic Reviews*. Vol. 24 No. 3.
17. Buxton DB, Robertson SM & Olson MS. 1986. Stimulation of glycogenolysis by adenine nucleotides in the perfused rat liver. *Biochem J*. 237(3):773-80
18. Carini R, Alchera E, De Cesaris MG, Splendore R, Piranda D, Baldanzi G & Albano E. 2006. Purinergic P2Y2 receptors promote hepatocyte resistance to hypoxia. *J Hepatol*. 45(2):236-45
19. Cieslak M, Czarnecka J & Roszek K. 2015. The roles of purinergic signaling in psychiatric disorders. *Acta Biochim Pol*. 63(1):1-9. doi: 10.18388/abp.2015_1004
20. Cordeiro JV & Jacinto A. 2013. The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14(4):249-62. doi: 10.1038/nrm3541
21. Corriden R & Insel PA. 2012. New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine and their receptors. *Purinergic Signal*. 8(3):587-98. doi: 10.1007/s11302-012-9311-x
22. Das M, Boerma M, Goree JR, Lavoie EG, Fausther M, Gubrij IB, Pangle AK, Johnson LG & Dranoff JA. 2014. Pathological changes in pulmonary circulation in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhotic mice. *PLoS One*. 9(4):e96043. doi: 10.1371/journal.pone.0096043
23. Di Virgilio F, Boeynaems JM & Robson SC. 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr Opin Pharmacol*. 9(4):507-13. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.021
24. Díaz-Vegas A, Campos CA, Contreras-Ferrat A, Casas M, Buvinic S, Jaimovich E & Espinoza A. 2015. ROS production via P2Y1-PKC-NOX2 is triggered by extracellular ATP

after electrical stimulation of skeletal muscle cells. PLoS One. 10(6):e0129882. doi: 10.1371/journal.pone.0129882.

25. Dolovcak S, Waldrop SL, Fitz JG & Kilic G. 2010. Copper inhibits P2Y(2)-dependent Ca(2+) signaling through the effects on thapsigargin-sensitive Ca(2+) stores in HTC hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 397(3):493-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.141
26. Dranoff JA, Kruglov EA, Abreu-Lanfranco O, Nguyen T, Arora G & Jain D. 2007. Prevention of liver fibrosis by the purinoceptor antagonist pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS). *In Vivo.* 21(8):957-65
27. Dranoff JA, Ogawa M, Kruglov EA, Gaca MD, Sevigny J, Robson SC & Wells RG. 2004. Expression of P2Y nucleotide receptors and ectonucleotidases in quiescent and activated rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287:G417–G424
28. Dranoff JA, Masyuk AI, Kruglov EA, LaRusso NF & Nathanson MH. 2001. Polarized expression and function of P2Y ATP receptors in rat bile duct epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281(4):G1059-67
29. Dreisig K & Kornum BR. 2016. A critical look at the function of the P2Y11 receptor. *Purinergic Signal.* 12(3):427-37. doi: 10.1007/s11302-016-9514-7.
30. Drury AN & Szent-György A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68(3):213-37
31. Duncan AW, Dorrell C & Grompe M. 2009. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology.* 137(2):466-81. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.044.
32. Feranchak AP, Lewis MA, Kresge C, Sathe M, Budge A, Luby-Phelps K, Antich PP & Fitz JG. 2010. Initiation of purinergic signaling by exocytosis of ATP-containing vesicles in liver epithelium. *J Biol Chem.* 285(11):8138-47. doi: 10.1074/jbc.M109.065482
33. Fiebich BL, Akter S & Akundi RS. 2014. The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Front Cell Neurosci.* 1;8:260. doi: 10.3389/fncel.2014.00260
34. Flores RV, Hernández-Pérez MG, Aquino E, Garrad RC, Weisman GA & González FA. 2005. Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y2 nucleotide receptor. *Mol Cell Biochem.* 280(1-2):35-45.
35. Friedman SL. 2008. Hepatic Stellate Cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 88:125-172

36. Forbes SJ & Parola M. 2011. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 25(2):207-17
37. González-Maeso J. 2011. GPCR oligomers in pharmacology and signaling. *Mol Brain.* 27;4(1):20. doi: 10.1186/1756-6606-4-20.
38. Graubardt N, Fahrner R, Trochsler M, Keogh A, Breu K, Furer C, Stroka D, Robson SC, Slack E, Candinas D & Beldi G. 2013. Promotion of liver regeneration by natural killer cells in a murine model is dependent on extracellular adenosine triphosphate phosphohydrolysis. *Hepatology.* 57(5):1969-79. doi: 10.1002/hep.26008
39. Heil M & Land WG. 2014. Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. *Front Plant Sci.* 5:578. doi: 10.3389/fpls.2014.00578
40. Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo- Solis C, Lopez V, Sanchez-Sevilla L, Yanez L & De Sanchez V. 2001. Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology.* 34:677–688
41. Hoffmann C, Ziegler N, Reiner S, Krasel C & Lohse MJ. 2008. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P₂Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem.* 283(45):30933-41.
42. Holton FA & Holton P. 1954. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol.* 126: 124-140.
43. Hou M, Harden TK, Kuhn CM, Baldetorp B, Lazarowski E, Pendergast W, Möller S, Edvinsson L & Erlinge D. 2002. UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P₂Y(6) receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282(2):H784-92.
44. Hourani SM, Bailey SJ, Nicholls J & Kitchen I. 1991. Direct effects of adenylyl 5'-(beta, gamma-methylene)diphosphonate, a stable ATP analogue, on relaxant P₁-purinoceptors in smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 104(3):685-90.
45. Hu H, O'Mullane LM, Cummins MM, Campbell CR, Hosoda Y, Poronnik P, Dinudom A & Cook DI. 2010. Negative regulation of Ca²⁺ influx during P₂Y(2) purinergic receptor activation is mediated by Gbetagamma-subunits. *Cell Calcium.* 47(1):55-64. doi: 10.1016/j.ceca.2009.11.005
46. Idzko M, Ferrari D & Eltzchig HK. 2014. Nucleotide signaling during inflammation. *Nature.* 509(7500):310-7. doi: 10.1038/nature13085

47. Inoue A, Obayashi K, Sonoda Y, Nakamura A, Ueno T, Kuhara S & Tashiro K. 2016. Regulation of matrix metalloproteinase-1 and alpha-smooth muscle actin expression by interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor alpha in hepatic stellate cells. *Cytotechnology*. [Epub ahead of print]
48. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA & Kisseleva T. 2014. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12;111(32). doi: 10.1073/pnas.1400062111
49. Junger WG. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 11(3):201-12. doi: 10.1038/nri2938
50. Kohout TA & Lefkowitz RJ. 2003. Regulation of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol*. 63(1):9-18
51. la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J & Girolomoni G. 2003. Alerting and tuning the immune system response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol*. 73(3):339-43
52. Latz E, Xiao TS & Stutz A. 2013. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 13(6):397-411. doi: 10.1038/nri3452
53. Lazarowski ER & Harden TK. 2015. UDP-sugars as extracellular signaling molecules: cellular and physiological consequences of P2Y₁₄ receptor activation. *Mol Pharmacol*. 88(1):151-60. doi: 10.1124/mol.115.098756
54. Li D & Friedman SL. 1999. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 14(7): 618-33
55. Lichtenstein L, Serhan N, Espinoza-Delgado S, Fabre A, Annema W, Tietge UJ, Robaye B, Boeynaems JM, Laffarque M, Perret B & Martínez LO. 2015. Increased atherosclerosis in P2Y₁₃/apolipoprotein E double-knockout mice: contribution of P2Y₁₃ to reverse cholesterol transport. *Cardiovasc Res*. 106(2):314-23. doi: 10.1093/cvr/cvv109.
56. Luede T & Schwabe RF. 2011. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 8(2):108-18. doi: 10.1038/nrgastro.2010.213
57. Luttrell LM & Lefkowitz RJ. 2002. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*. 1;115(Pt 3):455-65

58. Mederacke I, Dapito DH, Affò S, Uchinami H & Schwabe RF. 2015. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nat Protoc.* 10(2):305-15. doi: 10.1038/nprot.2015.017
59. Mortezaee K, Sabbaghziarani F, Omid A, Dehpour AR, Omid N, Ghasemi S, Pasbakhsh P & Ragerdi Kashani I. 2015. Therapeutic value of melatonin post-treatment on CCl₄-induced fibrotic rat liver. *Can J Physiol Pharmacol.* 20:1-12.
60. Nayagam DA, McGowan C, Villalobos J, Williams RA, Salinas-LaRosa C, McKelvie P, Lo I, Basa M, Tan J & Williams CE. 2013. Techniques for Processing Eyes Implanted With a Retinal Prosthesis for Localized Histopathological Analysis. *J. Vis. Exp.* (78), e50411, doi:10.3791/50411
61. Novo E, Cannito S, Morello E, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A & Parola M. 2015. Hepatic myofibroblasts and fibrogenic progression of chronic liver diseases. *Histol Histopathol.* 30(9):1011-32. doi: 10.14670/HH-11-623
62. Pankratov Y, Lalo U, Verkhatsky A & North RA. 2007. Quantal release of ATP in mouse cortex. *J Gen Physiol.* 129(3):257-65
63. Picher M & Boucher RC. 2003. Human airway ecto-adenylate kinase. A mechanism to propagate ATP signaling on airway surfaces. *J Biol Chem.* 278(13):11256-64
64. Ralevic V & Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews.* 50(3): 413-492
65. Ramadori G & Saile B. 2004. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest.* 84(2):153-9
66. Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A & Evans RJ. 2006. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452(5):486-500
67. Rui M, Nasti R, Bignardi E, Della Volpe S, Rossino G, Rossi D & Collina S. 2017. PKC in regenerative therapy: New insights for old targets. *Pharmaceuticals (Basel).* 10(2). pii: E46. doi: 10.3390/ph10020046
68. Saïd-Sadier N & Ojcius DM. 2012. Alarmins, inflammasomes and immunity. *Biomed J.* 35(6):437-49. doi: 10.4103/2319-4170.104408
69. Santana PT, Martel J, Lai HC, Perfettini JL, Kanellopoulos JM, Young JD, Coutinho-Silva R & Ojcius DM. 2016. Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? *Microbes Infect.* 18(2):93-101. doi: 10.1016/j.micinf.2015.10.007
70. Schöfl C, Ponczek M, Mader T, Waring M, Benecke H, von zur Mühlen A, Mix H, Cornberg M, Böker KH, Manns MP & Wagner S. 1999. Regulation of cytosolic free

calcium concentration by extracellular nucleotides in human hepatocytes. *Am J Physiol.* 276(1 Pt 1):G164-72

71. Seye CI, Ningpu Y, González FA, Erb L & Weisman GA. 2004. The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem.* pp. 35679–35686.
72. Spann NJ & Glass CK. 2013. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol.* 14(9):893-900. doi: 10.1038/ni.2681
73. Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E & Flavell R. 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature.* 18;481(7381):278-86. doi: 10.1038/nature10759
74. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R & Huang XY. 2016. Regulation, Signaling and Physiological functions of G-Proteins. *J Mol Biol.* 25;428(19):3850-68. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002
75. Tacke F & Zimmermann HW. 2014. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol.* 60(5):1090-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.025
76. Tackett BC, Sun H, Mei Y, Maynard JP, Cheruvu S, Mani A, Hernández-García A, Vigneswaran N, Karpen SJ & Thevananther S. 2014. P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 307(11):G1073-87. doi: 10.1152/ajpgi.00092.2014
77. Tak E, Jun DY, Kim SH, Park GC, Lee J, Hwang S, Song GW & Lee SG. 2016. Upregulation of P2Y2 nucleotide receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *J Int Med Res.* 44(6):1234-1247. doi: 10.1177/0300060516662135
78. Takemura S, Kawada N, Hirohashi K, Kinoshita H & Inoue M. 1994. Nucleotide receptors in hepatic stellate cells of the rat. *FEBS Lett.* 354:53–56
79. Tanaka K, Choi J, Cao Y & Stacey G. 2014. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front Plant Sci.* 3;5:446. doi: 10.3389/fpls.2014.00446
80. Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S, Zimmerman TL, Goss JA, Karpen SJ. 2004. Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology.* 39(2):393-402.
81. Trautmann A. 2009. Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal”. *Sci Signal.* 2(56):pe6. doi: 10.1126/scisignal.256pe6.

82. Tschoop J & Schroder K. 2010. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol.* 10(3):210-5. doi: 10.1038/nri2725
83. Tulapurkar ME, Zündorf G & Reiser G. 2006. Internalization and desensitization of a green fluorescent protein-tagged P2Y nucleotide receptor are differently controlled by inhibition of calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurochem.* 96(3):624-34
84. Tulapurkar ME, Schäfer R, Hanck T, Flores RV, Weisman GA, González FA & Reiser G. 2005. Endocytosis mechanism of P2Y2 nucleotide receptor tagged with Green fluorescent protein: clathrin and actin cytoskeleton dependence. *Cell Mol Life Sci.* 62(12):1388-99
85. Vaughn BP, Robson SC & Burnstock G. 2012. Pathological roles of purinergic signaling in the liver. *J Hepatol.* 57:916–920
86. Vázquez-Cuevas FG, Zárate-Díaz EP, Garay E & Arellano RO. 2010. Functional expression and intracellular signaling of UTP-sensitive P2Y receptors in theca-interstitial cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 14;8:88. doi: 10.1186/1477-7827-8-88.
87. Vázquez-Victorio G, Caligaris C, Del Valle-Espinoza E, Sosa-Garrocho M, González-Arenas NR, Reyes-Cruz G, Briones-Orta MA & Macías-Silva M. 2015. Novel regulation of Ski protein stability and endosomal sorting by actin cytoskeleton dynamics in hepatocytes. *J Biol Chem.* 290(7):4487-99. doi: 10.1074/jbc.M114.579532.
88. von Kügelgen I & Harden TK. 2011. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv Pharmacol.* 61:373-415
89. Wang T, Takikawa Y, Watanabe A, Kakisaka K, Oikawa K, Miyamoto Y & Suzuki K. 2014. Proliferation of mouse liver stem/progenitor cells induced by plasma from patients with acute liver failure is modulated by P2Y2 receptor-mediated JNK activation. *J Gastroenterol.* 49(12):1557-66. doi: 10.1007/s00535-013-0927-6
90. Warny M, Aboudola S, Robson SC, Sévigny J, Communi D, Soltoff SP & Kelly CP. 2001. P2Y₆ nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 276, 28, 26051-26056.
91. Weber LW, Boll M & Stampfl A. 2003. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 33(2):105-36.
92. Wettschureck N & Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific function. *Physiol Rev.* 85(4):1159-204.

93. Wree A & Marra F. 2016. The inflammasome in liver disease. *J Hepatol.* 65(5):1055-1056. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.002
94. Woo K, Sathe M, Kresge C, Esser V, Ueno Y, Venter J, Glaser SS, Alpini G & Feranchak AP. 2010. Adenosine triphosphate release and purinergic (P2) receptor-mediated secretion in small and large mouse cholangiocytes. *Hepatology.* 52(5):1819-28. doi: 10.1002/hep.23883
95. Xie R, Xu J, Wen G, Jin H, Liu X, Yang Y, Ji B, Jiang Y, Song P, Dong P & Tou B. 2014. The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem.* 289(27):19137-49. doi: 10.1074/jbc.M113.540047
96. Zelko IN, Mariani TJ & Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the cuzn-sod (sod1), mn-sod (sod2) and ec-sod(sod3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Biology & Medicine.* 33, 337-349.
97. Zhong H, Yang L, Belardinelli L & Zeng D. 2007. Pro-fibrotic roles of the A2B adenosine receptor in human primary hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 46:S135
98. Zimmermann H. 2006. Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp.* 276:113-28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales vías de señalización de los receptores P2Y.	14
Figura 2. Representación del reconocimiento de patrones moleculares asociados al daño..	17
Figura 3. Representación esquemática de la estructura de los lóbulos hepáticos.....	19
Figura 4. Representación de la actividad biológica de las MMPs..	20
Figura 5. Tinción de hematoxilina-eosina de tejidos hepáticos de ambos grupos.....	32
Figura 6. Establecimiento de fibrosis hepática.....	33
Figura 7. Análisis de la expresión relativa de los transcritos de los receptores P2Y..	35
Figura 8. El receptor P2Y2 en rebanadas de hígado.	36
Figura 9. Curva concentración-respuesta a ATP en cultivos primarios de hepatocitos..	38
Figura 10. Respuesta generada por ATP, UTP y UDP en cultivos primarios de hepatocitos.....	39
Figura 11. Respuesta de ambos grupos a agonistas purinérgicos en cultivo primario de hepatocitos..	41

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Receptores P2Y, sus principales agonistas y su mecanismo de transducción.....	14
Tabla 2 Descripción de la secuencia de los cebadores utilizados en la qPCR.	29