



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA  
Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Regulación de la expresión génica por ácidos  
biliares en hepatocitos”**

**T E S I S**

Que presenta

**SUILMA IVETTE PÉREZ PINEDA**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS EN INFECTÓMICA Y  
PATOGENESIS MOLECULAR**

**Directores de Tesis:**

**Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi**

**Dr. José Luis Rosales Encina**

**Ciudad de México**

**Marzo, 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con CVU: 561726

A la auxiliar de investigación Biól. Lidia Baylón Pacheco por su apoyo en la enseñanza y desarrollo en la preparación de soluciones y técnicas de biología molecular presentes en este trabajo.

A la auxiliar de investigación M. en C. Patricia Espíritu Gordillo por su apoyo en la enseñanza en las técnicas de microscopía confocal, en la adquisición y procesamiento de las imágenes y análisis estadísticos.

Al auxiliar de investigación Biól. Fernando Medina Ramírez por su apoyo y enseñanza respecto al mantenimiento y preservación del cultivo celular.

A la auxiliar de investigación Q.F.B. Silvia Galindo Gómez por su apoyo en el soporte técnico y apoyo en el mantenimiento del cultivo celular, entre otras técnicas como histología, cultivo primario, manejo de animales, cultivo de amibas y preparación de medio, inoculación de amibas en hámster, que, si bien no todas estas técnicas fueron usadas para el desarrollo del presente proyecto, me las enseñó pacientemente y contribuyen a mi desarrollo profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, Suilma Pineda Castillejos, por su amor infinito, paciencia y apoyo incondicional.

A mis hermanitas: Kari y Dalia

A mi papá

Los amo.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	7
2. ABREVIATURAS .....	12
3. INTRODUCCIÓN.....	13
3.1 Generalidades del hígado.....	13
3.2 Vesícula biliar .....	19
3.3 Sistema biliar .....	22
3.4 Estructura del árbol biliar .....	23
3.5 Secreción biliar .....	25
3.6 Ácidos biliares (AB's) .....	29
1.6.1 Síntesis de ácidos biliares .....	33
1.6.2 Conjugación de los ácidos biliares .....	37
1.7 Transporte de ácidos biliares .....	38
1.7.1 Transporte hepático de los ácidos biliares .....	38
1.7.2 Transporte intestinal de los ácidos biliares.....	41
1.8 Transportadores de la familia ABC .....	42
1.8.1 PROTEÍNA ASOCIADA A MULTIRRESISTENCIA A DROGAS (MDR1 O ABCB1) .....	42
1.8.2 MRP2, (ABCC2).....	44
1.8.3 MRP3, (ABCC3) .....	45
1.8.4 MRP4, (ABCC4).....	47
1.9 Receptores nucleares (RN) .....	49
1.9.1 Receptor Farnesoide (FXR).....	52
1.9.2 Receptor Constitutivo de Androstano (CAR) .....	53
1.9.3 Receptor Activador de la proliferación de Peroxisomas (PPAR) .....	55
1.9.4 Receptor de la vitamina D (VDR).....	55
1.10 Línea celular HEpG2.....	57

4. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	60
5. JUSTIFICACIÓN.....	65
6. HIPÓTESIS .....	66
7. OBJETIVO GENERAL .....	66
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	66
9. MATERIALES Y MÉTODOS .....	67
9.1 Cultivo celular.....	67
9.2 Ensayos de viabilidad con MTT .....	67
9.3 Fraccionamiento subcelular .....	68
9.4 Ensayos de Western blot.....	69
7.5 Ensayos de RT-PCR punto final y RT-qPCR .....	70
7.5.1 Extracción de RNA.....	70
7.5.2 Tratamiento con DNAsa.....	70
7.5.3 Síntesis de cDNA.....	71
7.5.3 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa punto final).....	71
7.5.4 qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) .....	74
10. RESULTADOS .....	79
10.1 Efectos de los AB sobre la viabilidad celular.....	79
8.2 Expresión de genes involucrados con el transporte y receptores nucleares activados por AB's .....	83
8.3 Análisis de las fracciones proteicas.....	87
8.4 Expresión de las proteínas MRP4 y MRP3 tras la exposición a AB	87
8.4.1 Análisis de la localización y expresión de los trasportadores MRP3 y MRP4 en cultivos no confluentes tras la exposición a los diferentes AB .....	89
8.4.2 Análisis de co-localización de los trasportadores en el núcleo en cultivos no confluentes .....	97

8.4.3 Análisis de los transportadores MRP3 y MRP4 a diferentes estados de confluencia celular .....	100
8.4.4 Análisis de la localización y expresión de los transportadores MRP3 y MRP4 en cultivos confluentes post- tratamiento con los diferentes AB .....	102
8.5 Análisis de proteínas secretadas al medio .....	108
11. DISCUSIÓN .....	111
12. CONCLUSIÓN .....	120
13. REFERENCIAS .....	122

## 1. RESUMEN

La síntesis de la bilis es una de las actividades más importantes y exclusivas del hígado cuyo rol principal es la emulsificación de las grasas provenientes de la ingesta de alimentos permitiendo así la absorción de grasas provenientes de los alimentos. Sin embargo más allá de su rol en la digestión, a la bilis y sus principales componentes, los ácidos biliares (AB's), se les han descrito funciones beneficiosas como propiedades antimicrobianas, proveen la principal ruta de excreción de colesterol y xenobióticos, coadyuvantes en la regeneración hepática y por otro lado, la alteración en el flujo de los AB's o/y su acumulación en patologías colestásicas han demostrado las capacidades lesivas de los AB's que pueden generar desde la producción de especies reactivas de oxígeno, destrucción de membranas celulares y de algunos organelos, lisis celular, apoptosis, incluso se ha observado correlación entre algunos AB's con enfermedades como esófago de Barret, cánceres hepáticos y de colon, sin embargo aún no son conocidos del todo los mecanismos que generan estos efectos negativos en parte por la cantidad tan abundante de especies de ácidos biliares que son formados, el *pool* biliar (tanto en humanos como en especies animales), proteínas transportadoras y receptoras de las células, además de las variaciones en cuanto a concentraciones (de un AB u otro) que se presentan en las diversas patologías asociadas a éstos. En el presente trabajo desarrollamos un modelo *in vitro* de colestasis para evaluar los efectos individuales de los AB's más abundantes en humanos sobre las células, mediante ensayos de MTT y microscopia evaluamos sus efectos sobre la viabilidad celular, a través de ensayos de qPCR, microscopía confocal y western blot observamos los efectos de los AB's sobre la expresión de los transportadores auxiliares en la colestasis: transportadores asociados a multirresistencia a drogas 3 y 4 (MRP3,

MPR4), además de su efecto sobre la expresión de genes que codifican para los receptores nucleares (RN's) que están involucrados en la homeostasis de los AB's mediante la inducción de transportadores de membrana que permiten el flujo y eflujo de los mismos e incluso su propia síntesis, en una aproximación a lo que sucede durante la colestasis. Pudimos comprobar que los AB's a pesar de ser compuestos con similitudes químicas, ejercen diferentes efectos dosis y especie-dependiente sobre la viabilidad las células, además de la posible inducción de estrés oxidativo a concentraciones medias por algunos ácidos biliares que no inducen cambios morfológicos. Por otro lado, observamos que los transportadores MRP3 y MPR4 necesitan de la polarización celular para ser expresados correctamente en las membranas celulares de las células HEPG2, mediante microscopía confocal y ensayos de western blot determinamos que en este tipo celular MRP3 se expresa de manera atípica y heterogénea con localizaciones inusuales en este tipo célula, mientras que MRP4 presenta la expresión y localización reportada en la literatura. Ácido cólico induce la expresión a nivel proteína de los transportadores, mientras que ácido quenodesoxicólico muy posiblemente debido a su estructura química con un grupo  $\alpha$ -hidroxilo induce la sobreexpresión de éstos a nivel de mensajero, así como los mensajeros de los receptores nucleares farnesoide y proliferador activador de peroxisomas (FXR y PPAR) los cuales están ampliamente ligados con la regulación de la expresión de otros receptores de membrana y por tanto el flujo de los AB's. Con este trabajo mostramos una aproximación a lo que sucede durante las patologías que involucran la sobrecarga de ácidos biliares, el papel que desempeña MRP4, la poca sobre expresión de MRP3 que soporta anteriores reportes en la literatura de



que no es un receptor indispensable, además de la importancia de conocer los efectos lesivos e inductores causados por los AB's.

## **ABSTRACT**

The synthesis of bile is one of the most important and exclusive activities of the liver whose main role is the emulsification of fats from food intake, thus allowing the absorption of fats from food. However, beyond its role in digestion, bile and its main components, bile acids (BA's), have been described beneficial functions such as antimicrobial properties, they provide the main route of excretion of cholesterol and xenobiotics, adjuvants in the liver regeneration and on the other hand, the alteration in the flow of BA's or/and its accumulation in cholestatic pathologies have demonstrated the damaging capacities of BA's that can generate from the production of reactive oxygen species (ROS), destruction of cell membranes and of some organelles, cell lysis, apoptosis, a correlation has even been observed between some BA's with diseases such as Barrett's esophagus, liver and colon cancers, however, the mechanisms that generate these negative effects are not fully known, in part due to the amount so abundant species of BA's that are formed, the bile pool (both in humans and in animal species), protein cell transporters and receptors, in addition to the variations in concentrations (of one BA or another) that occur in the various pathologies associated with them. In the present work we develop an *in vitro* model of cholestasis to evaluate the individual effects of the most abundant BA's in humans on cells, through MTT and microscopy assays, we evaluate their effects on cell viability, through qPCR assays, confocal microscopy and western blot we observed the effects of BA's on the expression of auxiliary transporters in cholestasis: transporters associated with multidrug resistance 3 and 4 (MRP3, MPR4), in addition to their effect on the expression of genes that code for nuclear receptors. (NR's) that are involved in the homeostasis of BA's through the induction of membrane transporters that allow their flow and efflux and even their

own synthesis, in an approximation to what happens during cholestasis. We were able to verify that BA's, despite being compounds with chemical similarities, exert different dose and species-dependent effects on cell viability, in addition to the possible induction of oxidative stress at medium concentrations by some BA's that do not induce morphological changes. On the other hand, we observed that the MRP3 and MPR4 transporters need cell polarization to be expressed correctly in the cell membranes of HEPG2 cells. Through confocal microscopy and western blot tests, we determined that in this cell type MPR3 is expressed in an atypical and heterogeneous way with unusual locations in this cell type, while MPR4 presents the expression and location reported in the literature. Cholic acid induces the expression at the protein level of transporters, while chenodeoxycholic acid, very possibly due to its chemical structure with an  $\alpha$ -hydroxyl group, induces the overexpression of these at the messenger level, as well as the messengers of the nuclear farnesoide receptor and peroxisome proliferator activated receptor (FXR and PPAR) which are widely linked with the regulation of the expression of other membrane receptors and therefore the flow of BA's. In this work we show an approach to what happens during pathologies that involve bile acid overload, the role played by MPR4, the little over expression of MPR3 that supports previous reports in the literature that it is not an indispensable receptor, in addition to the importance of knowing the damaging and inducing effects caused by main BA's.

## 2. ABREVIATURAS

ABC, Transportadores dependientes de ATP

AB's, Ácidos biliares

AC, Ácido cólico

BSEP, Bomba exportadora de ácidos biliares

CAR, Receptor constitutivo de androstano

DC, Ácido desoxicólico

FXR, Receptor nuclear farnesoide

GC, Ácido desoxicólico

GQ, Ácido glicoquenodesoxicólico

LT, Ácido litocólico

MDR1, Proteína asociada a multirresistencia a drogas miembro 1

MRP3, Proteína asociada a multirresistencia a drogas miembro 3

MRP4, Proteína asociada a multirresistencia a drogas miembro 4

NTCP, Polipéptido cotransportador de sodio-taurocolato

PPAR, Receptor activador de la proliferación de peroxisomas

RN, Receptores nucleares

RXR, Receptor nuclear retinoide

Q, Ácido quenodesoxicólico

VDR, Receptor nuclear de la vitamina D

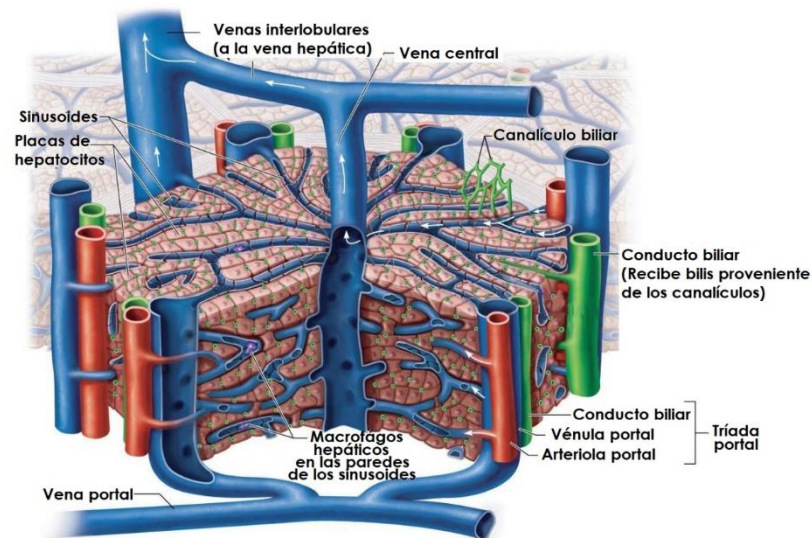
### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Generalidades del hígado

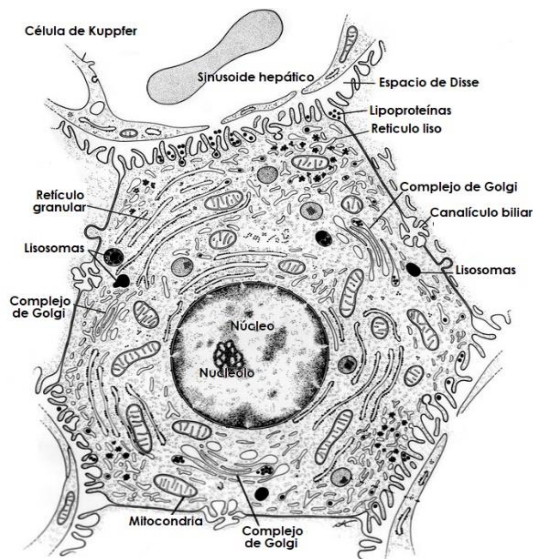
El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo humano, el cual representa aproximadamente del 2 al 3% del peso corporal en el adulto y realiza múltiples funciones necesarias para mantener la homeostasis del organismo; para llevar a cabo esto, el órgano sintetiza, metaboliza, almacena, exporta, neutraliza y/o excreta moléculas que entran al organismo. El hígado se encuentra ubicado en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, por debajo del hemidiafragma derecho y está protegido parcialmente por la caja torácica. Anatómicamente se divide en: lóbulos derecho, izquierdo, cuadrado y caudado o de Spiegel. La cubierta externa del hígado es la cápsula de Glisson, formada por tejido conectivo fibroso, ubicada por debajo del peritoneo, unida al tejido hepático y se prolonga al interior al nivel del hilio, el cual consta de arteria y venas hepáticas, vena porta, vasos linfáticos y el conducto biliar que drena la bilis<sup>1</sup>. Es en los vasos capilares más pequeños, llamados sinusoides, en donde la mezcla de sangre portal y arterial entregada tiene acceso casi directo a los hepatocitos del parénquima del hígado. La sangre procesada es liberada de los sinusoides a las venas centrales terminales que desembocan finalmente en la vena cava inferior<sup>2,3</sup>.

Los hepatocitos son las células más abundantes del parénquima hepático, constituyen aproximadamente el 60%. [4] Están dispuestos en placas o láminas interconectadas de espesor de células individuales, dando lugar a un laberinto continuo de espacios o lagunas en las que se suspenden los vasos sanguíneos (**Figura 1**). Malpighi (1666) describió por primera vez los lobulillos y los acinos como las unidades más pequeñas en esta estructura. En la actualidad existen tres conceptos

de la estructura hepática: el del lobulillo clásico descrito en 1833 por Kiernan, el lobulillo portal de Mall y el acino hepático de Rappaport<sup>5</sup>.



**FIGURA 1. LOBULILLO HEPÁTICO.** La unidad estructural hepática es el lobulillo hepático o también llamado lobulillo clásico, el cual morfológicamente es un prisma hexagonal de aproximadamente 2 mm de longitud y 1 mm de diámetro, delimitado por tejido conectivo interlobulillar y compuesto por cordones o láminas de hepatocitos que irradian hacia la periferia desde la vena central y están separados por sinusoides, los cuales comunican las ramificaciones terminales de la arteria hepática y la vena porta con la vena central. En las esquinas de los lobulillos, donde varios de ellos se limitan entre sí, se observan las triadas portales o espacios porta, que están conformados por una vénula (rama de la vena porta), una arteriola (rama de la arteria hepática), un conducto biliar y vasos linfáticos, todos rodeados por una vaina de tejido conectivo. Tomado de: Netter, Frank H. "Atlas de anatomía humana", 6ª edición, 2001, ELSEVIER



**FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL HEPATOCITO**

<https://www.sciencephoto.com/media/997124/view/liver-cell-with-labelled-structures-illustration>

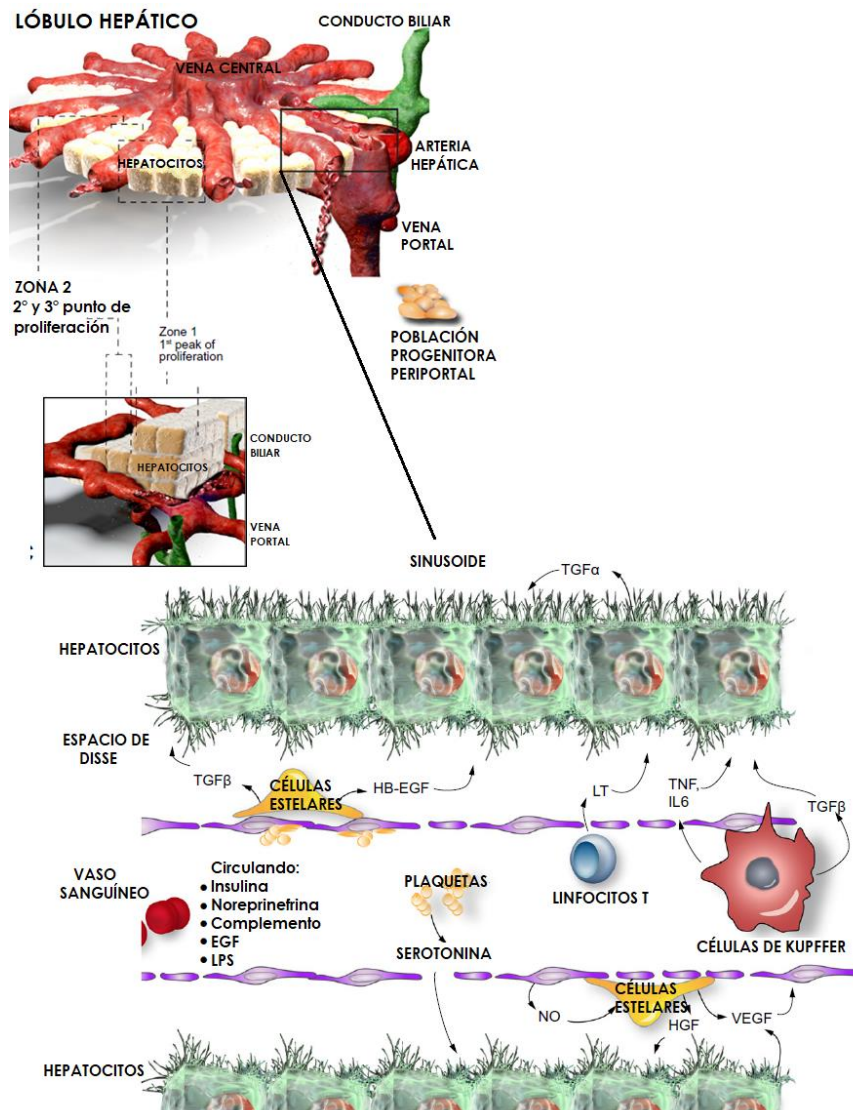
Los hepatocitos son células poliédricas, generalmente poseen seis "caras" cubiertas con microvellosidades (**Figura 2**). La mitad de estas caras están unidas a los hepatocitos adyacentes y forman las paredes complementarias de los canalículos biliares (dominio o cara biliar). En las áreas centrales del lobulillo (zona III de Rappaport), los canalículos biliares tienen aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho, pero se ensanchan (1-2.5  $\mu\text{m}$ ) en las zonas periféricas (zona Rappaport I) donde pueden estar limitados por tres hepatocitos. Las zonas I, II y III de Rappaport representan áreas abastecidas con sangre de primera, segunda y tercera calidad con respecto al contenido de oxígeno y nutrientes (**Figura 3**). Las restantes caras de las células hepáticas son particularmente abundantes de microvellosidades. Son adyacentes a las paredes sinusoidales, pero separadas de ellas por un espacio perisinusoidal, el espacio de Disse. Como consecuencia, los espacios de Disse forman un laberinto continuo de micro lagunas dentro del hígado y contienen cantidades variables de líquido tisular. Las células estelares son aproximadamente el 15% del total de células residentes<sup>6</sup>. Estas células parecen ser el principal sitio de almacenamiento de los retinoides en el hígado, además son células fibrogénicas involucradas en la regulación de la matriz hepática y la fibrosis<sup>7</sup>. Después de la lesión hepática, las células estelares pierden vitamina A y se activan, que es el proceso mediante el cual las células quiescentes se transforman en

miofibroblastos proliferativos, fibrogénicos y contráctiles<sup>8</sup>. Otro tipo celular presente en el hígado son las células de Kupffer, que constituyen las células fagocíticas presentes en los sinusoides hepáticos, éstas son también importantes en la fibrogénesis hepática ya que favorecen la formación de matriz celular en situaciones de lesión continua y mejoran su degradación durante la recuperación<sup>9</sup>. Las células endoteliales que recubren los sinusoides parecen ser funcionalmente diferentes a las que recubren vasos más grandes, como las venas centrales o interlobulares, contienen fenestraciones dispuestas en grupos y existe una comunicación abierta entre la luz sinusoidal y el espacio de Disse para que los solutos y algunas partículas puedan intercambiarse libremente entre la sangre y la linfa, entre estos dos compartimentos<sup>10</sup>. Otro tipo celular son las células asesinas naturales (natural killer), las cuales poseen morfología de linfocitos granulares, caracterizados por la presencia de gránulos citoplasmáticos azurofílicos, densos a los electrones y vesículas típicas con núcleo de barra, se considera que pueden inducir citólisis y apoptosis en ciertas poblaciones celulares<sup>11,12</sup>.

Las fibras de tejido conectivo y los espacios amplios (espacios de Mall) que contienen líquido tisular, rodean los componentes arterial y venoso en las zonas portales. Las células de los conductos biliares comienzan en el epitelio ductal de transición que recubre la porción terminal de los canalículos biliares a medida que se unen a los radicales más finos del sistema de los conductos biliares en los llamados canales de Herring (uniones ductulares canaliculares). Los hepatocitos tienen una estructura bastante uniforme y poseen una considerable heterogeneidad funcional dentro del lobulillo hepático. En general, el metabolismo de la energía oxidativa, la  $\beta$ -oxidación, el catabolismo de los aminoácidos, la ureagénesis de los aminoácidos, la gluconeogénesis, la secreción de bilis y bilirrubina se encuentran



preferentemente en la zona periportal (zona III), mientras que la glucólisis, la liponeogénesis y la ureagénesis del amoníaco aparecen predominantemente en las zonas perivenosas o centrilobulillaares (zona I)<sup>13,14</sup>.



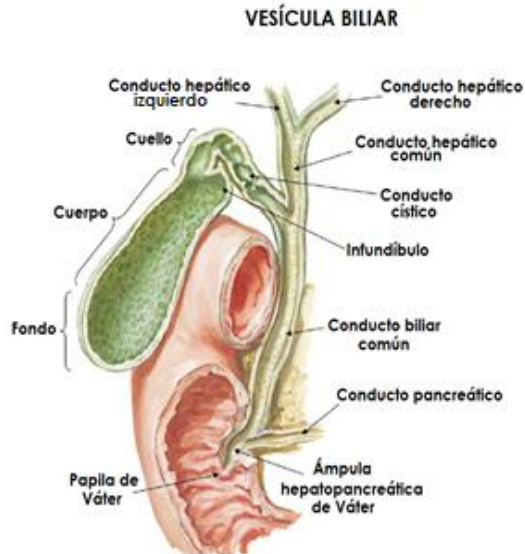
**FIGURA 3. ORGANIZACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO** Se esquematiza la estructura del lobulillo hepático, donde los hepatocitos de la zona 1 (periportal) son aquellos que se dividen durante el primer pico de síntesis de ADN, mientras que los hepatocitos de la zona 2 comprenden los picos segundo y tercero de proliferación hepática. También se esquematizan algunos factores hematógenos y de crecimiento e interacciones intercelulares durante la regeneración hepática, que representan señales entre hepatocitos, células de Kupffer, células T, células estelares, células endoteliales sinusoidales hepáticas y plaquetas<sup>5</sup>.

Tomado de: Fausto, N. et al., Liver regeneration. Hepatology, 2006

Los hepatocitos periportales están dotados de propiedades protectoras contra productos reactivos, tales como radicales anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, que se demuestra por la presencia de abundante glutatión y glutatión peroxidasa en las zonas periportales. Por el contrario, la biotransformación de sustancias extrañas ya sea por oxidación, reducción, hidrólisis o conjugación, parece estar ubicadas preferentemente en los hepatocitos perivenosos. Esta heterogeneidad zonal no es un proceso estático, es un proceso dinámico que responde a las demandas del organismo, como condiciones ambientales, estados fisiológicos o patológicos<sup>15,16</sup>.

El hígado representa el principal órgano de biotransformación y la oxidación hepática es un importante proceso de metabolización de fármacos llevado a cabo por el sistema de mono-oxigenasa del citocromo P450. La superfamilia de citocromo P450 (CYP) de mamíferos codifica enzimas involucradas en una variedad de funciones de biotransformación. Estas funciones abarcan la transformación de diferentes xenobióticos, el metabolismo del ácido araquidónico y la biosíntesis de eicosanoides, colesterol, esteroides y ácidos biliares (AB's), síntesis de esteroides y vitamina D3 y catabolismo, hidroxilación del ácido retinoico, así como el metabolismo de la amina biogénica y la neuroamina. Las mutaciones en muchos genes CYP causan errores innatos del metabolismo y hay citocromos huérfanos con una función aún desconocida<sup>17</sup>.

### 3.2 Vesícula biliar



**FIGURA 4. ANATOMÍA DE LA VESÍCULA BILIAR.** © ELSEVIER. INC.

La vesícula biliar es un órgano con forma de pera ubicado en el cuadrante superior derecho del abdomen, mide aproximadamente de 7 a 10 cm de largo y 4 cm de ancho. Anatómicamente, la vesícula biliar se encuentra en la porción anterior en la superficie inferior de los segmentos hepáticos IV y V. La vesícula biliar tiene una superficie peritoneal inferior y una superficie

hepática superior. No tiene cápsula, sin embargo, algunos autores describen una extensión de la cápsula hepática (cápsula de Glisson) que cubre la superficie expuesta del cuerpo de la vesícula biliar. El fondo de la vesícula biliar es ancho y a medida que continúa hacia el cuerpo principal, se estrecha en diámetro. El cuerpo de la vesícula se estrecha en el infundíbulo, que luego se conecta al cuello y al conducto cístico (**Figura 4**). En la porción distal de la vesícula biliar y dentro del conducto quístico se encuentran las válvulas espirales de Heister. Estas válvulas pueden ser responsables de ayudar al vaciado de la vesícula biliar con estimulación neural y hormonal. En la mayoría de las personas, existe una bolsa inferior del infundíbulo de la vesícula biliar o el cuello llamada bolsa de Hartmann<sup>18</sup>.

La vesícula biliar almacena y concentra la bilis entre comidas. La función motora de la vesícula biliar está regulada por los AB's a través del Receptor de ácidos biliares de membrana (TGR5), y por señales neurohormonales vinculadas a la digestión, por ejemplo,

colecistoquinina y hormonas intestinales FGF15/19, que desencadenan el vaciado y el relleno de la vesícula biliar, respectivamente. En condiciones fisiológicas, la vesícula biliar controla el flujo de la bilis secretada por el hígado, su paso hacia el intestino y, por tanto, gran parte de la circulación enterohepática; también contribuye en gran medida a la regulación de la composición de la bilis mediante sus capacidades únicas de absorción y secreción. El epitelio de la vesícula biliar secreta bicarbonato y mucinas, que le proporcionan citoprotección contra los AB's. La secreción de mucina en la vesícula biliar es estimulada predominantemente por vías dependientes de calcio que son activadas por el ATP presente en la bilis y los AB's<sup>19</sup>. Se ha estimado que hasta el 80% o más de la secreción biliar es racionado entre la vesícula biliar y del esfínter de Oddi<sup>20</sup>. Durante el período interdigestivo, el gradiente de presión favorece la entrada de bilis en la vesícula biliar y el 90% de la bilis hepática se desvía hacia la vesícula donde se almacena y concentra<sup>21</sup>.

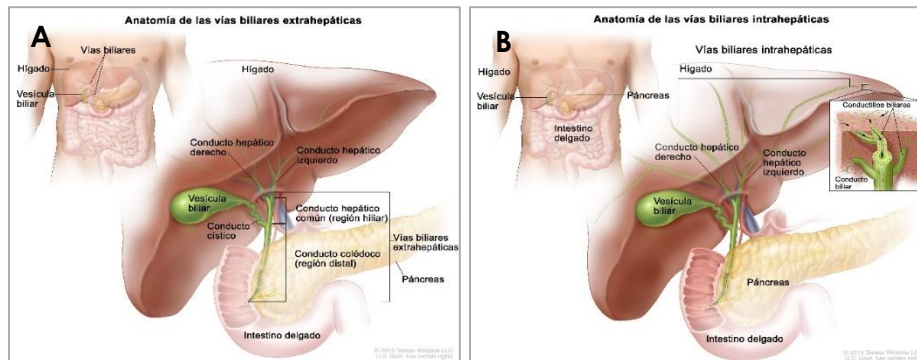
El hígado humano produce al menos 1000 ml de bilis por día a tasas que varían entre 0.5 y 1 ml/min durante el ayuno, y entre 2 y 3 ml/min después de la alimentación<sup>22</sup>. Si la bilis se desvía hacia la vesícula biliar o el duodeno depende de la resistencia al flujo, determinada principalmente por el estado contráctil de la vesícula biliar y del esfínter de Oddi<sup>20</sup>. Durante el período interdigestivo, el gradiente de presión favorece la entrada de bilis en la vesícula biliar y el 90% de la bilis hepática se desvía hacia la vesícula donde se almacena y concentra<sup>21</sup>. Una pequeña cantidad (10%) de bilis fluye hacia el duodeno como resultado de las contracciones del esfínter de Oddi y los incrementos de la presión intragástrica. Presumiblemente, esto ayuda a mantener la circulación enterohepática de los AB's en el período interdigestivo. A medida que la vesícula biliar acomoda el

llenado, se producen cambios significativos en el volumen con pocos cambios en la presión intraluminal<sup>23</sup>.

El epitelio de la vesícula biliar tiene la capacidad de absorber el colesterol y proporciona una vía de derivación colecisto-hepática para los AB's. Los cambios en la función motora de la vesícula biliar no solo pueden contribuir a la enfermedad de cálculos biliares, sino que también preservan las funciones protectoras en múltiples entornos patológicos a través del secuestro y cambios en la composición de los AB's. La colecistectomía aumenta las tasas de recirculación enterohepática de los AB's, lo que conduce a efectos metabólicos y a un mayor riesgo de enfermedad del hígado graso no alcohólico, cirrosis y carcinoide del intestino delgado, independientemente de la colelitiasis. Entre los cánceres asociados a cálculos biliares, la colecistectomía parece aumentar el riesgo de cáncer de la ámpula de Váter, pero reduce el riesgo de carcinomas hepatocelulares, colangiocelulares y de carcinoma de vesícula biliar. Por otro lado, un estudio reciente demostró que menos del 20% de sujetos con cálculos biliares descubiertos accidentalmente desarrollaron eventos clínicos, después de una mediana de seguimiento de 17.4 años, mientras que ningún participante en el estudio desarrolló cáncer de vesícula biliar<sup>24</sup>. Por tanto, entre los sujetos con cálculos biliares, la colecistectomía sigue siendo una prioridad en aquellos que actualmente se consideran en riesgo de cáncer de vesícula biliar<sup>25</sup>.

### 3.3 Sistema biliar

El sistema biliar está formado por una red de conductos que transportan la bilis desde el hígado hasta el intestino delgado y se clasifican según su ubicación anatómica (**Figura 5**). El hígado produce la bilis, la cual es importante para la digestión de las grasas entre otras funciones de las que hablaremos a continuación.



**FIGURA 5. ANATOMÍA DE LAS VÍAS BILIARES. A. vías biliares extrahepáticas B. intrahepáticas.** Los conductos biliares que están dentro del hígado se llaman vías biliares intrahepáticas y los que están por fuera conectándose a otras estructuras son denominados extrahepáticos. Se observa el hígado, el conducto hepático común, el conducto cístico, el conducto colédoco, el páncreas y el intestino delgado. En el recuadro se observa el hígado, los conductos biliares, la vesícula biliar, el páncreas y el intestino delgado.

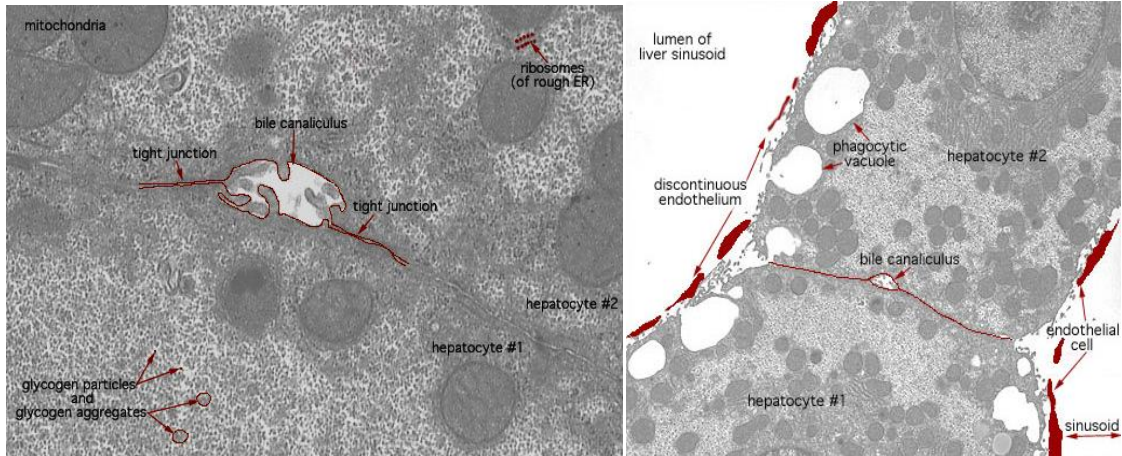
Tomado de: Winslow T. LLC. National Cancer Institute ©, 2015.

<https://www.cancer.gov/espanol/tipos/higado/pro/tratamiento-vias-biliares-pdq>

Las vías biliares extrahepáticas comprenden la parte de los conductos hepáticos derecho e izquierdo que está fuera del hígado, el conducto hepático común y el conducto colédoco. Las vías biliares extrahepáticas se subdividen en región perihiliar (hilio) y región distal. El hilio es la región donde los conductos hepáticos derecho e izquierdo salen del hígado y se unen para formar el conducto hepático común que es proximal al origen del conducto cístico (**Figura 5b**) y la región extrahepática distal es la región que incluye el colédoco que desemboca en el intestino delgado<sup>1</sup>.

### 3.4 Estructura del árbol biliar

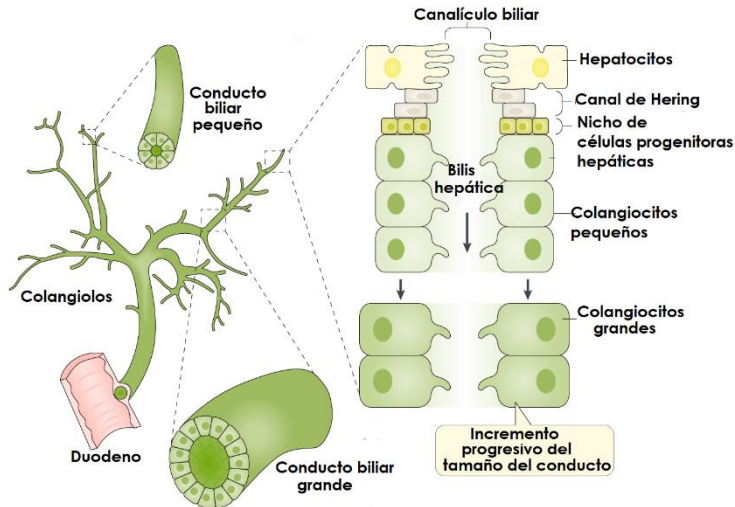
El árbol biliar en mamíferos se caracteriza por una red de canalículos biliares, los cuales están formados por los dominios luminales de hepatocitos adyacentes<sup>1</sup>. **(Figura 6)**



**FIGURA 6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DEL CANALÍCULO BILIAR. A)** Se observa la formación del canalículo biliar entre dos células adyacentes y al término de éste, las células se unen a través de uniones estrechas "tight junctions". **B)** se aprecia la formación de canalículo biliar entre dos células vecinas y la continuación de unión por medio de uniones estrechas, mientras que por el dominio apical se observan las células endoteliales que delimitan el sinusoid.

Tomado de: Histology learning system. <http://www.bu.edu/histology/p/22101lba.htm>

A su vez, los canalículos biliares, se conectan a los conductos biliares ubicados en la tríada portal que también abarca la arteria hepática y la vena portal. Los conductos biliares están formados por células epiteliales biliares cilíndricas o columnares. Los conductos de Hering o colangiolos son canales de conexión delgados situados entre el sistema de conductos y los canalículos biliares, formados en parte por colangiolos y en parte por hepatocitos<sup>1</sup> **(Figura 7)**.



**FIGURA 7. FORMACIÓN DE BILIS DUCTAL.** La bilis producida por los hepatocitos (bilis primaria o hepática) se secreta a los conductos biliares. Los canales de Hering proporcionan la continuidad entre el canalículo de los hepatocitos y los conductos colangiolo, los conductos biliares pequeños y los conductos biliares grandes en los que la bilis hepática se modifica para convertirse en bilis ductal. También se cree que un nicho de células progenitoras hepáticas reside en la interfaz de las células que recubren los canales de Hering y la placa de hepatocitos. El transporte epitelial biliar activo de electrolitos y solutos ocurre en los conductos biliares pequeños y grandes y determina el movimiento vectorial del agua (es decir, absorción o secreción) a través de los colangiocitos, alterando así la composición y el flujo de la bilis ductal. Tomado de: Banales J.M. Cholangiocyte Pathobiology. Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol. 2019<sup>26</sup>.

Se ha observado específicamente en las ratas, las cuales no poseen una vesícula biliar, que tienen un plexo biliar periportal complejo que no se encuentra en otras especies y que puede influir en el flujo biliar. Aunque se desconoce la función precisa de este plexo, puede modificar la bilis canalicular por secuestro y reabsorción de agua y electrolitos, también puede almacenar y concentrar bilis o actuar como un sistema de recolección. Los estudios comparativos han demostrado que los humanos y los monos *rhesus*, pero no los perros, conejos y cobayos, poseen ramas laterales o bolsas biliares periportales irregulares menos complejas que surgen de los conductos biliares intrahepáticos y que también pueden almacenar o modificar la bilis<sup>1-3,18,24-26</sup>.



### 3.5 Secreción biliar

La bilis es un fluido de secreción y excreción, sintetizada exclusivamente por los hepatocitos y la vesícula biliar, es el reservorio entre el hígado y el intestino delgado, en la cual la bilis es almacenada, concentrada y posteriormente excretada durante la digestión, subsecuentemente modificada tras su paso por el intestino, por las propiedades de absorción y secreción del conducto biliar epitelial. La unidad biliar hepática secretoria consiste en una red canalicular que está formada por las membranas apicales de hepatocitos adyacentes y sellada por uniones estrechas<sup>27,28</sup> (**Figura 6**).

La bilis está compuesta en 95% de agua en la cual, componentes inorgánicos y orgánicos sólidos están disueltos, incluyendo sales biliares, bilirrubina, pigmentos biliares, fosfolípidos, colesterol, aminoácidos, enzimas esteroideas, porfirinas, vitaminas y metales pesados, así como drogas exógenas, xenobióticos y toxinas del medio ambiente<sup>1,28</sup>; sin embargo varios factores como la dieta y el género afectan la composición de la bilis<sup>29</sup>.

La bilis es una sustancia muy compleja, por varios motivos, uno de ellos es que, proviene de dos fuentes. La primera, es la síntesis directa de los hepatocitos pericentrales que dan origen a los AB's primarios; la segunda entrada consiste en la transformación de los ácidos primarios al ser oxidados por las enzimas bacterianas, tras su paso por el intestino, los cuales son denominados AB's secundarios. Éstos son absorbidos en el colon y vuelven a recircular junto con los AB's primarios, por tanto, la bilis es una mezcla de ambas. Todos los AB's, tanto primarios como secundarios están conjugados con glicina o taurina, esta conjugación incrementa su solubilidad acuosa a pH ácido e incrementa la resistencia a la precipitación por el  $\text{Ca}^{+2}$  y hace que los AB's sean

impermeables a las membranas celulares<sup>27,30</sup>. Un segundo motivo que permite comprender la complejidad de esta sustancia es que hay muchas proteínas presentes en la bilis (concentraciones muy altas de sustancias interferentes, particularmente lípidos y sales biliares); sin embargo, a pesar de la inaccesibilidad de la bilis el análisis proteómico ha permitido identificar más de 2500 proteínas individuales en la bilis humana normal<sup>31,32</sup>. Los resultados de este análisis sugieren que la mayoría de las proteínas en la bilis provienen del plasma, y se ha comprobado al observar la escasez relativa de proteínas en la bilis proveniente del hígado de rata perfundido. La transferencia de sangre a bilis ocurre por difusión simple a través de la vía paracelular de uniones estrechas semipermeables. La bilis contiene sustancias que no pueden ser eliminadas de manera eficiente por la orina porque son insolubles o están unidas a proteínas, no solo incluye AB's, bilirrubina (producto final del metabolismo de la hemoglobina) colesterol, metales pesados como hierro y cobre (derivados de una ingesta superior a la necesaria)<sup>27</sup>.

La secreción biliar, adicional a su rol principal en la solubilización y facilitamiento de la absorción de grasas, provee una ruta de excreción para los lípidos esteroideos y metabolitos de fármacos. La bilis tiene altas concentraciones de fosfolípidos, en su mayor parte fosfatidilcolina, la cual forma micelas mixtas con los AB's, estas micelas contienen microdominios anfipáticos que pueden solubilizar el colesterol. La formación de micelas disminuye la actividad de los AB's evitando que estos destruyan la membrana apical de las células del epitelio biliar, también contiene tocoferol, que previene el daño oxidativo al epitelio biliar e intestinal, aunado a esto, la inmunoglobulina IgA es secretada en la bilis y en el moco, donde su rol es prevenir la adhesión y crecimiento bacteriano<sup>27</sup>. En la **tabla 1** se resumen algunas funciones principales descritas para la bilis.

<b>FUNCIONES CONOCIDAS DE LOS ÁCIDOS BILIARES</b>	
<b>Todo el organismo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminación del colesterol</li> </ul>
<b>Hepatocito</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inserción del canalículo biliar y transportadores de fosfolípidos</li> <li>• Inducción del flujo y secreción biliares lipídica</li> <li>• Promoción de la mitosis durante la regeneración hepática</li> <li>• Regulación de la expresión génica vía receptores nucleares</li> </ul>
<b>Tracto biliar</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lumen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilización del colesterol</li> <li>• Trampa micelar de xenobióticos oleofílicos</li> <li>• Efectos antimicrobianos</li> </ul> </li> <li>• Colangiocitos</li> <li>• Estimulación de la secreción de bicarbonato vía CFT Y AE2</li> <li>• Promoción de la proliferación cuando hay obstrucción de conducto biliar</li> </ul>
<b>Intestino delgado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lumen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solubilización de lípidos de la dieta, especialmente vitaminas solubles en grasas</li> <li>• Solubilización de drogas lipofílicas</li> <li>• Efectos antimicrobianos</li> </ul> </li> </ul>
<b>Enterocitos ileales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulación de la expresión de genes vía receptores nucleares</li> <li>• Secreción de factores antimicrobianos (mediado por FXR)</li> <li>• Secreción de FG-19, un péptido regulador de la biosíntesis de ácidos biliares</li> </ul>
<b>Intestino grueso</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enterocitos colónicos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulación de la absorción y secreción de electrolitos</li> <li>• Musculo liso</li> <li>• Promoción de la motilidad propulsiva</li> </ul> </li> <li>• Tejido adiposo café <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación de la termogénesis por la hormona tiroidea</li> </ul> </li> </ul>

**TABLA 1. FUNCIONES CONOCIDAS DE LOS ÁCIDOS BILIARES** [33] Hoffman F. A. *Biliary secretion and excretion in health and disease: Current concepts. Annals of Hepatology, 2007.*

La secreción biliar normal está altamente polarizada dentro del hepatocito y se dirige hacia la membrana canalicular. Las uniones estrechas representan la única barrera anatómica entre la sangre y la bilis delimitando el límite del canaliculo. Los microfilamentos de actina del citoesqueleto son importantes para el mantenimiento de la integridad y la orientación de la membrana celular y los complejos de unión del canaliculo. La mayoría de las sustancias endógenas y exógenas secretadas en la bilis son absorbidas por los hepatocitos a través del dominio sinusoidal (basolateral), transportados por el hepatocito hasta el polo canalicular para secretarse en la bilis a través de la membrana canalicular. Los AB's son producidos y secretados por el hígado y liberados en el intestino, más del 90% de éstos se reabsorben en el íleon y el hígado elimina la mayor parte durante un pasaje. Los procesos de transporte hepático dependen de una acción coordinada de varias proteínas transportadoras en los dominios sinusoidal y canalicular del hepatocito<sup>34,35</sup>.

La membrana sinusoidal hepática contiene el polipéptido transportador de aniones orgánicos multiespecíficos (OATP) que transporta aniones orgánicos y compuestos anfipáticos, incluidos los cationes orgánicos. El transportador de cationes orgánicos (OCT-1) es más específico para los cationes orgánicos pequeños. El transportador polipéptido de sodio-taurocolato (NTCP) es una proteína transportadora que media la absorción de AB's, probablemente lleva a cabo la mayor parte de la absorción de AB's conjugados. Los procesos de transporte canalicular pueden transportar sustancias a la bilis contra gradientes de concentración pronunciados. Se han identificado varios procesos de transporte dependientes de ATP que están mediados por las proteínas llamadas "casete de unión a ATP" (ABC), entre otros transportadores de los cuales hablaremos con más

detenimiento más adelante. Otro proceso que contribuye a la secreción biliar es el llamado flujo biliar independiente del ácido biliar como resultado de la secreción de iones orgánicos y glutatión en la bilis. Las células ductulares biliares también contribuyen activamente a la secreción de bilis, principalmente por la secreción de un fluido rico en bicarbonato; esto está bajo control hormonal. Se ha sugerido que, en la lesión colestásica debida a fármacos, hormonas, citocinas u obstrucción biliar, puede provocar una expresión y función alteradas de estos sistemas de captación y excreción, que a su vez pueden contribuir a la colestasis y la ictericia. Por el contrario, el reclutamiento de bombas de eflujo alternativas y la inducción de enzimas desintoxicantes de fase I y II pueden limitar la acumulación hepática de constituyentes biliares tóxicos en la colestasis al proporcionar rutas metabólicas y de escape alternativas. También existe un gradiente lobular en el que los hepatocitos periportales normalmente eliminan la mayoría de los aniones de AB's de la sangre sinusoidal, de modo que los hepatocitos centrolobulillares estén expuestos a concentraciones más bajas de AB's, puesto que ellos son los que los sintetizan activamente. Estos factores pueden ser en parte responsables de la colestasis centrolobulillar intracanalicular, que sigue a una lesión inducida por fármacos<sup>36</sup>.

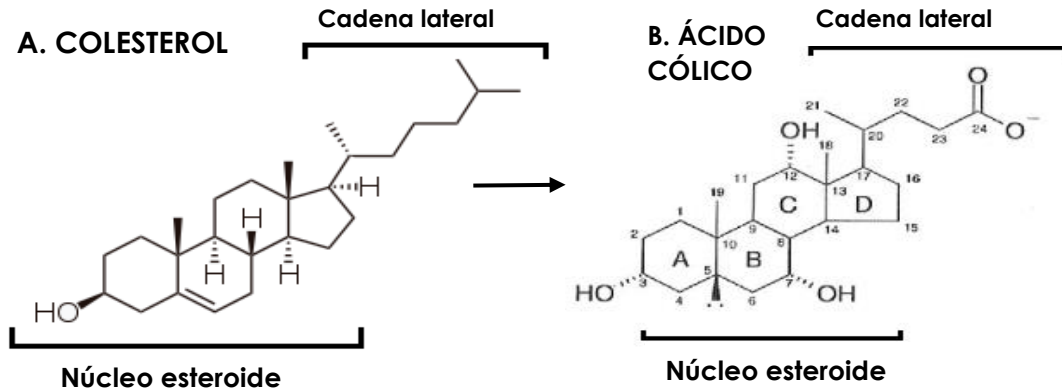
### **3.6 Ácidos biliares (AB's)**

Los ácidos biliares (AB's) incluyen un grupo de especies moleculares con estructuras químicas similares, que exhiben diversas propiedades físicas y características biológicas completamente distintas<sup>37</sup>, su función principal es ayudar a la solubilización y digestión de xenobióticos lipofílicos, vitaminas liposolubles, ácidos grasos y monoglicéridos, así como regular su propia síntesis a través de mecanismos de

retroalimentación<sup>38</sup> y con la conversión de colesterol en AB's proporcionan una vía crítica para mantener la homeostasis del colesterol y prevenir su acumulación, la de triglicéridos y metabolitos tóxicos y evitar lesiones en el hígado y otros órganos<sup>39</sup>. Sin embargo también han sido implicados en varias enfermedades como la colestasis, cánceres hepáticos e intestinales, cirrosis hepática y diabetes mellitus<sup>38,40</sup>.

Junto con el colesterol, los fosfolípidos y la bilirrubina, los AB's son el componente principal de la bilis. En el tracto digestivo durante la ingestión de alimentos garantizan la solubilización de la grasa y la emulsión, por lo tanto promueven la digestión, una propiedad que se debe principalmente a su naturaleza anfipática<sup>41</sup> que se debe a la existencia de un lado hidrofílico (cara  $\alpha$ , lado inferior cóncavo) y un lado hidrófobo (cara  $\beta$ , lado convexo superior)<sup>37</sup>. Los grupos hidroxilo, orientados hacia el lado  $\alpha$  y la cadena lateral carboxílica les confieren su carácter hidrofílico. Los grupos metilo hidrófobos (en C-18 y C-19) están orientados hacia el lado  $\beta$ <sup>27</sup>.

Las sales biliares tienen una estructura molecular única, son derivados de un sistema hidrocarburo tetracíclico saturado perhidrociclopentanofenantreno también conocido como núcleo esteroide, el cual consta de tres anillos de seis miembros (A, B y C) y un anillo de cinco miembros (D), con una estructura curva (pico) o plana (dependiendo de una configuración fusionada en *cis* o *trans* entre los anillos A y B) como se ilustra en la **figura 8**.



**FIGURA 8. TRANSFORMACIÓN DE LA MOLÉCULA DEL COLESTEROL.** Diferencias entre las estructuras de (A) la molécula de colesterol (precursora de los AB's) y del colato (ácido cólico) (B) uno de los AB's primarios más abundantes en humanos, en donde se observa la adición de grupos hidroxilo en la estructura esteroide mientras que en la cadena lateral se observa una escisión y oxidación cuyo producto es un ácido carboxílico.

En mamíferos, el núcleo es casi invariablemente  $5\beta$  (unión A/B en configuración *cis*), mientras que, en vertebrados inferiores, algunos AB's, conocidos como "allo-ácidos biliares", exhiben una fusión tipo *trans* A/B. Las moléculas de un ácido biliar miden aproximadamente 20 Å de largo, con un radio promedio de aproximadamente 3.5 Å<sup>37</sup>.

Los AB's son moléculas solubles y anfipáticas sintetizadas a partir de colesterol insoluble, los cuatro anillos esteroides forman una red hidrocarbonada con una cara hidrófoba convexa y una cara hidrófila cóncava que contiene grupos hidroxilo y una cadena lateral corta de 5 carbonos ácidos (**Figura 8B**) que posteriormente se amida con taurina o glicina. Esta estructura anfipática confiere a los AB's las propiedades detergentes que permiten la formación de micelas y facilitan la digestión y absorción de los lípidos de la dieta y las vitaminas liposolubles A, D, E y K del intestino delgado<sup>42</sup>.

En humanos, el grupo de AB's consiste en CA, CDCA y DCA en una proporción aproximada de 40: 40: 20, con una masa de alrededor de 2.5-3 g. Después de llegar al intestino delgado, aproximadamente el

95% de los AB's se reabsorben y solo el 5% se pierde en las heces. La pérdida diaria de AB's se compensa con la síntesis *de novo* en el hígado lo que permite mantener una cantidad constante de ellos<sup>43</sup>.

La actividad biológica de los AB's está vinculada a sus propiedades químicas, como el número y la orientación de los grupos hidroxilo o su conjugación, por lo tanto, estos parámetros afectan directamente su hidrofobicidad: la cual se considera un predictor de toxicidad y litogenicidad. El índice hidrofílico de los AB's no sólo es proporcional al número de grupos hidroxilo, sino que también está influenciado por su posición en ambos lados del anillo de esteroides. Los AB's con grupos hidroxilo en ambos lados del anillo de colesterol (orientación  $\alpha$  y  $\beta$ ) son más hidrófilos que sus contrapartes con el mismo número de grupos hidroxilo en la orientación  $\alpha$ . Los AB's hidrófilos menos tóxicos promueven el flujo de bilis, por lo tanto, durante mucho tiempo, estos AB's hidrófilos, especialmente el ácido ursodesoxicólico (UDCA), ha sido utilizado en la terapia para disolver los cálculos biliares de colesterol, una mayor proporción de AB's hidrófilos también afecta la formación de micelas y la absorción de lípidos intestinales<sup>44,45</sup>. Además, el índice hidrofílico de la reserva de AB's también influye en la señalización celular dependiente del ácido biliar, modulando la interacción de los AB's con sus receptores. Además del número y la orientación de los grupos hidroxilo, la conjugación es una forma importante de modular las propiedades biológicas de los AB's, ya que se sabe que la conjugación reduce el pKa de los AB's. Los AB's no conjugados tienen un pKa de 5. Después de la conjugación, principalmente con glicina o taurina y pH fisiológico, los AB's se encuentran presentes en forma de sal, lo que aumenta su solubilidad y los hace más anfipáticos, lo que posteriormente mejorará la formación de micelas mixtas y por ende la absorción intestinal de compuestos lipofílicos<sup>45,46</sup>. Un ejemplo es el



ácido cólico, en el que los tres grupos hidroxilo y el grupo carboxilo se enfrentan a un lado del esqueleto de carbono formando una cara hidrófila que se opone a la cara altamente hidrófoba **(figura 8B)**<sup>46</sup>.

La proporción de CA a CDCA en la bilis determina la hidrofobicidad del conjunto general de AB's en humanos y puede afectar la solubilidad del colesterol biliar en la bilis<sup>47</sup>.

### **1.6.1 Síntesis de ácidos biliares**

En el hígado humano, los AB's son sintetizados por los hepatocitos pericentrales a partir del colesterol<sup>27</sup> (en humanos 500 mg de colesterol son convertidos diariamente en AB's)<sup>41</sup> y la misma cantidad es excretada en las heces. La síntesis hepática de AB's es un componente principal del recambio de colesterol en humanos y otros mamíferos, y se requiere una síntesis de 0.5-1.0 g de colesterol/día en humanos adultos sanos<sup>48,49</sup>.

La conversión del colesterol en AB's es un proceso multienzimático<sup>27</sup> que involucra algunas enzimas del citocromo p450 (CYP), participan alrededor de 17 enzimas diferentes ubicadas en citosol, retículo endoplásmico, mitocondrias y peroxisomas<sup>39,50</sup>. En mamíferos, todos los AB's son ácidos biliares C24-5β (ácido colanólico). Las reacciones que conducen a la síntesis de los AB's, de manera resumida incluyen: el inicio de la síntesis por 7-hidroxilación de precursores de esteroides, modificaciones a las estructuras del anillo, oxidación y acortamiento de la cadena lateral y posteriormente, conjugación del ácido biliar con un aminoácido<sup>50</sup> **(Figura 8)**.

En la vía clásica, el colesterol se convierte en 7-hidroxicolesterol por la colesterol 7α-hidroxilasa (una enzima microsomal del citocromo P450, CYP7A1) expresada solo en el hígado, seis miembros de la superfamilia

P450 participan en la síntesis de AB's<sup>50</sup>, mientras que las vías alternas permiten la hidroxilación del colesterol en tres posiciones diferentes en la cadena lateral que produce 24-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol, estos oxisteroles podrían servir como sustratos para la síntesis de AB's. El 27-hidroxicolesterol es el oxisterol más abundante en el plasma del ratón<sup>51</sup> y humano<sup>52</sup>, es sintetizado por la enzima estero 2-hidroxilasa una enzima mitocondrial del citocromo P450 (CYP27A1), esta enzima también puede hidroxilar el colesterol en los carbonos 24 y 25 para formar 24-hidroxicolesterol y 25-hidroxicolesterol, respectivamente. A diferencia de las enzimas 24-hidroxilasa y 25-hidroxilasa, que contribuyen sólo a la síntesis de AB's en ratones, aproximadamente el 25% del conjunto de AB's se origina en oxisteroles producidos por la estero 27-hidroxilasa. Más tarde, estos oxisteroles intermediarios deben someterse a 7-hidroxilación, donde dos enzimas microsomales del citocromo P450 catalizan este paso: CYP39A1, la oxisterol 7-hidroxilasa actúa sobre el 24 (S)-hidroxicolesterol, mientras que la conversión de 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol en AB's intermedios es catalizada por el CYP7B1 oxisterol 7 $\alpha$ -hidroxilasa. Estos intermedios de AB's se modificarán en el anillo de esteroides para convertirse en sus formas 3-oxo y  $\Delta$ 4, mediante la oxidoreductasa esteroidea 3 $\beta$ -hidroxi- $\Delta$ 5-C27 microsómica (C27-3 $\beta$ -HSD), en una serie de reacciones complejas; esta enzima cataliza la isomerización del doble enlace de la posición 5 a la 4 y la oxidación del 3 $\beta$ -hidroxilo a un grupo 3-oxo, los productos resultantes toman una de dos rutas en las etapas posteriores de la síntesis de los AB's<sup>50,51</sup>.

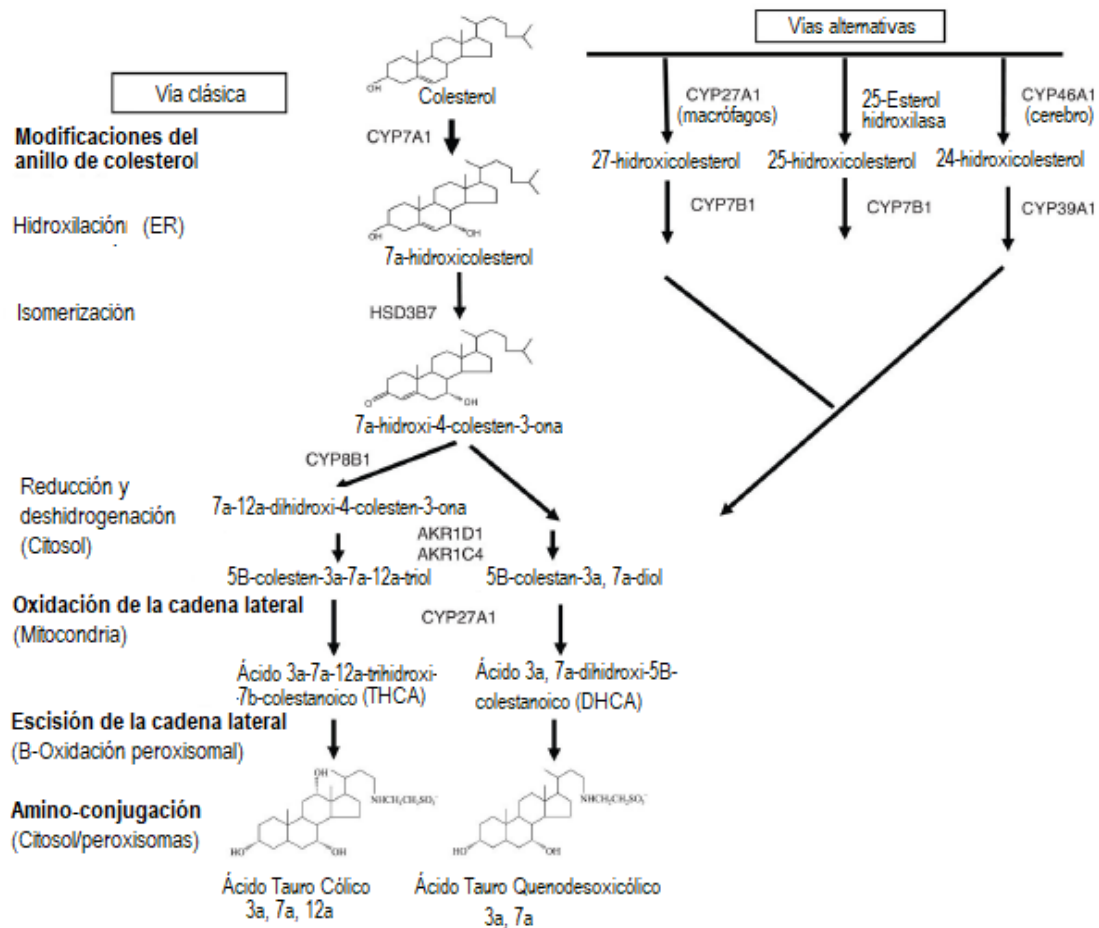
Si sobre el intermedio actúa la enzima estero 12 $\alpha$ -hidroxilasa, un citocromo microsómico P450 (CYP8B1), el producto resultante se convertirá finalmente en ácido cólico. En ausencia de 12 $\alpha$ -hidroxilación, se convertirá en ácido quenodesoxicólico u otro ácido

biliar. Posteriormente, los intermedios 12 $\alpha$ -hidroxilados, y los producidos por la enzima C27-3 $\beta$ -HSD que escapan a la 12 $\alpha$ -hidroxilación, están sujetos a la reducción del doble enlace en el anillo A por la enzima  $\Delta^4$ -3-oxosteroide 5 $\beta$ -reductasa, y finalmente, la última modificación del anillo implica la reducción del grupo 3-oxo a un alcohol en la configuración estereoquímica  $\alpha$  y es catalizada por la deshidrogenasa 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide<sup>53</sup>.

A continuación, los productos de modificación del anillo experimentan oxidación progresiva y acortamiento de la cadena lateral de esteroides. Los primeros pasos los realiza la enzima esteroide 27-hidroxilasa (la misma citocromo mitocondrial P450, CYP27A1, que inicia la síntesis de AB's a través de la formación de 27-hidroxicolesterol) que introduce un grupo hidroxilo en el carbono 27 y posteriormente oxida este grupo a un aldehído y luego a un ácido carboxílico. La participación de la esteroide 27-hidroxilasa en los pasos de iniciación y oxidación de la cadena lateral de las rutas biosintéticas, significa que la enzima debe actuar sobre todos los intermediarios, independientemente de su origen, antes de la formación de un ácido biliar. Los intermediarios de AB's oxidados que surgen de la esteroide 27-hidroxilasa salen de las mitocondrias y luego están sujetos a un acortamiento de la cadena lateral. Los tres átomos de carbono terminales se eliminan en los peroxisomas mediante una serie de reacciones análogas a las involucradas en la  $\beta$ -oxidación de los AB's, la primera reacción es catalizada por la coenzima A ligasa del ácido biliar, que activa el esteroide intermedio por conjugación con la coenzima A. Se han identificado dos enzimas con esta actividad, la coenzima A sintetasa de cadena muy larga y su homóloga la acil-coenzima A sintetasa 2 de cadena muy larga<sup>53</sup> la primera se encuentra en el hígado y los riñones, se considera que es en gran parte responsable de la activación de los

intermedios C27 de la biosíntesis de AB's, mientras que la homóloga, acil-coenzima A sintetasa 2 de cadena muy larga está solo en el hígado y está involucrada en la activación de AB's C24 que se desconjugan en el intestino delgado y regresan al hígado a través de la circulación enterohepática<sup>54</sup>.

Después de la activación de intermediarios con coenzima A, por la ligasa de ácido biliar, los isómeros 25 (*R*) se deben convertir en isómeros 25 (*S*) antes de que se puedan llevar a cabo los pasos subsiguientes en el acortamiento de la cadena lateral por la catalización de la 2-metilacilcoenzima A racemasa y los productos resultantes se someten luego a la deshidrogenación catalizada por la enzima acil de cadena ramificada, una enzima peroxisomal que contiene FAD coenzima A oxidasa (ACOX1 y / o ACOX2) para producir derivados 24,25-trans-insaturados. El siguiente paso en la ruta biosintética implica hidratación y oxidación en el enlace  $\Delta$ 24 y es catalizado por la proteína D-bifuncional, que lleva a cabo una etapa de hidratación en la que se agrega una molécula de agua a través del doble enlace para formar un intermedio de alcohol C24 y la posterior oxidación del alcohol para formar el producto C24-oxo. El último paso en la oxidación de la cadena lateral de los intermedios de AB's es catalizado por la tiolasa 2 peroxisomal, que escinde el enlace C24-C25 para formar propionil-coenzima A y un intermediario de ácido biliar C24-coenzima A<sup>39,51-53</sup>.



**FIGURA 8. VÍAS DE SÍNTESIS DE ÁCIDOS BILIARES (RESUMEN)** Se muestran las dos principales vías de síntesis: la neutral o clásica y la alternativa<sup>39</sup>. John Y.L. Chiang, *Compr physiol.* 2013

### 1.6.2 Conjugación de los ácidos biliares

El paso final en la síntesis de AB's implica la adición de un aminoácido, generalmente glicina o taurina, en el enlace amida al carbono<sup>54</sup>. La reacción es catalizada por la coenzima A del ácido biliar: la enzima aminoácido N-aciltransferasa, sus sustratos son AB's tioéster coenzima A y taurina (ratones<sup>55</sup>) o glicina y taurina (humanos<sup>55</sup>). En este punto, los AB's están casi completamente conjugado con taurina, en el caso de los murinos y en humanos con glicina, independientemente de la dieta. Típicamente, la proporción de glicina:taurina en humanos es de 3:1<sup>56</sup>.

La conjugación de AB's aumenta la anfipaticidad y mejora la solubilidad de las moléculas, lo que los hace impermeables a las membranas celulares. El oxígeno en el grupo sulfónico de la taurina (del ácido taurocólico) y el carbono terminal del ácido glicocólico se ionizan a pH fisiológico, lo que junto con la estructura plana del ácido biliar y los grupos hidroxilo en los anillos produce la sal biliar, la cual es muy anfipática. La conjugación de ácido cólico con glicina reduce el pK de 6.4 a 4.4, asegurando que el ácido biliar esté completamente ionizado y sea altamente soluble. Todos los AB's, ya sean primarios o secundarios, que se secretan en la bilis se conjugan con glicina o taurina. Dicha conjugación aumenta la solubilidad acuosa a pH ácido, aumenta la resistencia a la precipitación por  $Ca^{2+}$  y hace que los AB's sean impermeables a las membranas celulares<sup>27</sup>.

Los AB's no conjugados son generalmente más hidrófobos que las formas conjugadas correspondientes. Actualmente, se ha demostrado que las concentraciones crecientes de AB's solubilizan las membranas y causan la disociación de las proteínas integrales de la membrana<sup>57,58</sup> resultando en una fuga de contenido intracelular<sup>59,60</sup> incluso a concentraciones sub-micelares, las sales biliares pueden alterar la composición lipídica de la membrana<sup>61</sup>.

## **1.7 Transporte de ácidos biliares**

### **1.7.1 Transporte hepático de los ácidos biliares**

Debido a que los AB's libres y conjugados no pueden cruzar las membranas, existe un sistema de transporte especial para esto, los miembros de la familia de transportadores ABC son necesarios para mover los AB's dentro y fuera de la célula<sup>62,63</sup>. Los AB's regresan del

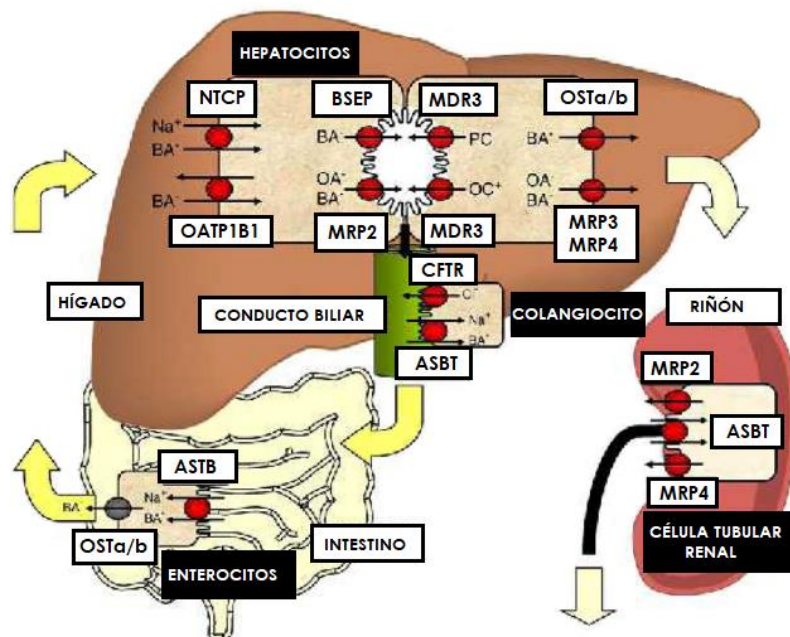
intestino y son eficientemente removidos de la sangre venosa portal por el hepatocito<sup>27</sup>.

La circulación enterohepática involucra el transporte intracelular de las moléculas de AB's, mediado por los transportadores de membrana, flujo interno de los órganos, mediado por la motilidad intestinal y flujo sanguíneo. El transporte membranar vectorial está presente en el hepatocito y en el enterocito ileal y el flujo inter-órgano tiene lugar en la vena porta y la circulación sistémica, el tracto biliar y el intestino delgado<sup>27</sup>. El sistema de transporte incrementa la vida media de los AB's en la circulación enterohepática y protege las células de las propiedades detergentes de estas moléculas<sup>52, 64</sup>.

Los hepatocitos deben transportar continuamente los AB's desde la sangre sinusoidal hacia los canaliculos biliares contra un gradiente de concentración pronunciado para mantener el flujo biliar. El transportador polipéptido de sodio-taurocolato (NTCP)<sup>62,65</sup> acarrea predominantemente las sales biliares en los hepatocitos de manera dependiente del sodio (>80%) y en menor medida, de manera independiente del sodio, mediante el transporte de aniones orgánicos polipéptidos (OATP)<sup>66</sup>, también este transportador es utilizado por AB's no conjugados<sup>67</sup> y luego, tras la conjugación, la bomba de exportación de sales biliares (BSEP) secreta los AB's a través de la membrana plasmática canalicular principalmente, desde donde promueven, junto con la proteína de resistencia a múltiples fármacos 3 (MDR3), la liberación de fosfolípidos de la membrana plasmática canalicular. Los fosfolípidos se forman junto con las micelas de sales biliares, que actúan como un vehículo para el colesterol que ABCG5/G8 exporta al canalículo. Además, la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2) y la proteína de resistencia al cáncer de mama (ABCG2)

median la secreción canalicular de aniones orgánicos y sales biliares divalentes. Los exportadores basolaterales MRP3, MRP4 y los transportadores de solutos orgánicos OST- $\alpha$ /OST- $\beta$  pueden actuar como sistemas de rescate para reducir los niveles citoplasmáticos de compuestos potencialmente hepatotóxicos y otros transportadores como la P-glicoproteína (MDR1) son capaces de transportar AB a través de las membranas canalicular del hígado<sup>68,69</sup> (**Figura 9**).

En roedores MRP3 y MRP4 son regulados de manera positiva lo mismo que el eflujo de AB's conjugados en la vena portal, los cuales son filtrados y excretados por los riñones<sup>70</sup>.



**FIGURA 9. TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS BILIARES EN EL SISTEMA HEPATOBILIAR, INTESTINO Y RIÑÓN.** Los AB's son transportados desde la sangre portal hacia los hepatocitos por NTCP y OATP, posteriormente son expulsados por las membranas canalicular y basolateral a través de BSEP y MRP2. MRP3, MRP4 y OST $\alpha/\beta$ , regresando así a la circulación sistémica. MDR3 por su parte transporta fosfolípidos y MDR1 transporta cationes que incluyen fármacos a través de la membrana apical. La reabsorción de AB's puede ocurrir a nivel del colangiocito, a través de ASBT en el íleon terminal y dentro de los enterocitos, los AB's son emitidos por OST $\alpha/\beta$ . Los AB's también pueden reabsorberse en el túbulo renal proximal a través de ASBT. Los AB's pueden excretarse en la orina a través de MRP2 y MRP4<sup>71</sup>. Tomado de Bhogal H. K. et al., The molecular pathogenesis of cholestasis in sepsis. Front Biosci.2016



### 1.7.2 Transporte intestinal de los ácidos biliares

Los AB's sufren absorción pasiva en el intestino delgado proximal y transporte activo en el íleon terminal<sup>62</sup> el transporte activo ileal representa la mayor parte de la absorción intestinal de AB's y es la ruta exclusiva para los AB's conjugados con taurina. Los ácidos dihidroxi-biliares conjugados y no conjugados con glicina se absorben en el intestino delgado proximal por difusión de especies no cargadas (protonadas) y posiblemente por la absorción mediada por el portador de AB's cargados. Si bien numerosos estudios excluyeron el transporte yeyunal activo, los estudios de absorción *in vivo* e inhibición *cis* mostraron cierta especificidad de absorción de ácido biliar compatible con un portador facilitador<sup>72</sup>.

Debido a sus características anfipáticas, los AB's pueden comportarse como moléculas detergentes, que en muchos casos es la causa principal del daño inducido por los AB's cuando se acumulan en el hígado y otros órganos<sup>73</sup>. Las concentraciones intracelulares elevadas de AB's, como las alcanzadas en la colestasis, se han relacionado con el estrés oxidativo<sup>74</sup> y la apoptosis, tanto en el hígado adulto como en el fetal<sup>75</sup>. Los AB's pueden inducir apoptosis tanto activando directamente el receptor de muerte Fas<sup>76</sup>, como induciendo daño oxidativo que causa disfunción mitocondrial, que a su vez puede desencadenar apoptosis<sup>77,78</sup>. Finalmente, también existe una relación entre AB's y la proliferación celular. Se ha demostrado que algunas especies de AB's modulan la síntesis de ADN durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial en roedores<sup>79,80</sup> y el

proceso regenerativo depende de la señalización de los AB's a través del receptor nuclear FXR<sup>81</sup>.

## **1.8 Transportadores de la familia ABC**

Los miembros de la familia de transportadores de casete de unión a ATP (ABC) son proteínas grandes de membrana que acoplan la energía liberada por la hidrólisis de ATP al transporte activo de un sustrato a través de la membrana. La familia de transportadores ABC está dividida en siete subclases (de la A - G), los miembros de las subfamilias ABCB y ABCC son importantes para la formación de bilis. Los miembros de la subfamilia ABCB que se expresan en el hígado incluyen MDR1 (*ABCB1*), una bomba de salida de compuestos hidrófobos; MDR3 (*ABCB4*), un translocador de fosfatidilcolina; y BSEP (*ABCB11*), la bomba de exportación de sales biliares, estos transportadores están ubicados en la membrana apical de los hepatocitos<sup>82</sup>. La subfamilia ABCC tiene nueve isoformas MRP (*ABCC1-6* y *ABCC10-12*) los cuales se han identificado en humanos y se ha detectado que exhiben una distribución específica de tejido, en humanos, MRP1, MRP2, MRP3 y MRP5 se expresan en diferentes grados en intestino delgado y grueso, sus sustratos incluyen xenobióticos y sustancias químicas lipofílicas endógenas conjugadas con glutatión, glucuronato y sulfato<sup>83</sup>.

En este trabajo evaluamos algunos transportadores de esta familia, los cuales son MDR1 (*ABCB1*), MRP2 (*ABCC2*), MRP3 (*ABCC3*), los cuales permiten el eflujo de los AB's, en ese sentido en los próximos apartados trataremos sobre ellos y su relación con los AB's.

### **1.8.1 PROTEÍNA ASOCIADA A MULTIRRESISTENCIA A DROGAS (MDR1 O ABCB1)**

También conocido como Glicoproteína P, es una bomba de eflujo dependiente de ATP asociada a la membrana celular, reconocida principalmente por transportar fármacos quimioterapéuticos fuera de las células tumorales, se expresa en tejidos normales como el riñón, las glándulas suprarrenales y el hígado<sup>84</sup>.

Se ha observado la pérdida de la función de MDR1 en pacientes con la enfermedad de Crohn, se considera que la regulación positiva de MDR1 compensa la reabsorción de los AB y salvaguarda la homeostasis intestinal. Por otro lado, existe la hipótesis de que los cambios conformacionales en MDR1 de alguna manera producen alteración en la formación de bilis, se desconoce la forma en que sucede este evento, puede ser que MDR1 interactúe con otros componentes de la membrana relacionados con la formación de bilis, como transportadores, canales o alteración de la fluidez de la membrana. Se ha demostrado que MDR1 regula los canales de cloro activados por volumen, MDR1 podría regular los canales de cloro al ser activado por volumen en las membranas canaliculares para influir en el flujo biliar y funcionar como un mediador en la colestasis ayudando a la eliminación de metabolitos tóxicos a través del canalículo<sup>85,86</sup>.

MDR1 y el transportador MRP3 se han encontrado expresados en colangiocitos de conductos biliares normales lo que sugiere un papel de estos transportadores en la formación de bilis, además esta expresión colangiocelular es más fuerte que la expresión de MDR1 canalicular y MRP3 basolateral en hepatocitos. MDR1 y MRP3 son regulados positivamente en los conductos biliares y células progenitoras. En las enfermedades colestásicas crónicas, los conductillos reactivos forman un laberinto en el borde de los tractos portales y se considera que forman una especie de reservorio en el que

se puede acumular la bilis y en consecuencia generar toxicidad. La regulación positiva de MDR1 y MRP3 en estructuras ductulares en cirrosis biliar primaria (PBC) probablemente juegan una función protectora contra la acumulación de los constituyentes biliares tóxicos. El hecho de que los conductos biliares reactivos cercanos al parénquima muestren mayor reactividad para MRP3 que los conductos biliares más profundos en el tracto portal y los conductos biliares interlobulillares apoya esta hipótesis de que MRP3 probablemente funciona como un transportador basolateral para extruir las sales biliares de regreso a la circulación sistémica, contribuyendo así a la derivación colehepática<sup>82</sup>.

### **1.8.2 MRP2, (ABCC2)**

También conocido como cMOAT), es una bomba GS-X, homólogo de MRP1 con especificidad de sustrato similar. A diferencia de MRP1, que se expresa en forma casi ubicua, MRP2 está presente principalmente en la membrana canalicular de los hepatocitos<sup>87</sup> y otros dominios apicales de células polarizadas, como las células epiteliales de los túbulos proximales del riñón<sup>88</sup>. Esta localización respalda que su función es la excreción terminal y la desintoxicación de aniones orgánicos endógenos y xenobióticos, particularmente en el flujo de salida unidireccional de sustancias conjugadas con glutatión, glucuronato o sulfato, como se ha observado con leucotrienos C<sub>4</sub>, glucuronósidos de bilirrubina y algunos sulfatos esteroides. La bomba hepática ABCC2 contribuye al mantenimiento del flujo biliar<sup>89</sup> y juega un papel importante en la eliminación de los glucuronósidos de bilirrubina de los hepatocitos en la bilis, la ausencia de ABCC2 funcional de la membrana canalicular causa hiperbilirrubinemia conjugada, como se ha documentado en el trastorno hereditario descrito por Dubbin y Johnson<sup>89, 90</sup>. MRP2 también contribuye al transporte de medicamentos

contra el cáncer y algunos metales<sup>88</sup>. Además de los tejidos humanos normales, la proteína ABCC2 también está presente en varios tumores malignos humanos, como lo demuestra la inmunotinción de muestras clínicas de carcinomas renales, hepatocelulares, de ovario y colorrectales, utilizando microarreglos de tejidos, una alta expresión de ABCC2 se detectó en pulmón, mama y carcinomas gástricos<sup>91</sup>.

MRP2 ha mostrado regulación negativa en hepatocitos gravemente colestáticos, que contienen cuerpos de Mallory colestáticos, lo que sugiere que este transportador se mantiene en su ubicación y su función se conserva, incluso en hígados colestáticos. MRP2 y MRP3 tienen una especificidad de sustrato superpuesta<sup>92,93</sup>. Por lo tanto, la regulación negativa apical de MRP2 y la regulación ascendente basolateral de MRP3 en los hepatocitos colestáticos periportales probablemente representan una adaptación que protege a los hepatocitos contra la acumulación de constituyentes biliares tóxicos, es decir trabajan de forma compensatoria<sup>82</sup>.

### **1.8.3 MRP3, (ABCC3)**

En humanos se localiza en las membranas basolaterales de las células epiteliales del intestino, hígado, páncreas, riñón y la glándula suprarrenal. MRP3 transporta glicocolato, taurocolato y taurolitocolato-3-sulfato, los dos últimos con alta afinidad, esto sugiere que MRP3 puede ser importante en la absorción de sales biliares en el íleon terminal<sup>83</sup>. MRP3 ha sido clonado de hígado de rata y humano y posteriormente se localizó en la membrana basolateral de hepatocitos<sup>94</sup>, colangiocitos y células polarizadas transfectadas con MRP3<sup>95</sup>.

En ensayos para MRP3 en ratas, se ha encontrado que sus sustratos incluyen 17 $\beta$ -glucuronosil estradiol (E217 $\beta$ G), glucuronosil bilirrubina,

sales biliares monovalentes (ej. taurocolato y glicocolato) y sales biliares sulfatadas (es decir, tauroquenodesoxicolato-3-sulfato, taurolitocolato-3-sulfato). En humanos, los hígados normales muestran bajos niveles de proteína MRP3, principalmente limitados a las membranas basolaterales de las células epiteliales de los conductos biliares y los hepatocitos que rodean los tractos portales<sup>95</sup> pero se induce un aumento dramático durante condiciones colestáticas<sup>96</sup>.

Esto sugiere que cuando se bloquea la ruta de excreción canalicular habitual, MRP3 puede funcionar para desintoxicar los hepatocitos de AB's y otros conjugados al mediar la extrusión de estos compuestos a través de la membrana sinusoidal hacia la circulación para su posterior excreción en la orina<sup>97</sup>. Sin embargo, puede ser dudoso que esto también se aplique a los humanos, ya que el MRP3 humano transporta glicocolato y taurocolato con baja afinidad. La determinación de que MRP3 puede ser inducida por los AB's, al menos en el contexto de una línea celular de enterocitos (CACO2) y la identificación de elementos promotores de MRP3 que median la inducción de AB's sugiere que los niveles elevados de AB's como consecuencia de las condiciones colestáticas pueden contribuir directamente a su regulación positiva en hepatocitos. También se ha especulado que MRP3 puede estar involucrado en la circulación enterohepática de los AB's, ya que está localizado en las superficies basolaterales de los enterocitos, donde puede mediar el transporte a la sangre de AB's para ser transportados al intestino por la bilis y después a través de las superficies apicales de los enterocitos por el transportador ISBT (Transportador ileal de sales biliares dependiente de sodio)<sup>97</sup>.

MRP3 parece tener una función de transporte de carácter compensatorio, cuando hay ausencia de un MRP2 funcional. Se han

detectado niveles elevados de expresión de MRP3 en el carcinoma hepatocelular humano y en pacientes con síndrome de Dubin&Johnson, los compuestos que normalmente se extruyen en la bilis son transportados por MRP3 a la sangre sinusoidal<sup>98</sup> y de manera similar, MRP3 también está regulado por aumento en condiciones colestáticas<sup>99</sup>. Por lo tanto, la función corregulada de MRP2 y MRP3 puede tener un efecto importante sobre el metabolismo conjugado y la secreción de AB's en el hígado humano. Además, los estudios en ratones MRP3-/- tienen un transporte normal de sales biliares, pero alteran el transporte de glucoronidos, esto indica que aunque MRP3 no juega un rol imprescindible para transportar los principales AB's, contribuye a la excreción de compuestos glucoronidados que incluyen compuestos biliares glucoronidados, recordando que la glucuronidación es una forma de desintoxicación de xenobióticos en el hígado y en humanos, MRP3 protege al hígado de la acumulación de sales biliares tóxicas durante la colestasis<sup>100</sup>.

#### **1.8.4 MRP4, (ABCC4)**

Se expresa en una variedad de epitelios, incluidas las membranas plasmáticas basolaterales y apicales del hígado y riñones, respectivamente. MRP4 transporta nucleótidos cíclicos, AB's sulfatados<sup>86</sup>, conjugados de esteroides (como DHEAS) y su inducción en hígado de ratas *Fxr* (-/-) sugiere una función protectora y compensatoria, puesto que estos ratones que carecen del receptor FXR, el cual es un regulador clave de la homeostasis de los AB's y muestran, entre muchas otras anomalías, niveles elevados de AB's en el suero como resultado de la disminución de la expresión de la bomba de eflujo biliar canalicular principal BSEP<sup>101</sup>.

Al igual que MRP3, MRP4 se expresa en la membrana sinusoidal de los hepatocitos y transportan AB's y cotransportan glutatión-ácidos biliares. Los niveles de MRP4 en condiciones normales es baja en roedores y se eleva en condiciones colestásicas como una respuesta adaptativa contrarrestando la toxicidad biliar promoviendo el flujo de AB's<sup>102</sup> y así también disminuir la probabilidad de apoptosis o necrosis<sup>69</sup>.

Además del aumento de los niveles de MRP4 en las membranas basolaterales de los hepatocitos, los transportadores sulfotransferasa dehidroepiandrosterona humana (DHEA-sulfotransferasa, (capaz de sulfatar AB's), también están regulados por *Fxr* (-/-), esta combinación de aumento de MRP4 y sulfotransferasas puede servir como una ruta de excreción para los AB's tóxicos y los aniones orgánicos en condiciones en las que su concentración hepática es elevada, similar al papel propuesto de MRP3 en ratas y en humanos que padecen el síndrome de Dubin&Johnson<sup>100</sup>.

El aumento de la expresión de estos transportadores (MRP3 y 4) es una parte importante de la respuesta protectora y adaptativa a las condiciones de sobrecarga de AB's, como la colestasis, que también incluye la regulación negativa de los principales transportadores de absorción de AB's hepáticos, NTCP y miembros de la familia OATP<sup>103,104</sup> para disminuir el daño al tejido. No se observan cambios en los niveles de *ARNm* o de proteínas en el caso de la colestasis biliar primaria (PBC), lo que sugiere una regulación postranscripcional, mientras que en los pacientes con colestasis intrahepática progresiva (PFIC) tipos II y III, se ha observado la inducción de la expresión de *Mrp4* a nivel de *ARNm* y proteína en la mayoría de los pacientes, lo que sugiere que las diferencias en la regulación molecular de la expresión de MRP4 en PFIC y PBC son dependientes de la edad y enfermedades específicas<sup>100</sup>.



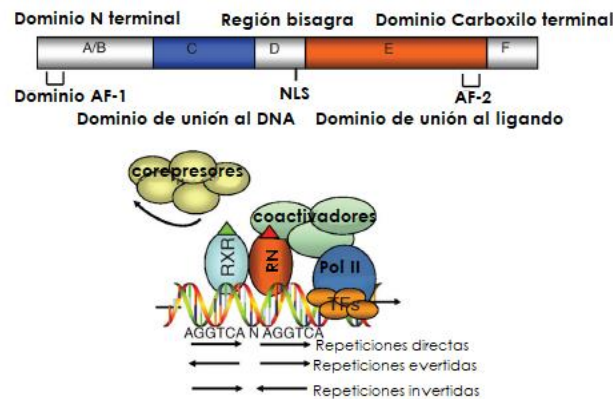
Datos recientes sugieren que MRP4 en lugar de MRP3 representan las bombas principales de exportación de AB's en el lado basolateral hepático sobre todo en la colestasis obstructiva<sup>100,102</sup>. En el caso de los roedores *Mrp4* *-/-*, (pero no *Mrp3* *-/-*) mostraron una lesión hepática más grave después de ligadura de conductos biliares que sus compañeros de camada de tipo silvestre y la inducción de *Mrp3* y *Osta/Ostβ* no pudo compensar la pérdida de *Mrp4*. Estos hallazgos sugieren que, al menos en roedores, se requiere *Mrp4*, pero no *Mrp3* para excretar eficazmente los AB's del hígado colestático<sup>104,105</sup>.

El mecanismo de regulación de la expresión del gen *Mrp4* no está claro actualmente. Se ha documentado que los receptores nucleares incluidos CAR (Receptor constitutivo X de androstano), PXR (Receptor de pregnano), RXRa (Receptor X Retinoide-α) y FXR (Receptor X Farnesoide), participan en la regulación de la transcripción de genes transportadores de fármacos entre ellos *Mrp4* (*Mrp2*, *Mrp3* y *Osta/β*). La activación transcripcional del gen *Mrp4* puede estar regulada principalmente por la translocación nuclear de CAR (y también PXR) en la colestasis en roedores<sup>102</sup>.

### **1.9 Receptores nucleares (RN)**

Los receptores nucleares son factores de transcripción activados por ligandos que juegan un papel importante en la embriogénesis, el desarrollo, la apoptosis y el metabolismo<sup>106</sup>. Estos RN's se expresan de manera selectiva en los tejidos enterohepáticos y periféricos involucrados en la síntesis, absorción y transporte de AB's, así como en el transporte de colesterol y lipoproteínas<sup>107</sup>. Hay 48 genes que codifican para los receptores nucleares en el genoma humano. Los RN's se clasifican en 5 grupos principales<sup>108</sup>, entre los cuales se encuentran el grupo de receptores endocrinos tipo I (para hormonas tiroideas), el grupo de receptores huérfanos tipo II (cuyos ligandos no se

han establecido firmemente), el grupo de receptores tipo III (para hormonas esteroideas)<sup>39,108</sup>. La importancia de los RN en la



organización de la respuesta adaptativa a los AB's tóxicos ha sido demostrada en varios modelos de ratones *knock out* de receptores nucleares<sup>102</sup>.

**FIGURA 10. RECEPTORES NUCLEARES.** La estructura general de los RN's se muestra en la parte superior. En la parte inferior se representa la secuencia de unión al elemento de respuesta del receptor nuclear, dispuesto en repetición directa, repetición evertida y repetición invertida. Los receptores activados por ligando reclutan coactivadores para reemplazar a los corepresores y dan como resultado la transactivación de la expresión del gen diana. AF-1-2, tienen la función de activación.<sup>39</sup> Tomado de: Chiang Y. L. J. *Bile acid metabolism and signaling*. Compr Physiol. 2013.

Como se ilustra en la **figura 10**, los dominios N-terminal A y B contienen el dominio de la función de activación 1, que es la región más variable en los RN's. El dominio C es una región altamente conservada que contiene dos dedos  $Zn^{2+}$  responsables de la unión a un elemento de respuesta hormonal (HRE) con dos secuencias repetitivas AGGTCA en tándem espaciadas por 1–5 nucleótidos dispuestos en repetición directa, repetición evertida o repetición invertida. La mayoría de los RN's se unen a un HRE como homodímeros o heterodímeros con el receptor X retinoide. Generalmente, en ausencia de un ligando, los receptores nucleares se unen a los corepresores y están inactivos. Tras la unión del ligando, los coactivadores se reclutan para desplazar los corepresores. Los receptores/coactivadores nucleares interactúan

con otros mediadores para estimular la ARN polimerasa II e inducir la transcripción génica. El dominio D o bisagra tiene una secuencia de localización nuclear y también participa en la unión del ADN. El dominio E es el dominio de unión a ligando (LBD) conservado en RN's dentro de la misma subfamilia. El LBD contiene motivos de interacción del coactivador LXXL y también es importante en la transactivación (AF-2)<sup>39</sup>.

Los RN's residen en el compartimento nuclear o se transportan desde el citoplasma al núcleo cuando se unen a sus ligandos con la participación de la señal de localización nuclear (NLS)<sup>109</sup>.

La vía de señalización genómica o clásica de los RN's comienza cuando el ligando se une al dominio LBD de su RN's específico, lo cual produce un cambio conformacional en los RN's que permite la disociación de proteínas que los mantienen en un estado inactivo en el citoplasma, como es el caso de la chaperona HSP90 y favorece la acumulación de los RN's como monómeros, homodímeros o heterodímeros en el núcleo celular, que se pueden unir a secuencias específicas en el ADN y reclutar proteínas correguladoras para dirigir la transcripción génica. Las correguladoras transcripcionales, no se unen directamente al ADN, sino que son reclutadas por los RN's a través de sus dominios de transactivación (AF1 y AF2) y se dividen en coactivadores y correpresores. Los coactivadores están asociados a la relajación de la estructura de la cromatina por poseer o reclutar proteínas con actividad de acetilación de histonas, mientras que los correpresores están asociados a la compactación de la cromatina por poseer actividad de desacetiladores de histonas, de esta forma, los correguladores de los RN's modulan la compactación o

descompactación de la cromatina para reprimir o inducir, respectivamente, expresión génica<sup>108</sup>.

Los RN, incluidos CAR, PXR, PPAR, LXR, RXR y FXR, se activan mediante concentraciones micromolares de AB's, lípidos o esteroides, que son 1000 veces más altos que los de la activación de los receptores de hormonas esteroides clásicas, pero se encuentran dentro de las concentraciones fisiológicas, además desempeñan papeles esenciales en la regulación de los sistemas de transporte hepatobiliar implicados en el metabolismo de los AB's en líneas celulares y modelos de colestasis animal<sup>102</sup>.

### **1.9.1 Receptor Farnesoide (FXR)**

Desempeña un papel fundamental en la circulación enterohepática de los AB's al regular su síntesis, secreción biliar, reabsorción y secreción a nivel intestinal, así como la reabsorción de los AB's en los hepatocitos. La regulación alterada de los genes diana de FXR deteriora la circulación enterohepática de los AB y contribuye a las enfermedades hepáticas colestáticas. FXR, PXR y CAR pueden desempeñar un papel complementario en la desintoxicación de los AB's y la protección contra la colestasis<sup>39</sup>.

La síntesis de AB's está bajo un estricto control para evitar su acumulación intracelular excesiva. Los AB's hidrófobos son potentes agentes inflamatorios que causan lesiones en el hígado, el intestino y otros tejidos, mientras que los AB's hidrófilos son antiinflamatorios. La señalización de FXR y TGR5 activada por AB's en macrófagos, intestino y hepatocitos suprime la inflamación al inhibir la translocación nuclear del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) y antagonizar la inducción dependiente de NF- $\kappa$ B de citocinas proinflamatorias<sup>39</sup>.

FXR modula la colestasis controlando los AB's dentro del hepatocito y participa en su síntesis, la excreción de bilis a través de BSEP y la exportación de suero a través de MRP4. La eliminación simultánea de FXR también podría mejorar un aumento en la lesión hepática que generalmente se observa en ratones KO con receptor X de pregnano con colestasis<sup>110</sup>. Los mecanismos propuestos para esta protección incluyen la disminución de las concentraciones de AB's y la expresión alterada de los transportadores hepáticos MDR1, MDR2, BSEP Y MRP4. Las dianas de FXR incluyen genes involucrados en la síntesis de AB's como CYP7A1 y CYP8B1 y transportadores de AB's, incluida la bomba de exportación de sal biliar (BSEP; ABCB11), polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP; SLC10A1) y la proteína de unión a AB's intestinales (ASBT)<sup>111</sup>.

### **1.9.2 Receptor Constitutivo de Androstano (CAR)**

El receptor constitutivo de androstano (CAR) es miembro de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción, se ha convertido en uno de los reguladores clave del fármaco y el metabolismo xenobiótico. La característica única que separa a CAR de otros miembros de la superfamilia es que permanece activo en ausencia de ligando y está regulado por los activadores. El CAR humano se expresa relativamente en mayor proporción en las células hepáticas y epiteliales de las vellosidades del intestino delgado y en menor proporción en el corazón, músculo, riñón, cerebro y pulmón<sup>109</sup>.

CAR, que es un regulador dominante de la desintoxicación de xenobióticos y funciona induciendo la expresión hepática de diferentes enzimas y transportadores involucrados en ella, también provoca el aumento del tamaño del hígado como respuesta temporal adaptativa al estrés agudo causado por diferentes xenobióticos, y la activación

crónica de CAR puede provocar hepatocarcinogénesis. Los casos tanto agudos como crónicos de estrés xenobiótico pueden causar un aumento en la replicación del ADN de los hepatocitos y una disminución de la apoptosis<sup>109</sup>.

Para ejecutar funciones de transcripción, la translocación nuclear es un evento de requisito previo para un receptor nuclear, incluido CAR. CAR funciona como un "xenosensor" alternativo para defender el cuerpo contra lesiones químicas persistentes. Responde a una gran variedad de compuestos químicamente distintos, incluidos los endobióticos y xenobióticos, para regular la eliminación de productos químicos nocivos y metabolitos tóxicos en hígado e intestino mediante la inducción de genes involucrados en su biotransformación. CAR activado por pentobarbital y TC, 1, 4-Bis [2-(3, 5-dicloropyridyloxi)] benzeno (TCPOBOP) durante la colestasis puede contribuir con mecanismos de hepatoprotección contra la toxicidad generada por AB's al incrementar la expresión de enzimas del metabolismo como CYP3A, sulfotransferasas, glucoronosil transferasas, y regulación positiva de MRP3 y MRP4. Un ejemplo muy puntual es que, CAR aumenta la solubilidad de los AB's mediante la inducción de las enzimas CYP2A4 y SULT2A1 permitiendo su hidroxilación y sulfatación respectivamente, además de la regulación de la biosíntesis de AB's primarios, en los que se favorece la biosíntesis de AB's trihidroxilados (primarios) que resultan ser menos lesivos<sup>112</sup>.

CAR en conjunto con el receptor nuclear de pregnano (PXR) participan en la regulación de la transcripción de genes transportadores de fármacos (Mrp2-4) y la actividad transcripcional de estos RN's se correlaciona bien con su concentración en el núcleo. La bilirrubina que se encuentra en la bilis puede modular la actividad de CAR por

activación indirecta, promoviendo su posterior translocación nuclear y heterodimerización con RXRa para regular genes diana como *Mrp2*-<sup>4113,114</sup>.

### **1.9.3 Receptor Activador de la proliferación de Peroxisomas (PPAR)**

Los AB's son importantes reguladores metabólicos de la homeostasis de lípidos, glucosa y energía. Los agonistas del Receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ ) regulan el metabolismo de las lipoproteínas, la oxidación de los AB's, la homeostasis de la glucosa e inflamación. Estudios recientes han demostrado que la activación de PPAR $\alpha$  altera la síntesis, conjugación y transporte de AB's, también la síntesis, absorción y transporte inverso del colesterol. En el caso de la inhibición de la síntesis de AB's por PPAR, se lleva a cabo mediante la represión de la transcripción de la enzima CYP7A, la cual es la enzima límite de la síntesis de AB's<sup>43</sup>.

Pocos estudios han implicado a PPAR en la regulación de la conjugación y transporte de los AB's en el hígado e intestino. En ratones PPAR $^{-/-}$  que son alimentados con ciprofibrato se ha observado una disminución de los transportadores NTCP, OATP y BSEP acompañado de una disminución de la concentración de los AB's generado por el ciprofibrato, aunque en humanos este tratamiento ha generado observaciones contradictorias. Faltan estudios para evaluar la regulación de los sistemas de transportes biliares por PPAR<sup>43</sup>.

### **1.9.4 Receptor de la vitamina D (VDR)**

Entre los receptores que son activados por AB's se encuentra el Receptor de la vitamina D (VDR) principalmente resulta activado por

ácido litocólico y su metabolito 3-ceto-LT, además de sus ligandos hormonales y xenobióticos clásicos. VDR junto a PXR y CAR induce la expresión de múltiples sistemas de exporte y de detoxificación de fase I y II. La expresión de CYP3A4 está regulada por PXR, VDR, CAR. Varios metabolitos (AB's, xenobióticos, drogas) son convertidos en más hidrófilos para que puedan ser eliminados del organismo. Esta enzima, CYP3A4 representa una vía importante para la desintoxicación de los AB al catalizar la hidroxilación de éstos en los radicales en posiciones 6 $\alpha$ , 1 $\beta$  y C22, minimizando el daño que puede generarse tras una acumulación de AB en fenómenos como la colestasis. La inducción de CYP3A4 por ácido litocólico es mediada por VDR, el cual es más sensible a este AB y a sus metabolitos, más que otros receptores. Se ha documentado la importancia de SULT2a1 en ratones tratados con ácido litocólico, la sulfatación ocurre bajo condiciones colestásicas como se refleja en la aparición de AB's sulfatados en el suero y la orina de pacientes con enfermedades hepáticas colestásicas. Los receptores nucleares involucrados en la regulación de la expresión de Sulf2a1 incluyen FXR, PXR, VDR y CAR<sup>115</sup>.

En conjunto, los AB's pueden inducir su propia desintoxicación de fase I y II de una manera anticipada activando PXR, VDR y FXR, además inducen la hidroxilación de AB's y estimulan el exporte vía MRP3. Se ha identificado un elemento de respuesta del Receptor de vitamina D (VDRE) en el promotor murino de *Mrp3* que media la activación por la 1,25-dihidroxi vitamina D3 y ácido litocólico. El tratamiento de ratones *in vivo* con LT o 1,25-dihidroxi vitamina D3 dio como resultado la inducción de MRP3 en el colon, (por ello se considera que puede contribuir como protector en el cáncer de colon)<sup>115</sup>, mientras que la falta de inducción de *Mrp3* hepática por ligandos VDR se atribuyó a niveles bajos de VDR en el hígado<sup>116</sup>.



Aunque aún no se ha probado en modelos de colestasis, la aplicación de agonistas de VDR también podría tener efectos beneficiosos en la colestasis. El papel de los ligandos de VDR para los trastornos colestásicos queda por determinar, ya que, en el hígado normal, la expresión de VDR es menor en los hepatocitos que en las células epiteliales biliares y no parenquimatosas<sup>117</sup>. FXR, PXR y VDR pueden regular de manera coordinada los AB's, las lipoproteínas, los fármacos, la glucosa y el metabolismo energético. También se ha demostrado que los AB's activan varias vías de señalización celular implicadas en la regulación del metabolismo de los AB's. Por lo tanto, la activación de los receptores nucleares (RN) por los AB's y las vías de señalización celular convergen regulando una compleja red de metabolismo celular<sup>39</sup>.

### **1.10 Línea celular HEpG2**

Los cultivos primarios de hepatocitos humanos consideran el estándar de oro para predecir las respuestas a los medicamentos en humanos, pero su disponibilidad limitada, calidad inconsistente, inestabilidad fenotípica, altos costos de obtención y mantenimiento complican su uso generalizado<sup>118-120</sup>.

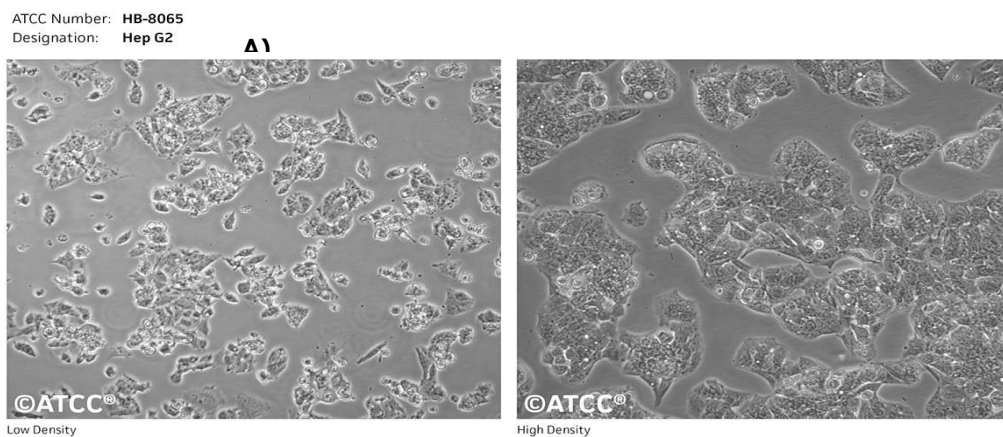
Las líneas celulares de hepatoma se usan con frecuencia como alternativas *in vitro* al cultivo de hepatocitos humanos primarios en cultivo. Las líneas celulares se caracterizan por su vida útil ilimitada, fenotipo estable, alta disponibilidad y fácil manejo. Sin embargo, su principal limitación es la menor expresión de algunas actividades metabólicas en comparación con los hepatocitos primarios. Muchas líneas celulares provenientes de hepatomas humano, incluidas HepG2, Hep3B, HuH7 y HepaRG, se utilizan comúnmente para el estudio del metabolismo de fármacos y estudios de hepatotoxicidad<sup>120</sup>.

Acorde con la información presente en el sitio de ATCC®, las células HepG2 provienen de biopsia hepática de un varón caucásico de 15 años con carcinoma hepatocelular, se trata de células no tumorigénicas, altamente proliferativas, adherentes, con una morfología de tipo epitelial que les permite realizar muchas funciones hepáticas diferenciadas, además se han cultivado con éxito en sistemas de cultivo a gran escala. Muestran una morfología epitelial cuando crecen en superficie sólida y bajo ciertas condiciones de cultivo puede ocurrir la polarización de las células con la formación de estructuras similares al canalículo biliar entre células adyacentes<sup>121,122</sup> **(Figura 11)**.

Las células HEPG2 expresan funciones hepáticas diferenciadas como la síntesis de proteínas plasmáticas, metabolismo y transporte de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas, síntesis de AB's, glicógeno o señalización de insulina<sup>123</sup>. La mayor desventaja de este tipo celular es su limitada expresión de enzimas involucradas en el metabolismo y transporte de drogas y/o fármacos. Las enzimas del citocromo P54 (CYP) como CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6 O CYP2D6 (enzimas de la fase I del metabolismo de fármacos) no se encuentran o están en niveles no detectables en este tipo celular, la abundancia de estas es menor del 10% respecto a los hepatocitos primarios<sup>124</sup>. Esta baja expresión se ha relacionado con la alteración del patrón de los llamados *factores de transcripción hepáticos enriquecidos*, que se trata de un grupo de proteínas reguladoras de la transcripción, que controlan la expresión hepática de varios genes incluyendo las enzimas CYP<sup>125,126</sup>. Aunque los niveles de expresión generales de las enzimas de fase II, uridina difosfato glucuronosiltransferasa, glutatión S-transferasa (GST), sulfotransferasa o N-acetiltransferasa (NAT) son más bajos en las

células HepG2 que en los hepatocitos humanos, las diferencias observadas no son tan marcadas como con las CYP<sup>124</sup>.

Con respecto a la expresión de proteínas de transporte en células HepG2, se han encontrado diferencias cualitativas y cuantitativas en comparación con el tejido hepático o los hepatocitos primarios. Particularmente, algunos de los transportadores hepáticos como polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP), bomba de exportación de sales biliares (BSEP) y polipéptido C transportador de aniones orgánicos (OATP) están ausentes o mal expresados en células HepG2<sup>121,124,127</sup>.



**FIGURA 11. Microscopía óptica del cultivo de HEpG2, (ATCC® HB-8065™). A)** Cultivo HEpG2 a baja densidad o confluencia **B)** Cultivo con alta densidad. Las células HEpG2 crecen inicialmente uniéndose en pequeños parches de células con muchos grupos de células aún en suspensión. Después de unos días, el crecimiento se extiende hacia afuera desde las colonias de células adherentes. Ocasionalmente, las células se acumulan en colonias adherentes formando una apariencia multicapa, que no es una morfología inusual para esta línea celular. Las células también tienden a ser vacuolares, especialmente en estado de confluencia.

Las células HEpG2 son quizá las más ampliamente caracterizadas, son fáciles de manejar y proporcionan un sistema hepático humano reproducible y rentable. Además, son el modelo de células humanas

más utilizado para las evaluaciones de hepatotoxicidad y en la literatura hay disponibles muchos datos sobre los efectos tóxicos de una gran cantidad de compuestos para este tipo celular. Sin embargo, muestran una pobre expresión de las enzimas metabolizadoras de fármacos clave en comparación con los hepatocitos, lo que dificulta su utilidad para identificar la toxicidad dependiente del metabolismo<sup>120,128</sup>. Además, las diferentes clonas de células HepG2 y un gran número de pases a lo largo del tiempo pueden conducir a resultados diferentes<sup>119</sup>.

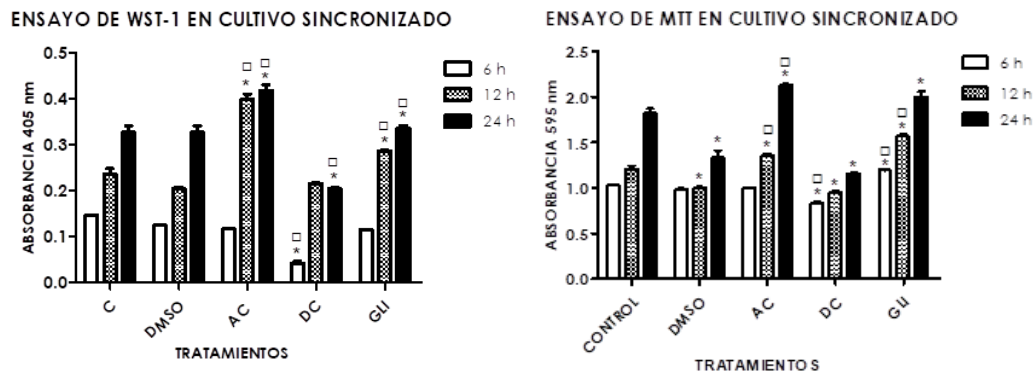
#### **4. ANTECEDENTES DIRECTOS**

En estudios previos se analizó el efecto de algunas sales biliares (AC, DC, GC a concentraciones bajas y tiempos de incubación desde 6 a 48 h, sobre la viabilidad en diferentes cultivos: no sincronizados y sincronizados para quitar la influencia del suero fetal en el crecimiento del cultivo, además se estudió el efecto de la inducción de moléculas relacionadas con la proliferación hepática, tras la hepatectomía parcial.

Se evaluaron los efectos sobre el cultivo a través de ensayos con MTT y WST-1, donde en ambos ensayos se determinó que la conversión de formazán estaba relacionada directamente con el número de células viables en cultivo.

Inicialmente, pudimos observar que las especies biliares, aunque provienen de compuestos similares, exhiben propiedades diferentes en concentraciones similares, en este caso, ácido desoxicólico resultó ser el tratamiento más lesivo para el cultivo donde las concentraciones superiores a 75  $\mu$ M incubadas por más de 6 h dieron como resultado la lisis del cultivo. El ácido cólico mostró un posible efecto sobre la

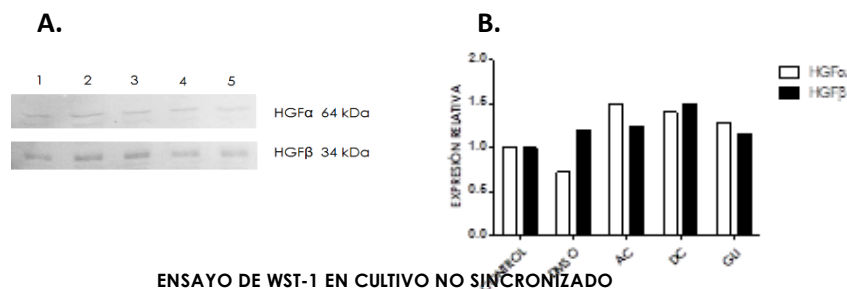
proliferación, observando que el número de células resultó mayor tras 24-48 h tanto en cultivos sincronizados como no sincronizados donde la



**Gráfica 1. Ensayos de proliferación con WST-1 tras el tratamiento con diferentes sales biliares a 75  $\mu$ M en cultivo sincronizado.** Se observan cultivos HEP2 a diferentes tiempos de tratamiento, se puede observar una tendencia similar en ambas gráficas correspondientes a dos ensayos diferentes A. WST-1 y B. MTT, donde el tratamiento con ácido cólico muestra un cultivo con mayor actividad metabólica que podría traducirse en un mayor número de células en cierto momento o bien estrés oxidativo. (más adelante discutiremos acerca de estos ensayos en concordancia con observaciones a posteriori) Con asteriscos (\*) se muestran las barras cuyos tratamientos representan diferencias significativas respecto al control normal y con cuadros ( $\square$ ) se muestran las barras cuyos tratamientos muestran diferencias significativas respecto al control del vehículo (DMSO).  $P \leq 0.05$ .

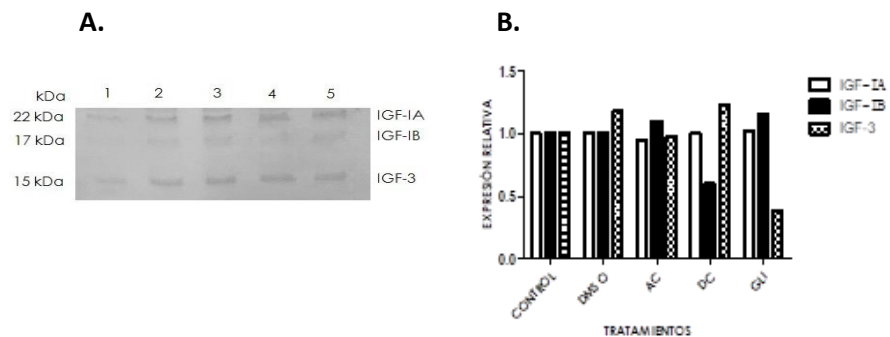
tendencia fue similar (**Gráficas 1 y 2**); igualmente se observó un efecto similar con los otros dos compuestos, aunque en menor medida.

Posteriormente evaluamos la expresión de las proteínas HGF, IGF por medio de ensayos de Western blot (**Gráfica 3**) donde pudimos observar que las tres especies biliares aumentaron la expresión de HGF, siendo AC el tratamiento que indujo la mayor expresión comparado a los demás tratamientos y al control; sin embargo, en el caso de IGF las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, únicamente observamos un ligero aumento tras el tratamiento con DC respecto al control (**Gráfica 4**).



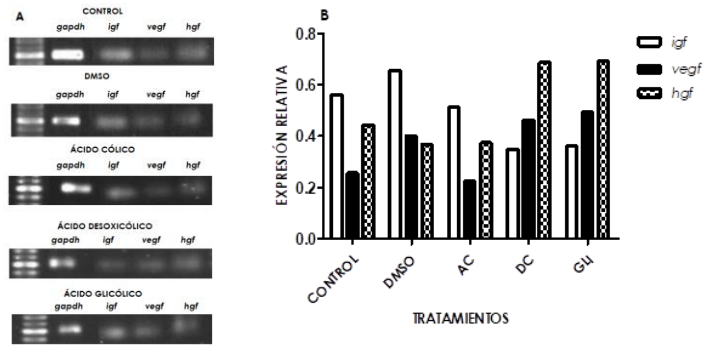
**Gráfica 3. Western blot para la determinación de HGF en células tratadas con ácidos biliares.** Extractos totales de células tratadas durante 24 h con los AB's (75  $\mu$ M) se analizaron por inmunotransferencia. Con el anticuerpo anti-HGF, **B.** Análisis densitométrico en relación con el control normal. Carril 1: Control de células sin tratar. Carril 2: Control de vehículo (DMSO). Carril 3: Células tratadas con Ácido Cólico. Carril 4: Células tratadas con Ácido Desoxicólico. Carril 5: Células tratadas con Ácido Glicólico. n=3. Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**Gráfica 2. Ensayos de proliferación con WST-1 después del tratamiento con diferentes sales biliares a 75  $\mu$ M en cultivo no sincronizado.** Se observan células HEpG2 no sincronizadas en cultivos de 6 a 48 h tras diferentes tratamientos, donde en concordancia con la gráfica anterior, el tratamiento con ácido cólico refleja un mayor número de células o actividad metabólica. Con asteriscos (\*) se muestran las barras cuyos tratamientos representan diferencias significativas respecto al control normal y con cuadros (□) se muestran las barras cuyos tratamientos muestran diferencias significativas respecto al control del vehículo (DMSO).  $P \leq 0.05$ .



**Gráfica 4. Determinación de IGF en células tratadas con ácidos biliares.** Extractos totales de células tratadas durante 24 h con los AB's (75  $\mu$ M) se analizaron por inmunotransferencia **A**. Con el anticuerpo anti-HGF **B**. Análisis densitométrico de la expresión relativa de IGF en relación con el control normal. Carril 1: Control de células sin tratar. Carril 2: Control del vehículo, DMSO 0.3%. Carril 3: Células tratadas con Ácido Cólico. Carril 4: Células tratadas con Ácido Desoxicólico. Carril 5: Células tratadas con Ácido Glicólico. n=3 Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente se evaluó la expresión de los mensajeros IGF, HGF y VEGF tras la exposición a los diferentes AB's (**Gráfica 5**), donde la expresión de HGF y VEGF fueron inducidas principalmente por DC y GC, en proporción similar sobre el control; en el caso de IGF todos los tratamientos la disminuyeron.



**Gráfica 5. Análisis de la expresión de IGF, VEGF y HGF tras el tratamiento con ácidos biliares.** **A.** Se muestran los productos de PCR del control normal (células no tratadas). Carril 1, gapdh (598 pb); carril 2, igf (60 pb); carril 3, vegf (72 pb); carril 4, hgf (106 pb). **B.** Análisis densitométrico con relación al control respectivo de gapdh para cada tratamiento. n=3 Nota: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tras estas observaciones, se determinó el efecto heterogéneo de las sales biliares a concentraciones similares en el cultivo, así, el ácido cólico resulta ser el tratamiento que induce mayor actividad metabólica (observado en los ensayos de WST-1 y MTT) que puede traducirse en un mayor número de células en determinado tiempo o bien estrés oxidativo. Más adelante se discutirá acerca de estos ensayos, en concordancia con observaciones *a posteriori*. El aumento de la expresión de moléculas como HGF, IGF, VEGF se ha relacionado en etapas de la proliferación activa hepática, por ello los AB podrían estar induciendo proliferación celular, como se ha observado en ensayos de hepatectomía parcial con colecistectomía donde los animales recuperan más rápido la masa hepática extirpada respecto a animales a los que no se les extirpa la vesícula biliar, esto debido al flujo y estímulo constante que los AB's pueden estar ejerciendo sobre la proliferación.



## **5. JUSTIFICACIÓN**

Es difícil conocer puntualmente los efectos generados por la sobrecarga de AB sobre los hepatocitos en patologías como la colestasis, debido a la enorme variedad de especies de compuestos biliares que se forman durante su síntesis en hígado y tras su paso por el sistema digestivo, los diversos efectos que exhiben los AB's pueden ser desde protectores, coadyuvantes en la regeneración y por otro lado lesivos e incluso procarcinógenos, éstos efectos no se conocen del todo, específicamente durante la colestasis aún se desconoce de los efectos de los AB's sobre transportadores que participan en la desintoxicación celular así como en moléculas nucleares receptoras, la determinación del rol de estas moléculas en la colestasis contribuye al entendimiento, manejo y tratamiento de la enfermedades donde existe la sobrecarga de AB's.

## **6. HIPÓTESIS**

Los ácidos biliares regulan la expresión de los transportadores hepáticos con efectos dosis y especie dependientes.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los cambios celulares y moleculares, inducidos por las principales sales biliares primarias, secundarias y conjugadas, sobre cultivos de hepatocitos

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los efectos sobre el cultivo celular de cada uno de los AB's a diferentes concentraciones.
2. Analizar la expresión de los genes involucrados con el transporte y receptores nucleares después de la exposición a AB.
3. Estudiar la expresión de proteínas secretadas al medio tras la exposición a los AB's

## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1 Cultivo celular**

Células HEpG2 se cultivaron en medio DMEM Advanced™ (Gibco, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA), suplementado con glutamina y 100 u penicilina/estreptomicina (Gibco, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) y suero fetal 5% en una atmosfera a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Las resiembras se efectuaron en presencia de tripsina-EDTA 0.1% de manera periódica, según los requerimientos. El DMSO utilizado como vehículo y los AB's utilizados se adquirieron de Sigma & Aldrich, (CA, USA).

### **9.2 Ensayos de viabilidad con MTT**

Para establecer la viabilidad del cultivo celular a la exposición a determinadas concentraciones de los principales tipos de AB's primarios, secundarios y conjugados, se realizaron ensayos con el reactivo MTT (4,5-dimethyl thiazolyl-2)-2,5 diphenyl-tetrazolium) (Roche, Basel, Switzerland).

Dicho ensayo consistió en sembrar células a una densidad de  $80 \times 10^5$  por pozo en placas, se les dejó adherir y crecer durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\% \text{CO}_2$ , posteriormente se procedió a añadir las concentraciones de las sales biliares, cada una por separado y disueltas en DMSO y se procedió a incubar durante 4 h en las condiciones mencionadas, transcurrido este tiempo, se descartó el sobrenadante, se lavaron las células con PBS 1X, se añadió el reactivo de MTT ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) y se dejó incubar durante 3 h protegiendo de la luz, en las mismas condiciones. Posteriormente se procedió a solubilizar con isopropanol (Sigma & Aldrich, CA, USA), se recuperó el sobrenadante en una placa para espectrometría y se procedió a leer a una longitud de onda de 545 nm. Los datos se analizaron en el software estadístico SPSS.

### **9.3 Fraccionamiento subcelular**

Se sembraron células HEpG2 y se permitió su crecimiento hasta llegar a la confluencia; se añadió el tratamiento con las diferentes sales biliares durante 4 h cada una por separado. Posteriormente, las células se despegaron con tripsina-EDTA 0.1%, se neutralizó la tripsina con medio suplementado con SFB 5%, se recolectaron en tubos y se lavaron dos veces con PBS 1X a pH 7.2. El paquete celular se resuspendió en amortiguador de lisis (HEPES 10 mM pH 7.9,  $\text{MgCl}_2$  1.5 mM, KCl 10 mM, DTT (0.5 mM) IP 3X, NP-40 1%) y se incubó durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente se centrifugó a 14,000 RPM durante 25 min. El sobrenadante (fracción EC citoplásmica) se recuperó, se etiquetó y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso. La pastilla que formó el precipitado se resuspendió nuevamente en amortiguador (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 0.5 mM, IP 3X) y se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante 40 min. Se centrifugó a 14,000 RPM, 25 min y el sobrenadante conteniendo la fracción nuclear se recolectó y se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ .

Los extractos obtenidos se mezclaron con buffer Laemelli y se hirvieron durante 8 min para posteriormente depositarse en geles de SDS-PAGE al 10%; al finalizar el corrimiento, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie, enseguida se destiñeron y se fijaron con solución desteñidora para su análisis.

#### **9.4 Ensayos de Western blot**

Tras ser cuantificados los extractos de proteína por el método de Bradford, 40 µg de proteína del extracto EC de cada condición se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-RAD, Marnes-la-Coquette, France), durante 2 h a 80 v y 2 h a 40 v, 4°C. Las membranas se bloquearon con TBST-leche desgrasada 5% durante al menos 2 h a 37°C en agitación, posteriormente se lavaron con TBST y se procedió a incubar con el anticuerpo primario diluido en leche MRP3 (1:50, 1:100, 1:200, 1:500) (Santa Cruz, sc-59612, Santa Cruz, CA, USA) o MRP4 (1:200) (Santa Cruz sc-59614, Santa Cruz, CA, USA) o suero anti actina (sin diluir), el cual fue utilizado como control, según fuera el caso, las membranas se incubaron durante toda una noche a 4°C, pasado este tiempo se lavaron 5 veces durante 10 minutos con TBST y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario anti ratón 1:1000 o anti rata (ab6845/1:1000, Abcam, Cambrigde, MA, USA), según correspondiera el caso, durante 1h a temperatura ambiente. Nuevamente se lavaron las membranas 5 veces con TBST por 15-20 min con agitación vigorosa. Finalmente, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia con la mezcla de sustratos para peroxidasa de rábano picante (HRP) de Inmobilon™ Western 1:1 (Inmobilon, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) y la imagen fue adquirida con el software iS (image Studio, LICOR, Biosciences, Nebraska, USA), el análisis densitométrico se realizó con el software imageJ.

## **7.5 Ensayos de RT-PCR punto final y RT-qPCR**

### **7.5.1 Extracción de RNA**

Tras la exposición a cada una de las sales biliares durante 4h, el medio se descartó y se procedió a lisar las células durante 5 minutos con 500  $\mu$ l TRIzol Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), el lisado se recuperó en tubos de eppendorf, se añadió 100 $\mu$ l de cloroformo (Sigma) e incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se mezcló en vórtex durante 1 minuto, posteriormente se centrifugó a 14,000 RPM durante 30 minutos, se recuperó la parte superior en un nuevo tubo al cual se le añadió 250  $\mu$ l de isopropanol (Sigma & Aldrich, CA, USA). Esta fracción se homogenizó y centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, posteriormente se descartó el sobrenadante y se añadió etanol al 70% y centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, se hidrató, resuspendió y homogenizó en agua DEPC estéril. Finalmente se cuantificó por espectrometría y se almacenó a -70°C hasta su uso. Su integridad se verificó mediante la visualización de las bandas correspondientes en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### **7.5.2 Tratamiento con DNAsa**

De las muestras de RNA obtenidas, se realizó el tratamiento con DNAsa 1 para eliminar los restos de DNAs que pudieran estar presentes, como se describe a continuación: en un tubo eppendorf se tomó 1  $\mu$ g de RNA de la muestra, 1  $\mu$ l 10x DNase Reaction buffer, 1  $\mu$ l DNase I amp grade 1 U/ $\mu$ L, H<sub>2</sub>O DEPC (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y

posteriormente se añadió 1 µl de EDTA e incubó a 65°C durante 10 min. Nuevamente se corrió un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para verificar la integridad del RNA y proceder a su cuantificación.

### **7.5.3 Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit NZY First strand cDNA Synthesis kit (NZYTech, Lisboa, Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante y como se describe a continuación: en un tubo de reacción se colocó NZYRT 2x Máster Mix 10 µl, NZYRT Enzyme mix 2 µl, 5 µg RNA y H<sub>2</sub>O DEPC necesaria para una reacción de 20 µL, según fuese el caso. La mezcla se homogenizó e incubó a 25°C durante 10 minutos, posteriormente a 50°C durante 30 minutos e inactivada por calor a 85°C durante 5 min y después colocada en hielo, se le añadió 1 µl de NZY RNase H (*E. coli*) (NZYTech, Lisboa, Portugal) y se incubó a 37°C durante 20 min. Finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **7.5.3 PCR (Reacción en cadena de la polimerasa punto final)**

Se realizaron ensayos de PCR punto final para el desarrollo de la estandarización de qPCR para la identificación de todos los mensajeros, se establecieron como controles la expresión de los genes constitutivos *gapdh* y *β-actina*. En la siguiente tabla, se resumen los componentes de la mezcla de reacción y las cantidades utilizadas **(Tabla 2)**.

**Tabla 2. Mezcla de reacción con los componentes y cantidades utilizadas para la reacción de PCR punto final de *gapdh* y  $\beta$ -actina.**

La reacción para *gapdh* y *b-actina* se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD EN UL</b>					
<b>10X BUFFER</b>	2.5					
<b>10 MM DNTP'S</b>	0.5					
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2					
<b>OLIGO FW</b>	1					
<b>OLIGO RV</b>	1					
<b>TEMPLADO CDNA</b>	1					
<b>Taq pol recomb. (THERMO)</b>	0.2					
<b>H<sub>2</sub>O</b>	~ 25 $\mu$ l					
	<b>1 CICLO</b>		<b>35 CICLOS</b>		<b>1 CICLO</b>	<b>1 CICLO</b>
<b>T°</b>	94°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°
<b>Tiempo</b>	5 Min	30 s	30 s	30 s	10 min	$\infty$

Para la estandarización de PCR punto final y qPCR se realizaron rampas de MgCl<sub>2</sub> como se ejemplifica a continuación y con variaciones de temperatura desde 50 a 65°C, según correspondiera el caso (**Tabla 3**).



<b>COMPONENTES</b>	<b>uL</b>	<b>1 mM</b>	<b>2 mM</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
10X BUFFER	2.5	2.5				
10 mM DNTPs	0.5	0.5				
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2	.5	1	1.5	2	2.5
Oligo Fw 10 μM	1	1				
Oligo Rv 10 μM	1	1				
Templado cDNA	1	1				
Taq polimerasa THERMO	0.2	.2				
H <sub>2</sub> O	~25ul					

**Tabla 3. Mezcla de reacción con los componentes y cantidades utilizadas para los gradientes de MgCl<sub>2</sub> durante la estandarización de los diferentes pares de oligos utilizados.**

A continuación, se muestran las secuencias de los pares de nucleótidos que se utilizaron para los ensayos de PCR (**Tabla 4**).

<b>GEN</b>	<b>PRIMER FOWARD</b>	<b>PRIMER REVERSE</b>	<b>pb</b>	<b>T°</b>
<b>B-ACTN</b>	<b>CCACGAAACTACCTTCAACTCC</b>	<b>GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT</b>	<b>132</b>	<b>50-65</b>
<b>GAPDH</b>	<b>CTTGGTATCGTGGAAGGACTC</b>	<b>GTAGAGGCAGGGATGATGTCT</b>	<b>132</b>	<b>50-65</b>
<b>ABCC3</b>	<b>AAAAGCAGACGGCACGACA</b>	<b>GCAGGCACTGATGAGGAAGC</b>	<b>158</b>	<b>65</b>
<b>ABCC4</b>	<b>TGATGAGCCGTATGTTTGC</b>	<b>CTTCGGAACGGACTTGACAT</b>	<b>395</b>	<b>64</b>
<b>ABCC2</b>	<b>CTCACTTCAGCGAGACCG</b>	<b>CCAGCCAGTTCAGGGTT</b>	<b>285</b>	<b>56</b>
<b>ABC1</b>	<b>AAATGGCTTGACAAGTTGTATATGG</b>	<b>CACCAGCATCATGAGAGGAAGTC</b>	<b>85</b>	<b>56</b>
<b>FXR</b>	<b>ACTCCGCTCGGGCATTCTGAC</b>	<b>GCTGTAAGCAGAGCATACTCCTC</b>	<b>144</b>	<b>56.5</b>
<b>PPAR</b>	<b>GGCGAGGATAGTTCTGGAAGC</b>	<b>CACAGGATAAGTCACCGAGGAG</b>	<b>132</b>	<b>64</b>
<b>CAR</b>	<b>GCAGAAGTGCTTAGATGCTGGC</b>	<b>GCTCCTTACTCAGTTGCACAGG</b>	<b>125</b>	<b>64</b>
<b>VDR</b>	<b>CTGACCCTGGAGACTTTGAC</b>	<b>TTCCTCTGCACTTCCTCATC</b>	<b>277</b>	<b>60</b>
<b>CYP7A</b>	<b>CTGAGGCTTCCAGTGCCT</b>	<b>AGGTAGTCTTTGTCTTCCCGT</b>	<b>208</b>	<b>50-65</b>
<b>BSEP</b>	<b>AGGGAAATCAAGCTCTTAATGAAG</b>	<b>ATAGGTAGACTTATGATCTACAACA</b>	<b>188</b>	<b>50-65</b>

NTCP	GGAGGGAACCTGTCCAATGTC	CATGCCAAGGGCACAGAAG	99	*
MDR3	TGGCCCTGGTTGGAAGTAGTG	AGAAGGATCTGGGGTTGCGAA	-	*
OST $\alpha$	TCTTCCTGGAGGATGCCGTCTA	TCCAGAGACCAAAGCAGCACAG		*
OST $\beta$	ATGGTCCTCCTGGGAAGAAGCA	GCCTCATCCAAATGCAGGACTTC	95	*
LRX	GCTAACAGCGGCTCAAGAATAA	GCTCCGTGAAGTGGGCAA		*
RXR	CTTGCTCATTGCTATCAGCATCTT	ACATATGTGTGCTGCAGCCTCT		*

**Tabla 4.** Secuencias de los oligos utilizados, se muestra la temperatura de alineamiento resultante tras la estandarización, para el desarrollo de RT-PCR punto final y posterior RT-qPCR

#### 7.5.4 qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con las proporciones que se refieren en la siguiente tabla (**Tabla 5**), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el kit NZYtech qPCR Green Master Mix (2X), ROX, (NZYTech, Lisboa, Portugal) utilizando termociclador y software 7500 Applied Biosystems (CA, USA).

<b>COMPONENTES</b>	
Máster mix 2X	5 $\mu$ L
Oligo Fw 400nm	0.4 $\mu$ L
Oligo Rv400nm	0.4 $\mu$ L
cDNA	250 ng
H <sub>2</sub> O	3.20 $\mu$ L
Volumen total	~10 $\mu$ L

**Tabla 5.** Componentes de la mezcla de reacción para qPCR

A continuación, se resumen los ciclos de qPCR:

<b>ETAPA DE DESNATURALIZACIÓN</b>	<b>ETAPA ALINEAMIENTO</b>	<b>NÚM. CICLOS</b>
95°C, 2:00 MIN	95°C, 0:05 min T° alineamiento correspondiente, 00:30 min	40

Posteriormente tras la obtención de los resultados se procedió a realizar la cuantificación relativa de cada gen analizado respecto a la expresión del control constitutivo *GAPDH* por medio del método  $\Delta\Delta C_t$  con la modificación de Pfaffl<sup>129</sup>.

## **7.6 Ensayos de inmunofluorescencia con microscopía confocal**

### **7.6.1 Ensayos para la localización de MRP3 y MRP4**

En ensayos iniciales, se sembraron  $8 \times 10^5$  células en cubreobjetos en medio con SFB 5%, al siguiente día fueron expuestas a las diferentes concentraciones de sales biliares, cada una por separado durante 4h, 37° y 5% CO<sub>2</sub>, posteriormente el sobrenadante se retiró, se hicieron lavados con PBS 1X filtrado, se fijaron con metanol frio 97%, 5 minutos a -20°C, se lavaron con PBS 1X filtrado, se bloquearon con SFB 5% durante al menos una hora a 37°C, se lavó nuevamente y se procedió a incubar con el anticuerpo primario MRP3 1:25 (Santa Cruz, sc-59612/1:25, Santa Cruz, CA, USA) o MRP4 1:50 (Santa Cruz, sc-59614/1:50, Santa Cruz, CA, USA) durante 2 h a 37°C, se lavaron 5 veces con PBS 1X filtrado, posteriormente se incubó una hora a 37°C protegiendo de la luz y en cámara húmeda con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (2.5:1000) (Abcam, ab6785/1:2500, Cambridge, MA, USA) o cabra anti-rata (1:100) (goat anti-rat , ZyMax™ 81-9511/1:100, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) acoplados a FITC según correspondiera, se lavó 5

veces con PBS, se eliminó el exceso y se montaron en portaobjetos con 8uL Vectashield®/DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), para finalmente sellarlas con barniz.

Como controles de auto fluorescencia se utilizaron células montados con Vectashield® únicamente.

Las imágenes se observaron con el microscopio Zeiss y se analizaron con el software Blue y Black Zen (Oberkochen, Germany), en los resultados se muestran imágenes representativas de al menos 6 capturas por cada tratamiento en cada uno de los casos.

### **7.6.2 Tinción para retículo endoplásmico**

De manera similar a lo descrito en el apartado anterior y siguiendo las instrucciones del fabricante, las células se sembraron por duplicado y posteriormente se les removió el medio, se lavaron los cubreobjetos con HBSS (solución amortiguadora completa de Hanks), se incubó con ER-TRACKER™ (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) 1:1000  $\mu$ L en HBSS (Solución de Hanks) tibio, se incubó 30 minutos a 37 °C, se procedió a fijar con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a 37 °C, se lavó 4 veces con HBSS, se montó el cubreobjetos con 8uL de Vectashield®, se selló con barniz, finalmente se analizaron mediante microscopía confocal y se mantuvieron a 4°C durante su uso.

### **7.6.3 Ensayos de co-localización MRP4 acoplado a FITC- núcleo (DAPI)**

En los ensayos, en donde se buscó la existencia de co-localización entre MRP4 y el núcleo de la célula, se procedió a sembrar, fijar, bloquear y lavar de manera similar a lo descrito anteriormente, sin embargo, a diferencia de las laminillas anteriores, para este ensayo se prepararon “laminillas calibradoras para FITC” las cuales sólo fueron marcadas con el anticuerpo primario y secundario (similar a lo anterior

descrito) y se montaron con Vectashield sin DAPI y fueron selladas con barniz. Por otro lado, las "laminillas calibradoras para DAPI" fueron únicamente marcados con Vectashield®/DAPI y sellados. Adicionalmente se prepararon laminillas de los tratamientos con ambas marcas (como se describió en los apartados anteriores)

## **9.5 ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EN EL SOBRENADANTE**

### **7.6.1 SDS-PAGE tinción con colorante de Coomassie y tinción de plata**

Para analizar las proteínas excretadas en el sobrenadante por las células tras la exposición a los ácidos biliares, se recolectó el sobrenadante, se añadió amortiguador Laemmli, se hirvió durante 10 min, y finalmente las muestras fueron cargadas en geles de SDS-PAGE de diferentes concentraciones, esto para observar mejor el despliegue de las bandas de proteína, tras la corrida fueron teñidos con azul de Coomassie o con plata para su posterior análisis.

### **7.6.2 Depleción de albúmina de muestras de sobrenadante**

Tras la observación de los geles teñidos tanto con plata como con Coomasie, se observó que la proteína más abundante era albúmina, debido a que ésta es producida y secretada por los hepatocitos (además que en la formulación del medio DMEM Advanced uno de sus componentes es AlbuMAX®), era necesario disminuir la cantidad de esta proteína para estudios posteriores y mejor visibilidad de las demás proteínas que son menos abundantes, por tanto se procedió a depletar albúmina del medio de la siguiente manera: se tomaron 150 µl del

sobrenadante se les añadió 4.7 µl de NaCl (5M) para llevar a una concentración final de 0.5 M, se vortexeó suavemente a 4°C, 1 h; se añadió metanol al 95% llevando a una concentración final de 47% y se vortexeó 1 h; se procedió a centrifugar 14,000 rpm, 30 min, se descartó el sobrenadante (el cual contenía a la albúmina), el *pellet* formado fue resuspendido en 150 µl de amortiguador (HEPES pH 7.4, 25 mM, 1% mM, 1%) y se precipitó con 8 volúmenes de acetona fría a -20% durante toda una noche a -20°C. Finalmente se centrifugó a 14,000 RPM, 30 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 µl de amortiguador (HEPES 25 mM pH 7.4, 0.1% SDS, 4 M urea). El procedimiento se repitió 1, 3 y 5 veces para observar la depleción de albúmina y la visualización de las proteínas menos abundantes. Finalmente, la muestra resultante fue homogenizada con buffer de carga (Laemmli) y hervido 10 min y posteriormente cargado y corrido en geles SDS-PAGE a diferentes concentraciones.

### **7.6.3 Tinción con plata**

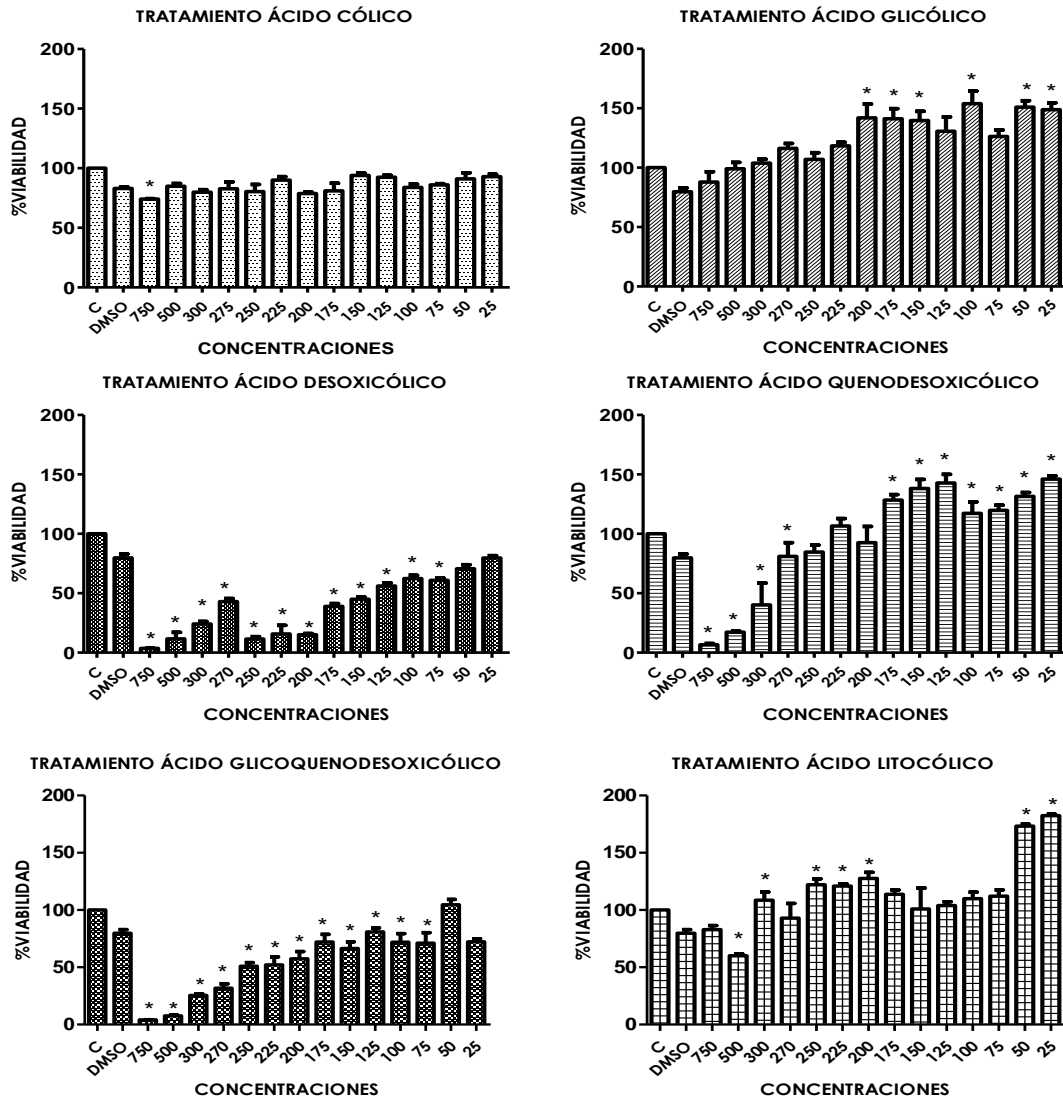
Debido a la menor sensibilidad de la tinción de geles con azul de Coomassie, se procedió a teñir con plata con el kit SilverQuest™ (Life Technologies, Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y con pequeñas modificaciones, como se describe brevemente a continuación: Tras la corrida electroforética, los geles se lavaron con agua rápidamente, se fijaron en solución desteñidora durante una noche a -4°C, se decantó la solución y lavó en 200 ml de metanol al 30%, 10 min; se decantó e incubó 10 min con 100 ml de solución sensibilizadora; se decantó y lavó con 100 ml etanol 30%, 10 minutos; se decantó y se lavó con agua ultrapura 10 min; se decantó e incubó 15 minutos con 100 ml de solución de tinción; se decantó y se lavó durante 40 seg con agua ultrapura; se decantó y se

incubó con 100 ml de solución desarrolladora durante 4-8 min hasta que se visualizaron las bandas, a esto se le añadió 10 ml de solución 'stopper' directamente para detener la reacción y se mantuvo en agitación durante 10 min. Finalmente se lavaron los geles con agua ultrapura y se procedió a obtener su imagen.

## **10. RESULTADOS**

### **10.1 Efectos de los AB sobre la viabilidad celular**

En primer lugar, para determinar el comportamiento en la viabilidad del cultivo celular HEpG2 tras la exposición a sales biliares, se realizaron ensayos con MTT, como se describió en el apartado anterior. Se eligieron diversas concentraciones, con las cuales se incubaron los cultivos, por separado y cada uno por triplicado, durante 4 h, a continuación, en el conjunto de gráficas se muestran los resultados de estos ensayos de viabilidad (**Gráfica 6**).

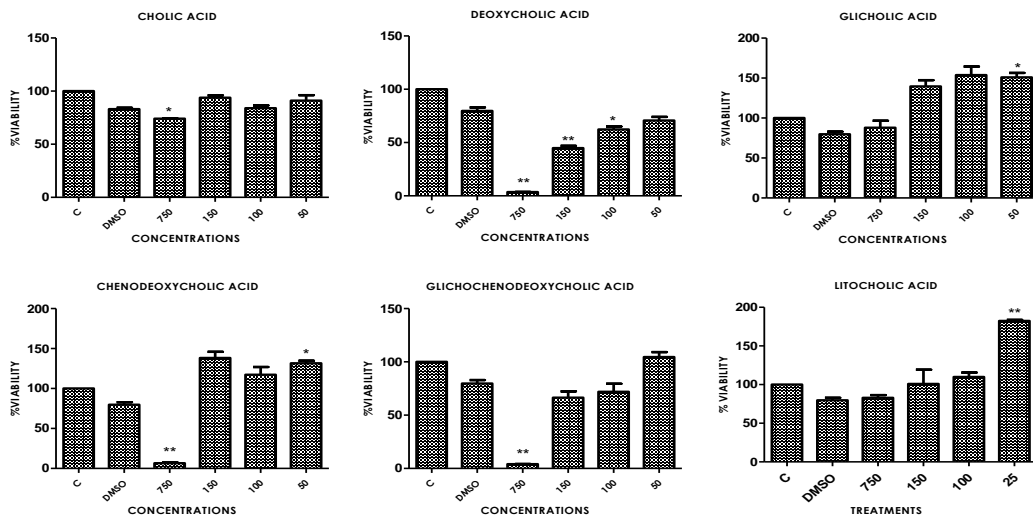


**GRÁFICA 6. VIABILIDAD DE CULTIVOS DE CÉLULAS HEPG2 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ÁCIDOS BILIARES DURANTE 4 H.**

Se muestra el comportamiento de la viabilidad celular tras la exposición del cultivo a las diferentes sales biliares, las más abundantes primarias, conjugadas y secundarias disueltas en DMSO, el cual también fue utilizado como control del vehículo, así como también se incluyó un control del cultivo normal el cual no fue tratado. **A.** Tratamiento con una sal primaria: ácido cólico con el cual observamos que los tratamientos con mayores concentraciones resultan ligeramente lesivos para el cultivo dejando una viabilidad del 75% tras su exposición; sin embargo, concentraciones menores no parecen dañarlo y se semejan al control. En este punto es de notar que hay un cambio importante en la morfología celular, con redondeo de las células, con un citoplasma disminuido, se pierde la integridad de la monocapa ya que algunas células empiezan a despegarse pasando las 4 h sin embargo, las que aún están adheridas aparentemente son viables. **B.** Tratamiento con la sal conjugada: el ácido glicólico muestra una mayor actividad metabólica en las concentraciones menores probadas; sin embargo, no es posible concluir que ese trata de un aumento en el número celular,

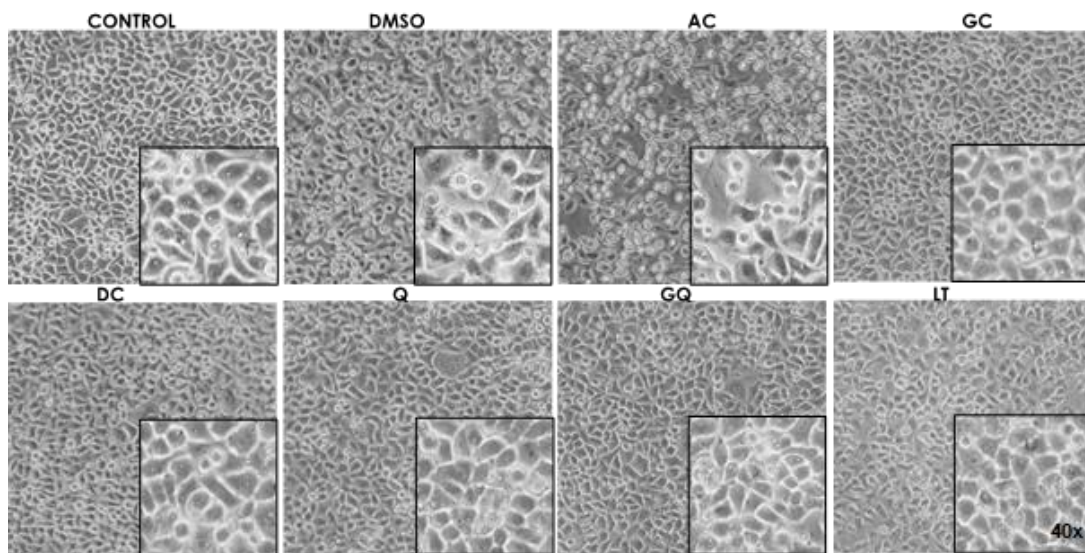


puesto que solo son 4 h de tratamiento. **C.** Tratamiento con la sal secundaria ácido desoxicólico: se observa que, a diferencia de los anteriores, concentraciones mayores a 200  $\mu\text{M}$  destruyeron a las células, mientras que las inferiores la mantuvieron; en el caso de 25 y 50  $\mu\text{M}$  se logra observar 80% de la viabilidad de manera similar a DMSO. **D.** Tratamiento con la sal biliar primaria ácido quenodesoxicólico. En este tratamiento, concentraciones mayores a 270  $\mu\text{M}$  resultaron en la pérdida de la viabilidad del cultivo respecto a los controles, también se observa que con algunas concentraciones se excedió el 100% de la viabilidad **E.** Tratamiento con la sal biliar primaria ácido glicoquenodesoxicólico a diferencia de la sal primaria, observamos que únicamente en la concentración de 50  $\mu\text{M}$  excedió el 100% en la viabilidad y a partir de 250  $\mu\text{M}$  la viabilidad se vio disminuida. Concentraciones menores no resultaron lesivas para el cultivo, sin embargo, la mayoría de éstas quedó ligeramente por debajo de la viabilidad del DMSO. **F.** Tratamiento con la sal secundaria ácido litocólico, para este tratamiento sólo la concentración más alta (750  $\mu\text{M}$ ) resultó en una disminución de la viabilidad cerca del 50%, las demás concentraciones no resultaron lesivas para el cultivo y nuevamente se observó que la viabilidad supera el 100% en las concentraciones menores a 250  $\mu\text{M}$ .

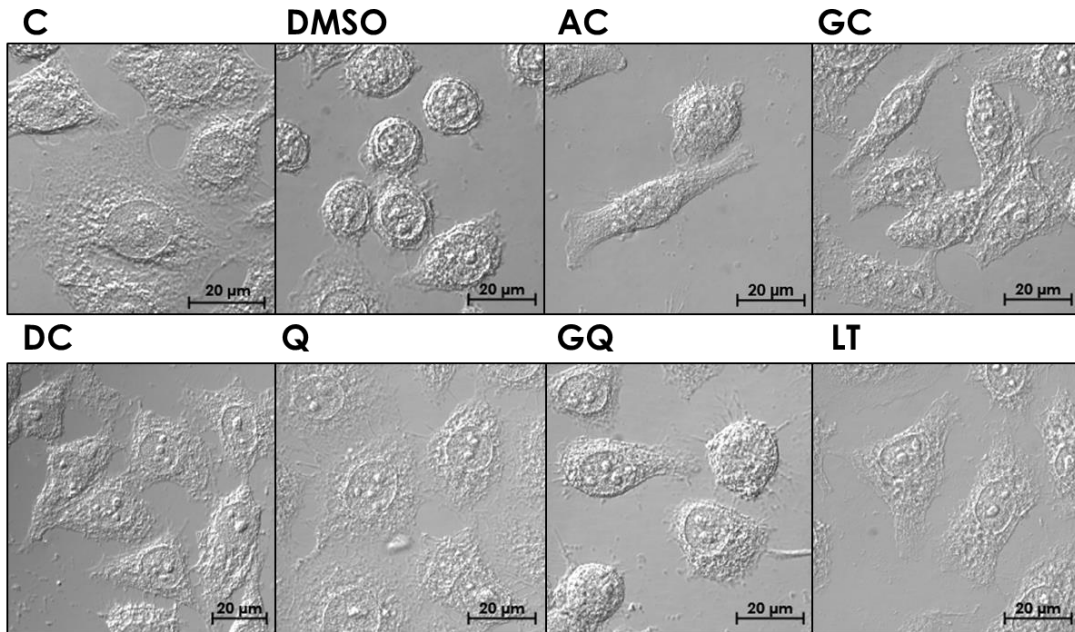


**GRAFICA 7.** Tras la obtención de las viabilidades, se eligieron las siguientes concentraciones de las sales biliares, con las cuales se realizaron los experimentos que se presentaran a continuación: Ácido cólico 750, Ácido desoxicólico 50  $\mu$ M, ácido glicobenodesoxicólico 100  $\mu$ M, ácido quenodesoxicólico 150 M, ácido litocólico 50  $\mu$ M.

A continuación, se muestran las imágenes para apreciar el efecto de los AB sobre la morfología celular (**Figuras 12 y 13**), se observa el efecto de cada uno de los AB's durante 4 h, 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, en las concentraciones seleccionadas. En estas imágenes complementamos lo observado con el ensayo de MTT: DMSO y AC se observan de manera similar al microscopio. Y el resto de los tratamientos son células viables, con características morfológicas similares a las del control.



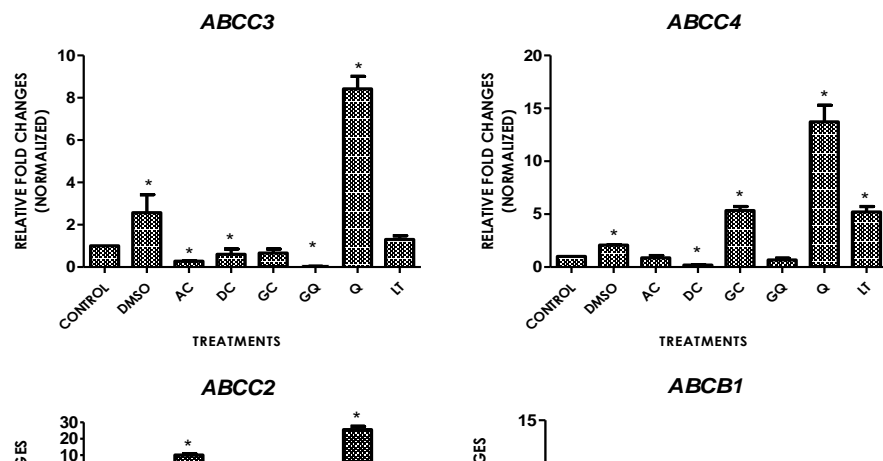
**FIGURA 12. MONOCAPA DE CÉLULAS HEpG2 DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A LAS DIFERENTES SALES BILIARES DURANTE 4 h A 37 °C Y 5% CO<sub>2</sub>.** En el control del vehículo y en el tratamiento con ácido cólico se observan células cuya morfología es diferente a la normal, se aprecia el redondeo de éstas como característica principal, mientras que los demás tratamientos asemejan mucho su morfología a la condición control. 40x



**FIGURA 13. CONTRASTE DIFERENCIAL DE INTERFERENCIAS (DIC) DE CÉLULAS HEpG2 POST TRATAMIENTO CON DIFERENTES ÁCIDOS BILIARES** Se observa con mayor detalle la morfología celular tras los tratamientos, respecto al control normal. Y se confirma lo observación anterior, en DMSO y en ácido cólico hay redondeo de las células, donde hay reducción (o retracción) del tamaño del citoplasma y núcleos con pocos nucleolos. Para los demás tratamientos se observaron células con morfología normal similares al control, con citoplasma íntegro, núcleos y nucleolos bien definidos. Con el ácido quenodesoxicólico se observa un citoplasma con numerosas vacuolas.

## 8.2 Expresión de genes involucrados con el transporte y receptores nucleares activados por AB's

Se realizaron ensayos de RT-qPCR para conocer la expresión de los mRNA de genes que codifican para los transportadores tras la exposición a sales biliares, los resultados se muestran a continuación en la **gráfica 8**.



**GRÁFICA 8. RT-QPCR DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS TRANSPORTADORES DE LA FAMILIA ABC.** ABCC3 (MRP3), ABCC4 (MRP4), ABCC2 (MRP2), ABCB1 (MDR1) respecto a la expresión constitutiva de GAPDH. (\*p<0.05, Prueba de U-Mann Whitney)

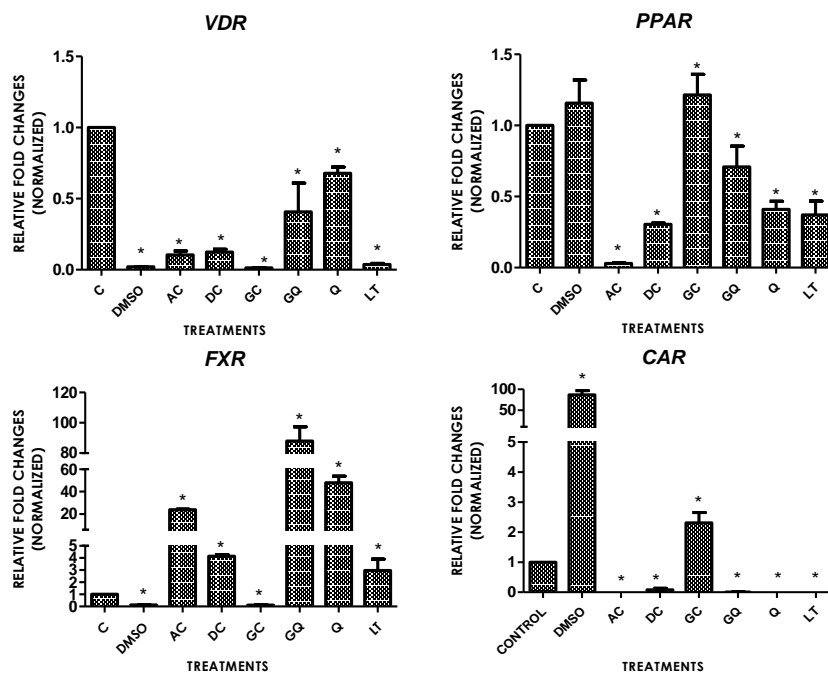
Al analizar los perfiles de expresión a partir de las gráficas obtenidas de los ensayos de RT-qPCR, se observa que el tratamiento con ácido cólico ocasionó una disminución en la expresión de MRP3 y MPR4 (transportadores basolaterales) y un aumento en la expresión de MRP2 Y ABCB1 (transportadores hacia el canalículo).

Ácido glicoquenodesoxicólico disminuyó la expresión del mRNA de los transportadores MRP3 y ABCB1 y aumentó la de MRP4 Y MRP2. Desoxicólico por su parte, disminuyó la expresión de todos los mRNA de los transportadores, mientras que el ácido quenodesoxicólico y el litocólico indujeron la expresión de todos los mRNA evaluados. Ordenando de mayor a menor el aumento de la expresión en cada transportador, generado tras la exposición a cada sal: MRP4 Q>L>GC>AC>GQ>DC; MRP3 Q>LT>GC>DC>AC>GQ; MRP2 Q>AC>LT>GC>GQ>DC; MDR1 Q>GQ>AC>LT>DC>GC. Finalmente, en

	MRP4	MRP3	MRP2	ABCB1
DMSO	+	+	-	+
AC	-	-	+	+
DC	-	-	-	-
GC	+	-	+	-
GQ	-	-	-	+
Q	+	+	+	+
LT	+	+	+	+

**TABLA 6. Expresión de RT-qPCR.** Se resumen las observaciones de las gráficas anteriores.

la **tabla 6** se resumen estas observaciones anotando la ausencia o la presencia de aumento de expresión respecto al control normal.



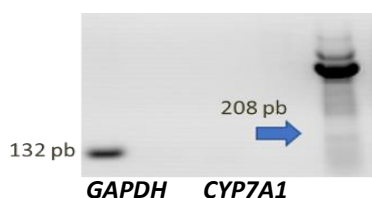
**GRÁFICA 9. RT-qPCR DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES.** VDR (Receptor de la vitamina D), PPAR (Receptor proliferador de peroxisomas), CAR (Receptor constitutivo de androstano), FXR (Receptor Farnesoide) usando como control la expresión de GAPDH. (\* $p < 0.05$ , Prueba de U-Mann Whitney.)

En el caso de la expresión de los mensajeros que codifican para los receptores nucleares, la expresión de VDR y CAR resultó disminuida por la mayoría de los AB. Mientras que las expresiones de PPAR y FXR aumentaron por la mayoría de las especies biliares; siendo que para FXR el orden en aumento: GQ>Q>AC>DC>LT>GC; para PPAR Q>GQ>GC>LT>DC>AC; VDR Q>GQ>DC>AC>LT>GC; CAR GC>DC>GQ, estas observaciones se resumieron en la **tabla 6**.

	VDR	PPAR	CAR	FXR
CONTROL	+	+	+	+
DMSO	-	+	+	-
AC	-	-	-	+
DC	-	+	-	+
GC	-	+	+	-
GQ	-	+	-	+
Q	-	+	-	+
LT	-	+	-	+

**TABLA 7. Expresión de RT-qPCR.**

Resumen las observaciones de las gráficas anteriores.



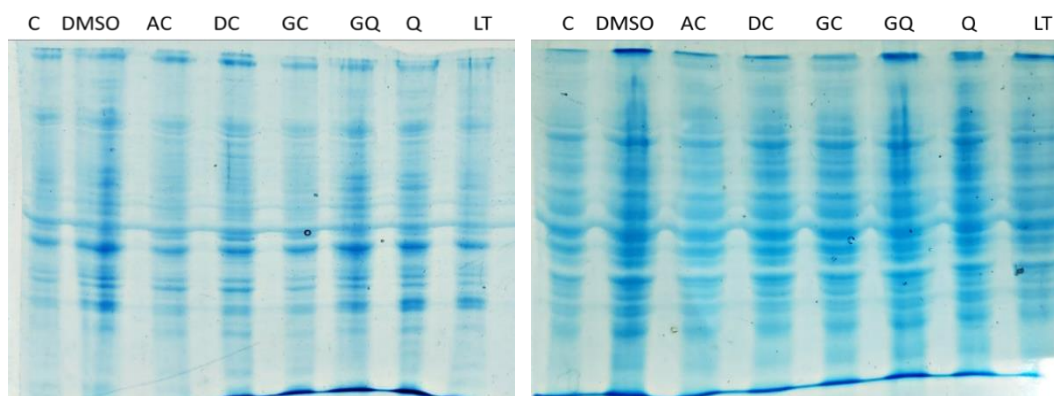
**FIGURA 14. EXPRESIÓN DE CYP7A1.** Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Se indica con la flecha azul a la altura de 208 pb la banda ligeramente teñida que corresponde a CYP7A1. Control interno GAPDH 132 pb

Durante las estandarizaciones de RT-PCR punto final hubo algunas dificultades para amplificar algunos mensajeros, por ese motivo se decidió a hacer PCR punto final y usando como templado DNA genómico de células HEPG2 sin ningún tratamiento, con el kit MyTaq™ de BIOLINE siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la

visualización en geles de agarosa se obtuvo el siguiente gel donde se puede observar una banda tenue que corresponde a 208 pb, el peso esperado para la enzima CYP7A1 (**Figura 14**). Sin embargo, no fue posible su detección al hacer un RT-PCR con RNA, ni con enriquecimientos con oligo dT o el uso de otras enzimas, lo mismo sucedió con otros genes que no pudieron amplificarse como *OSTa/β*, *BSEP*, *NTCP* y *MDR3*, en el apartado de discusión se tratará sobre este hallazgo, en concordancia con los reportes de la literatura sobre este tipo celular.

### 8.3 Análisis de las fracciones proteicas.

Para observar la integridad y la expresión (o ausencia) de alguna proteína causada por el tratamiento con AB's, se procedió a hacer un fraccionamiento celular, tal como fue descrito en la sección anterior,



posteriormente los extractos proteicos se separaron por electroforesis en SDS-PAGE al 12%, bajo las mismas condiciones y los geles se tiñeron con azul de Coomasie para observar las bandas de proteínas. En forma puntual, con esta técnica no se pudo observar ausencia o diferencias entre las bandas del control y los tratamientos. A pesar de los evidentes cambios en la morfología celular, en algunos casos como en el DMSO y acido cólico, se observa la integridad de las bandas, mas no un perfil de bandeado diferente respecto al control normal (**Figura 15**).

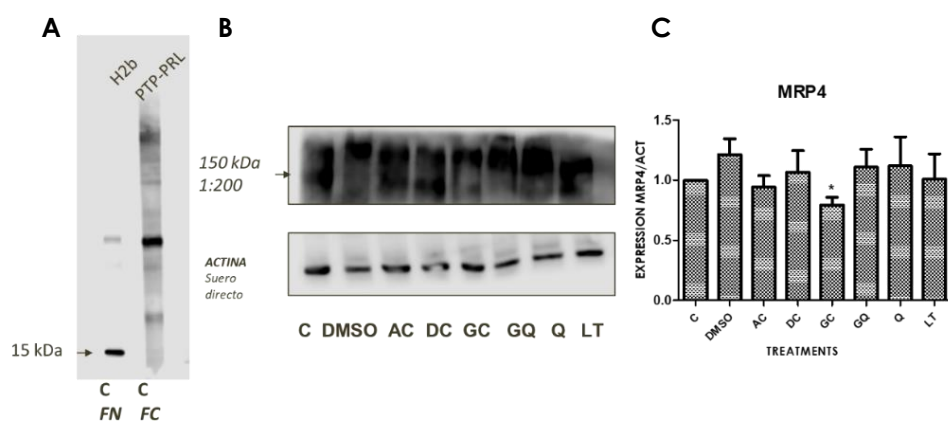
**FIGURA 15. SDS-PAGE 10% DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE CÉLULAS HEpG2 POST- TRATAMIENTO CON CADA UNA DE LOS AB. A.** fracción citoplásmica y B) fracción nuclear de cada uno de los tratamientos tras el fraccionamiento celular, provenientes de la exposición a sales biliares durante 4h. Se observaron integridad en las bandas de proteínas y ninguna expresión visiblemente diferente respecto al control.

### 8.4 Expresión de las proteínas MRP4 y MRP3 tras la exposición a AB

Para conocer la expresión de los transportadores MRP3 y MRP4, se procedió a hacer ensayos de Western blot con extractos de la fracción

citoplasmática de cada uno de los tratamientos, utilizando como control la expresión de actina. **(Figura 16)**

Para el caso puntual de MPR3, no fue posible detectarla a través de Western blot, incluso a diferentes diluciones (1:50-1:200).

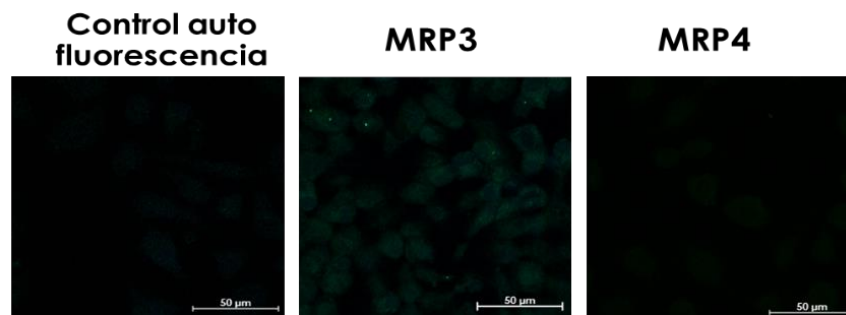


**FIGURA 16. WESTERN BLOT PARA MRP4 Y  $\beta$ -ACTINA DE LA FRACCIÓN CITOPLÁSMICA. A.** Control para la verificación del método de fraccionamiento subcelular de las fracciones citoplásmicas, donde se observa la presencia de la fosfatasa PRL como corresponde en esta fracción, mientras que en la fracción nuclear se observa la histona H2B como es esperado. **B.** Western blot de la fracción citoplásmica para detectar la expresión de MRP4 tras la exposición a cada uno de los tratamientos de AB durante 4 h. **C.** Gráfica correspondiente a la cuantificación densitométrica relativa expresada respecto al control de  $\beta$ -actina de la figura B



#### 8.4.1 Análisis de la localización y expresión de los transportadores MRP3 y MRP4 en cultivos no confluentes tras la exposición a los diferentes AB's

Para la localización de la distribución de estos transportadores en las células HEPG2 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con células crecidas en vidrio y expuestas a los tratamientos durante 4 h para posteriormente ser fijadas y procesadas para su observación mediante microscopía confocal. Los controles internos para evaluar la autofluorescencia y fluorescencia de los anticuerpos secundarios se muestran en la **figura 17**.

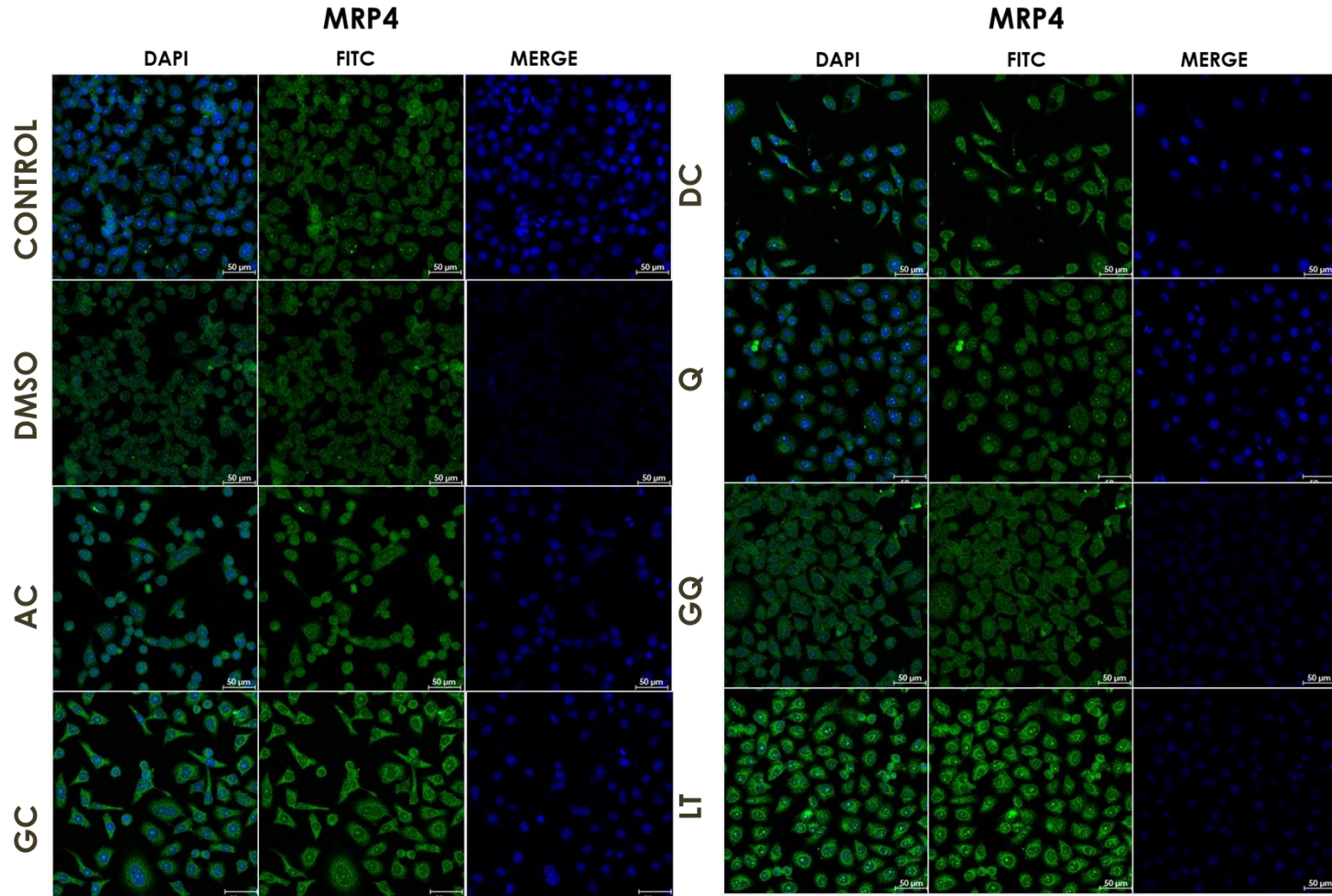


**FIGURA 17. CONTROLES NEGATIVOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.** A) control de auto fluorescencia de células HEPG2. B) control del anticuerpo secundario anti-ratón y C) anticuerpo secundario anti-rata acoplados a FITC

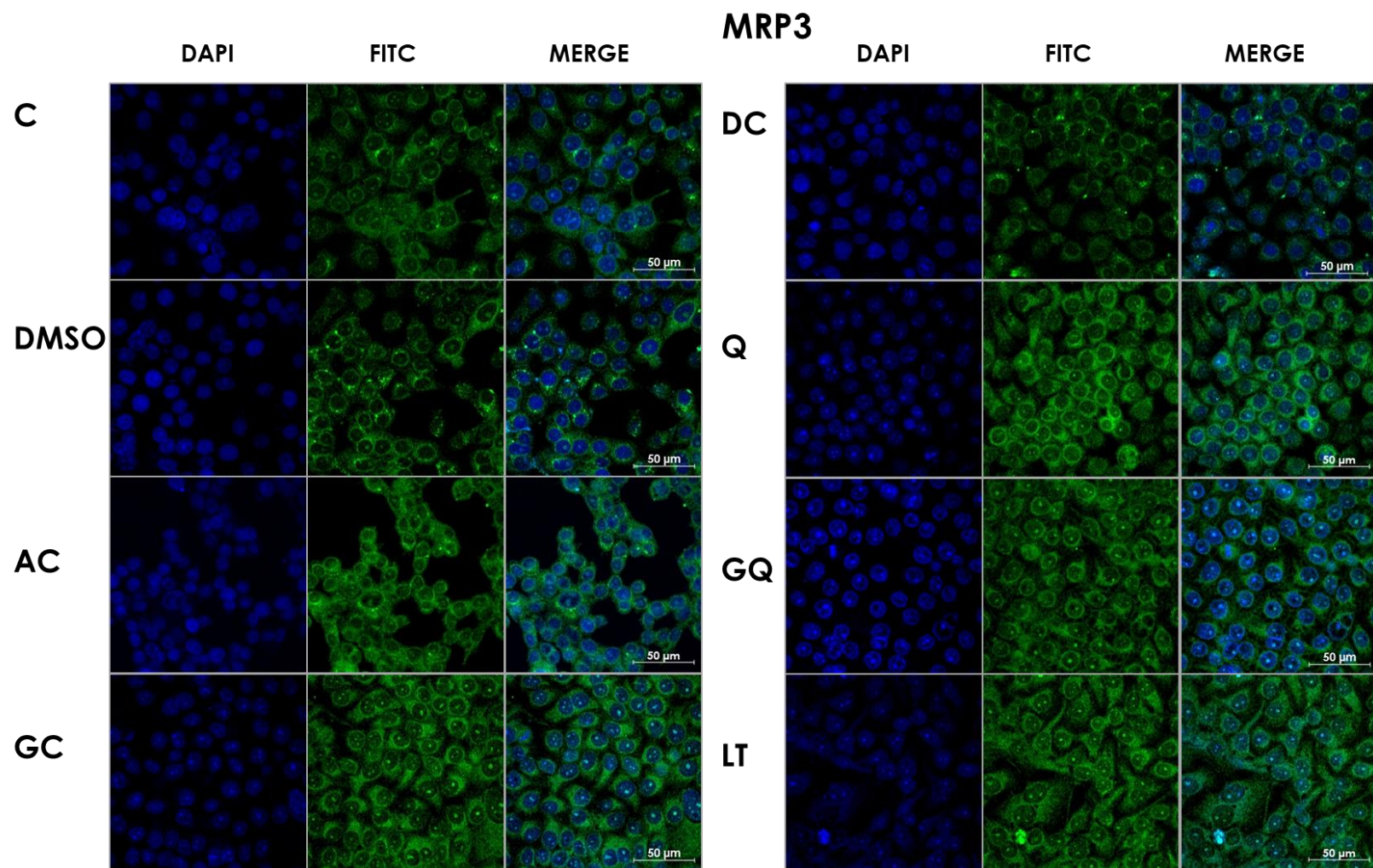
Se muestran imágenes representativas de al menos 6 imágenes que se capturaron por cada tratamiento. Se aprecia la marca de los anticuerpos dirigidos contra MRP4/FITC (**Figura 18**) y MRP3/FITC (**Figura 19**) dentro del citoplasma de manera homogénea y con intensidad variable en cada tratamiento y en la zona que corresponde el núcleo se observa de manera tenue pero homogénea la marca de FITC (con ambos anticuerpos). Las imágenes fueron analizadas en cada uno de sus cortes y proyección máxima y no se observaron eventos diferentes en citoplasma a los descritos anteriormente. En la tinción con DAPI de

los núcleos también se observaron intensidades diferentes según el tratamiento (**Figuras 18 y 19**). Sin embargo, no se observaron daños a la estructura nuclear en ningún tratamiento, tal como se observa con mayor detalle en los crops de cada uno de los tratamientos (**Figuras 20 y 21**).

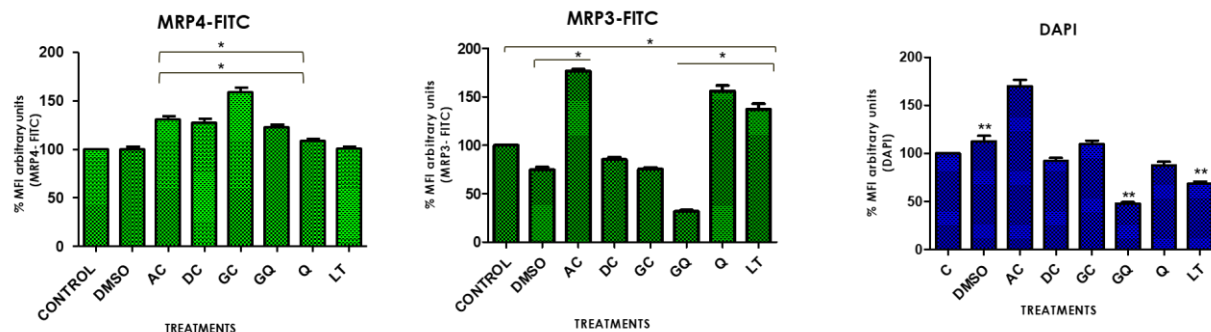
Se realizó una cuantificación de la fluorescencia de las imágenes observadas previamente (**Figuras 18 y 19**), mediante el software Zen y se procedió a graficarlas (**Gráfica 8**). Se observa que en la tinción para MRP4 hay una mayor intensidad de fluorescencia en los tratamientos con AC, DC, GC, GQ, Q, respecto al control normal. Mientras que en el caso de MRP3 hay mayor intensidad de fluorescencia en los tratamientos con AC, Q y LT mientras que con DMSO, DC, GC, GQ hay una disminución de ésta, y para este último es mayor la disminución. En cuanto a la tinción de núcleos, si bien no se observaron anomalías microscópicas, se observó una disminución en la intensidad de la tinción en las laminillas de los tratamientos con DMSO, GQ, Q y LT respecto al control normal que podrían deberse a los tratamientos con estos AB's, puesto que se sabe que son capaces de llegar al núcleo tras la activación de receptores nucleares que se translocan a núcleo.



**FIGURA 18. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE MRP4 EN CÉLULAS TRATADAS CON ÁCIDOS BILIARES.** Las células ( $8 \times 10^5$ ) se colocaron en vidrio, se expusieron a los diferentes AB's durante 4 h; se fijaron y tiñeron con el anticuerpo MRP4 acoplado a FITC y su correspondiente anticuerpo secundario, finalmente se observaron en el microscopio Zeiss y se analizaron los múltiples cortes con los software Blue y Black Zen. Se puede observar la marca de MRP4-FITC (verde) en todo el interior de la célula, en el área que corresponde a los núcleos como una sombra tenue mientras que en los nucleolos se observa con intensidad.



**FIGURA 19. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE MRP3.** Las células ( $8 \times 10^5$ ) se colocaron en vidrio, y se expusieron a los diferentes AB's durante 4 h

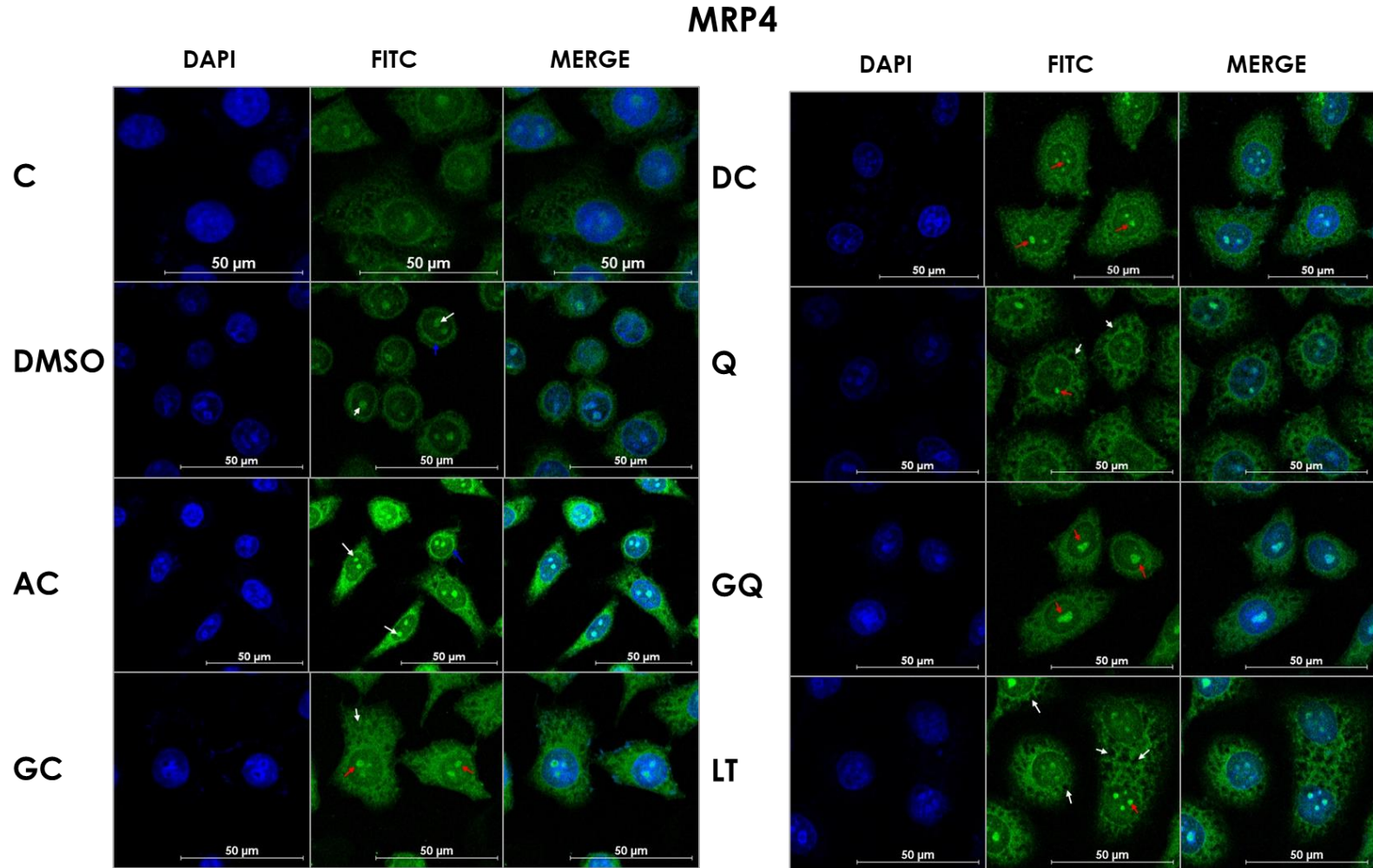


**GRÁFICA 8. Cuantificación en porcentaje de la intensidad media de fluorescencia de los receptores A. MRP4-FITC:** Se encontró un aumento significativo entre los tratamientos AC, DC, GC, GQ respecto a ambos controles, **B MRP3-FITC:** Se encontraron diferencias significativas entre el control respecto al vehículo y todos los tratamientos; mientras que respecto al vehículo DMSO se encontraron diferencias significativas respecto a los tratamientos, AC, GQ, Q, LT. **C. DAPI:** Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos AC, GQ, LT respecto de ambos controles N=20. T3 Dunnette \*p<0.005.

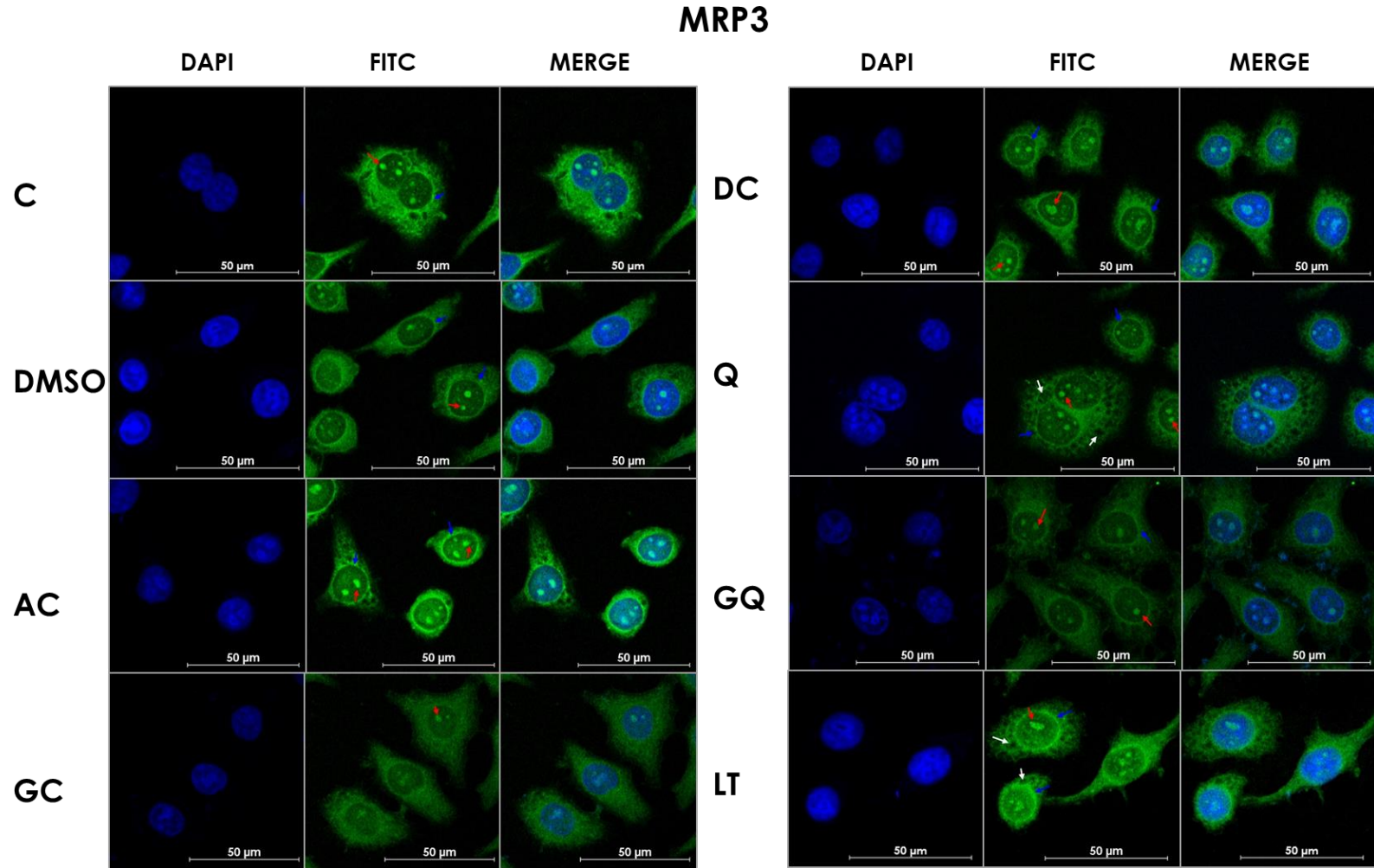
Debido a que la marca de FITC (MRP4-FITC y MRP3-FITC) se observaba de manera predominante en el citoplasma, pero también dentro del área que físicamente corresponde núcleo (como un fondo suave) y para saber si esa marca se encontraba dentro del núcleo, se decidió capturar imágenes con mayor aumento ('crops') para observar a detalle las estructuras celulares, así como la distribución de la marca de los anticuerpos (**Figuras 20 y 21**) y ensayos de co-localización (datos no mostrados).

Las imágenes obtenidas a mayor aumento con 'crops', provenientes de al menos 10 cortes, también fueron analizadas, verificadas corte por corte y nuevamente se observó que la marca se distribuye de manera similar a lo descrito anteriormente. En el caso de los tratamientos con ácido quenodesoxicólico y ácido litocólico, se observa la aparición de vacuolas o estructuras de aspecto redondo que no se tiñen con los anticuerpos MRP4 y MPR3 (**Figuras 20 y 21**), señaladas con flechas blancas. Adicionalmente con flechas rojas se señalan los nucleolos que aparecen teñidos con una intensidad

muy fuerte, mientras que con las flechas azules se indica que la marca pareciera encontrarse en el retículo endoplásmico rodeando al núcleo.



**FIGURA 20. 'CROPS' DE LA LOCALIZACIÓN DE MRP4 POR INMUNOFLUORESCENCIA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.** Células colocadas en vidrio se tiñeron con los anticuerpos dirigidos contra las proteínas MRP4 (A) y MRP3 (B) y sus imágenes capturadas por medio de 'crops' (cortes y aumentos ópticos dentro de la imagen).

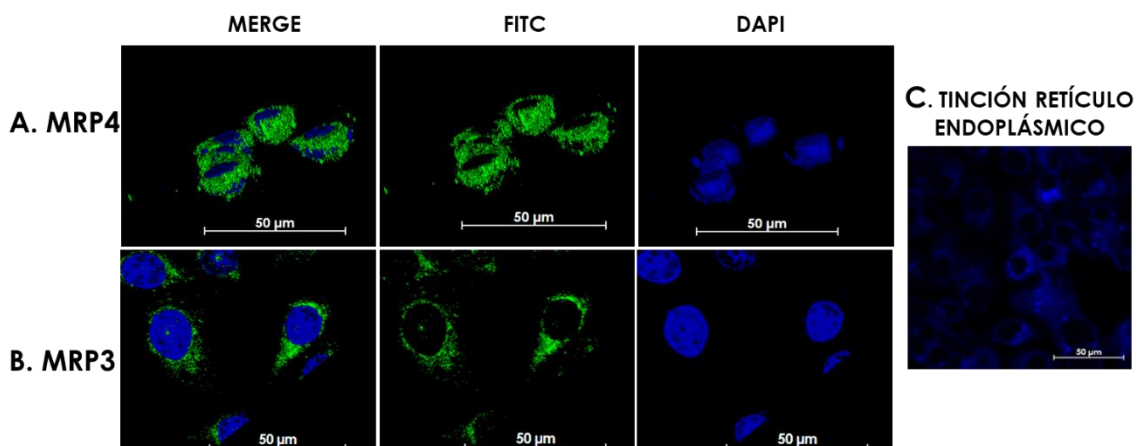


**FIGURA 21.** 'Crops' de la localización de MRP3 por inmunofluorescencia con microscopia confocal.



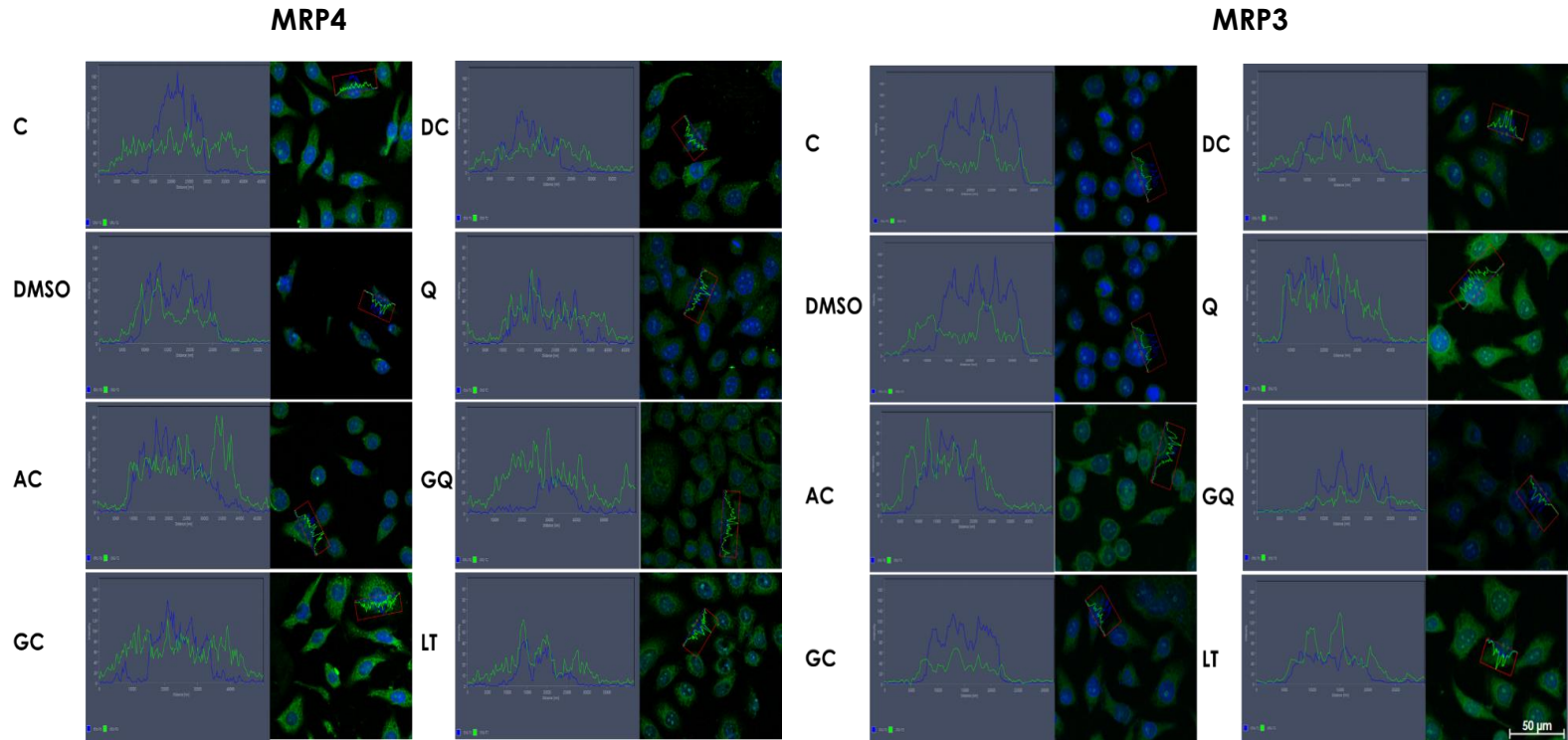
#### 8.4.2 Análisis de co-localización de los transportadores en el núcleo en cultivos no confluentes

Para conocer si MRP3 o/y MRP4 se encontraban en el núcleo, se realizaron reconstrucciones de las células teñidas con los anticuerpos dirigidos a estas proteínas y se adquirieron imágenes con al menos 18-20 cortes para reconstruir una imagen en 3D (**Figura 22**) a través del software Zen Blue (las inmunofluorescencias se prepararon como se describió anteriormente y todas se procesaron de manera similar). Como se puede apreciar, ni MRP3 ni MRP4 se observan dentro del núcleo, se pudo detectar cercanía entre ambas marcas y pareciera que las partes “huecas” que deja FITC son “ocupadas” por DAPI, una sobre otra, mas no en interacción.



**FIGURA 22. Localización de A) MRP4 y B) MRP4 en células HEPG2.** Construcción de la imagen en 3D obtenida por microscopía confocal de al menos 20 cortes de células HEPG2 colocadas en vidrio, fijadas y teñidas para MRP4 **A.** y MRP3 **B.** Se observa de manera inicial en el MERGE **A.** que se encuentran las dos señales (DAPI Y MRP4-FITC o MRP3-FITC), si bien en un primer momento parecen estar juntas o interactuando, al observar los canales en FITC y DAPI por separado se observa que las señales solo están cercanas mas no interactuando, como si una “rellenara” el espacio que deja vacío la otra. **C.** Tinción de retículo endoplásmico de células HEPG2. Células colocadas en vidrio, sin exposición a tratamiento, teñidas con ER tracker® con la finalidad de ilustrar la distribución y localización del retículo en esta línea celular y tener un referente para comparar la ubicación de las proteínas teñidas para MRP3 y MRP4.

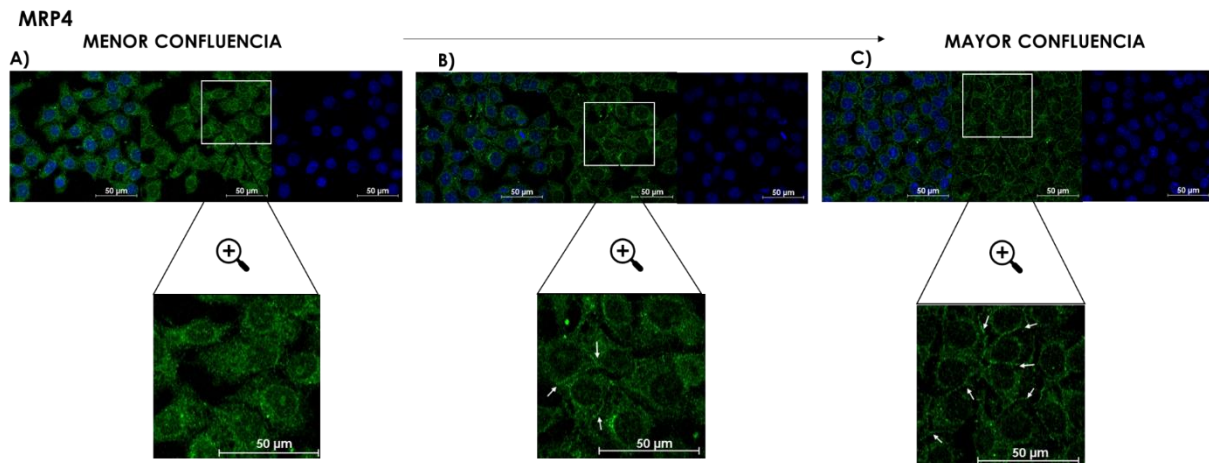
Para complementar estas observaciones se hicieron análisis de los perfiles de fluorescencia de las células HEPG2 expuestas a los diferentes AB's y teñidas con los anticuerpos dirigidos contra las proteínas MRP3 y MRP4. Nuevamente se corrobora que MRP3/FITC y MRP4/FITC no están interactuando con DAPI (en el núcleo) (**Figura 23**); en las gráficas de los perfiles se observa la trayectoria de la fluorescencia de FITC en verde (para las proteínas MRP3 y 4) donde pasa por el citoplasma formando "picos", los cuales son del tamaño correspondiente a la intensidad de la zona, finalmente cuando llega al núcleo forma una "depresión" en la cual se observa que DAPI en color azul forma un "pico" y en ningún momento estas señales se emparejan, es decir se relacionan. Esto se observó en todos los tratamientos en tinciones para ambas proteínas.



**FIGURA 23. Perfiles de fluorescencia de la localización de A) MRP4 Y B) MRP3 detectados con anticuerpos acoplados a FITC (verde), y DAPI (azul) para tinción nuclear.** Análisis de cada uno de los tratamientos en células HEpG2 durante 4 h, llevado a cabo con el software Zen Blue, de las imágenes obtenidas por microscopía confocal. Se puede apreciar en los perfiles (para MRP4 y MRP3) que de manera inicial se muestran picos que corresponden al citoplasma, después siguen picos más grandes que corresponden a la fluorescencia que rodea al núcleo; enseguida se observa un descenso que corresponde al núcleo (donde se observa una fluorescencia ligera) continuada por picos grandes que corresponden a los nucleolos que tienen una fluorescencia fuerte. Sin embargo, con DAPI como es de esperarse, no hay presencia de él en citoplasma, y en núcleo se observan los grandes picos que descienden en los nucleolos, pero en ningún momento se observa que ambas señales se traslapen una sobre otra, lo que sugiere que no hay interacción entre ambos fluorocromos y apoya el hecho de que no exista co-localización entre ambas marcas, es decir MRP3 y MRP4 no co-localizan en el núcleo con DAPI.

### 8.4.3 Análisis de los transportadores MRP3 y MRP4 a diferentes estados de confluencia celular

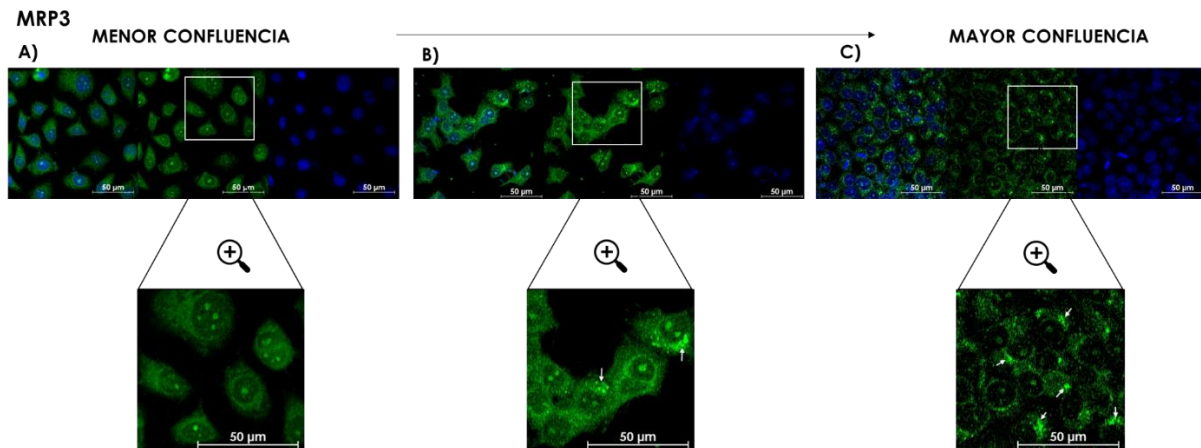
Posteriormente se procedió a realizar la misma metodología de inmunofluorescencia sembrando diferentes densidades de células en los cubreobjetos, sin tratamientos, fijando y tiñendo con los anticuerpos dirigidos contra MRP4 y MRP3. Como se puede observar en la siguiente serie de imágenes (**Figura 24**), a menor confluencia se observa la marca para la proteína MRP4 en todo el citoplasma de forma homogénea y de manera sobresaliente en las regiones de retículo endoplásmico y nucleolos, y de manera tenue haciendo “fondo” en el espacio físico del núcleo, sin embargo al aumentar la confluencia es posible observar en los paneles B y C que la marca se traslada a la zona de la membrana celular (como se describe tradicionalmente en la literatura). En el panel B se observa en el citoplasma, pero no tan intenso como en el A, en el panel C se observa totalmente en la membrana y alrededor del retículo endoplásmico y no de manera homogénea en el citoplasma.



**FIGURA 24. EFECTO DE LA CONFLUENCIA CELULAR EN LA LOCALIZACIÓN DE MRP4 EN CÉLULAS HEpG2.** Diferentes densidades de células se sembraron sobre vidrio, para posteriormente ser

fijadas y teñidas contra MRP4 acoplado a FITC y DAPI. Las imágenes fueron obtenidas a través del microscopio Zeiss y se analizaron con el software Zen Blue, con el cual se hicieron crops (acercamientos) de algunas zonas de la monocapa para apreciar la marca del anticuerpo. **A.** Se observa que a menor densidad la marca del anticuerpo se distribuye en gran parte del citoplasma, creando un ligero fondo en el área que corresponde al núcleo y tiñendo con intensidad el área de los nucleolos. **B.** Se observa que la marca del anticuerpo se localiza en la zona correspondiente a la membrana lateral del hepatocito, tal como está descrito en la literatura. **C.** La marca de la proteína se observa por completo en la zona basolateral y una zona que puede corresponder al retículo endoplásmico, con ausencia de marca en el citoplasma y en los nucleolos.

Consecuentemente, para la proteína MRP3 (**Figura 25**) se observó un fenómeno similar, a baja densidad celular la marca de la proteína se encuentra homogénea en todo el citoplasma, pero a medida que aumenta la confluencia celular, la marca disminuye en el citoplasma y se manifiesta en forma de cúmulos heterogéneos distribuidos de manera azarosa en las células.



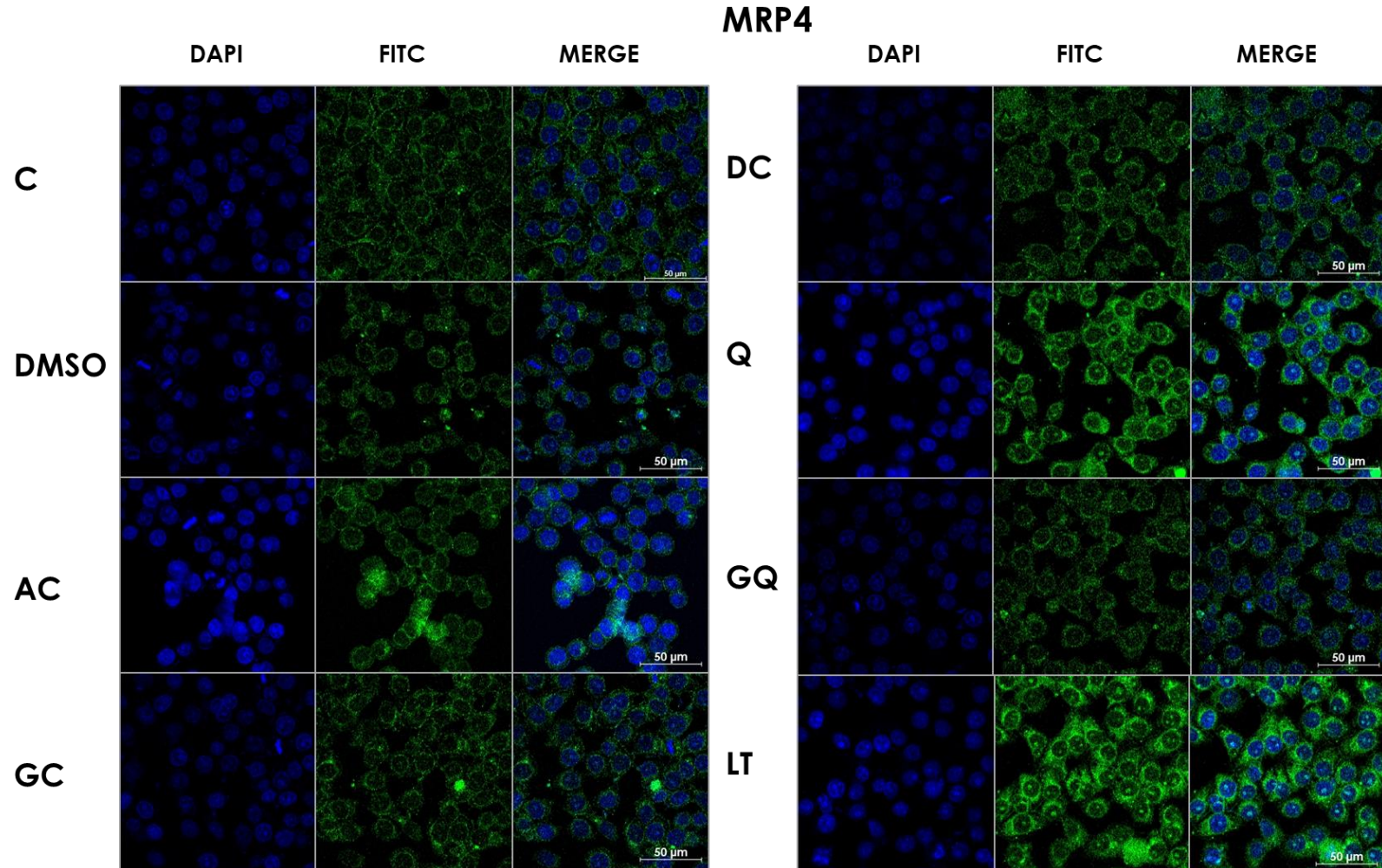
**FIGURA 25. EFECTO DE LA CONFLUENCIA (EN DIFERENTES DENSIDADES DE CULTIVO) EN LA LOCALIZACIÓN DE MRP4 EN CÉLULAS HEpG2 A TRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL.** Diferentes densidades de células se sembraron sobre vidrio, para posteriormente ser fijadas y teñidas contra MRP4 acoplado a FITC y DAPI como se describió anteriormente. Las imágenes fueron obtenidas a través del microscopio Zeiss y analizadas con el software Zen Blue, con el cual se hicieron 'crops' (acercamientos) de algunas zonas de la monocapa para apreciar la marca del anticuerpo. **A.** Se puede observar la tinción pareja en citoplasma con un ligero fondo verde en el núcleo y los nucleolos sobresaliendo por su intensidad de fluorescencia. **B.** La marca se observa en el citoplasma en forma de pequeños cúmulos distribuidos de manera no homogénea en las células y aún se aprecia la marca en los nucleolos **C.** Se observa una gran

*disminución de la intensidad de la marca en citoplasma, la marca rodea el núcleo semejando al retículo endoplásmico, al igual que en forma de manchones muy heterogéneos en las células, los cuales están señalados con flechas blancas (más adelante se explicará a mayor detalle este fenómeno).*

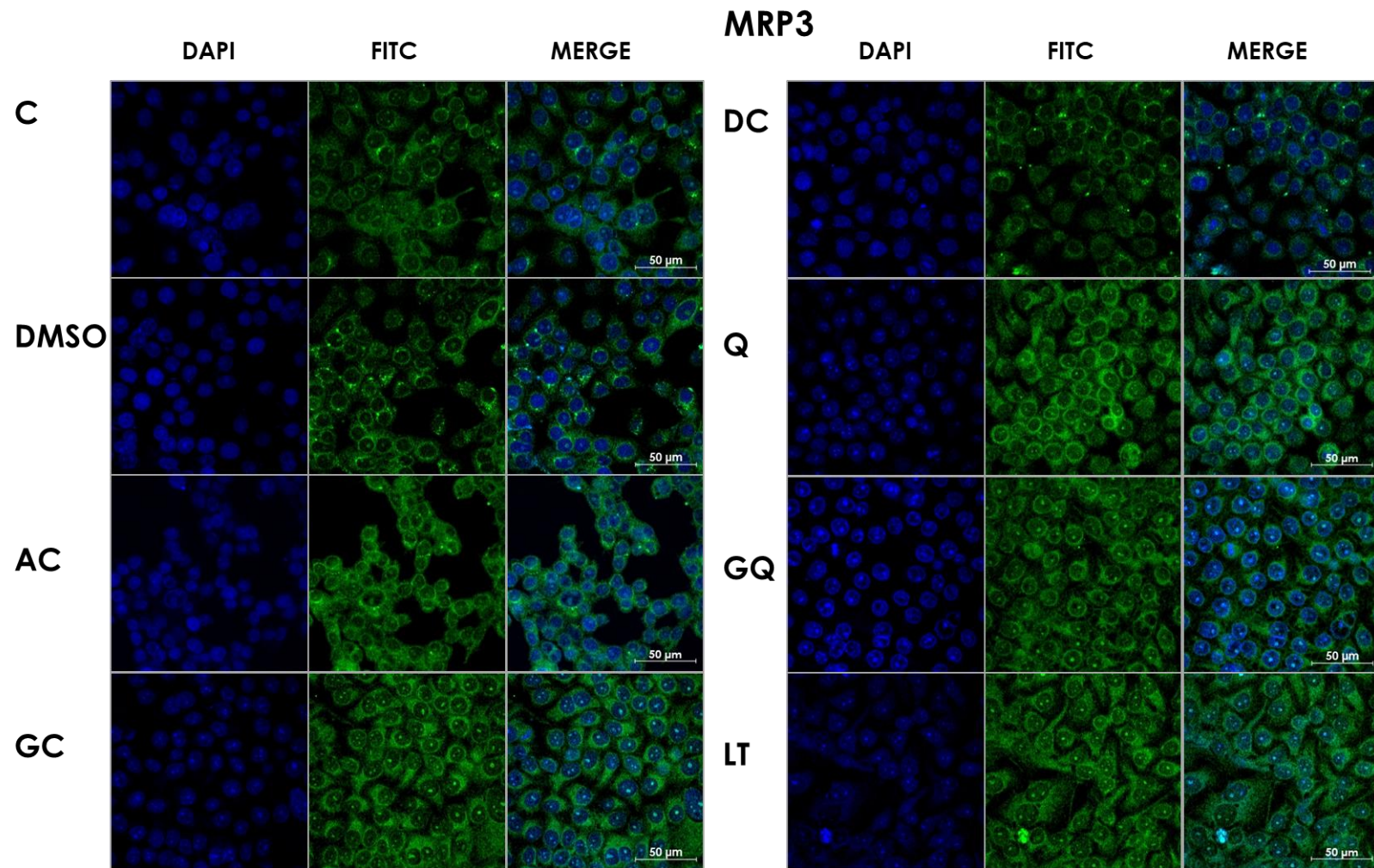
Derivado de estas observaciones podemos inferir que en células HEPG2 la confluencia es un evento que influye en la expresión de las proteínas MRP3 y MRR4.

#### **8.4.4 Análisis de la localización y expresión de los transportadores MRP3 y MRP4 en cultivos confluentes post- tratamiento con los diferentes AB**

A continuación, células HEPG2 se colocaron en cubreobjetos y se cultivaron para permitir que las células llegaran a confluencia; enseguida las células se trataron con las diferentes sales biliares, por duplicado, cada una por separado, y se incubaron durante 4 h a 37° y 5% de CO<sub>2</sub>. Se capturaron imágenes por triplicado de diversas zonas de las laminillas, entre 8-10 cortes de estas laminillas con el microscopio Zeiss y se analizaron con el software Zen Blue. Se muestran imágenes representativas de al menos 6 que se capturaron por cada tratamiento **(Figuras 26-29)**.

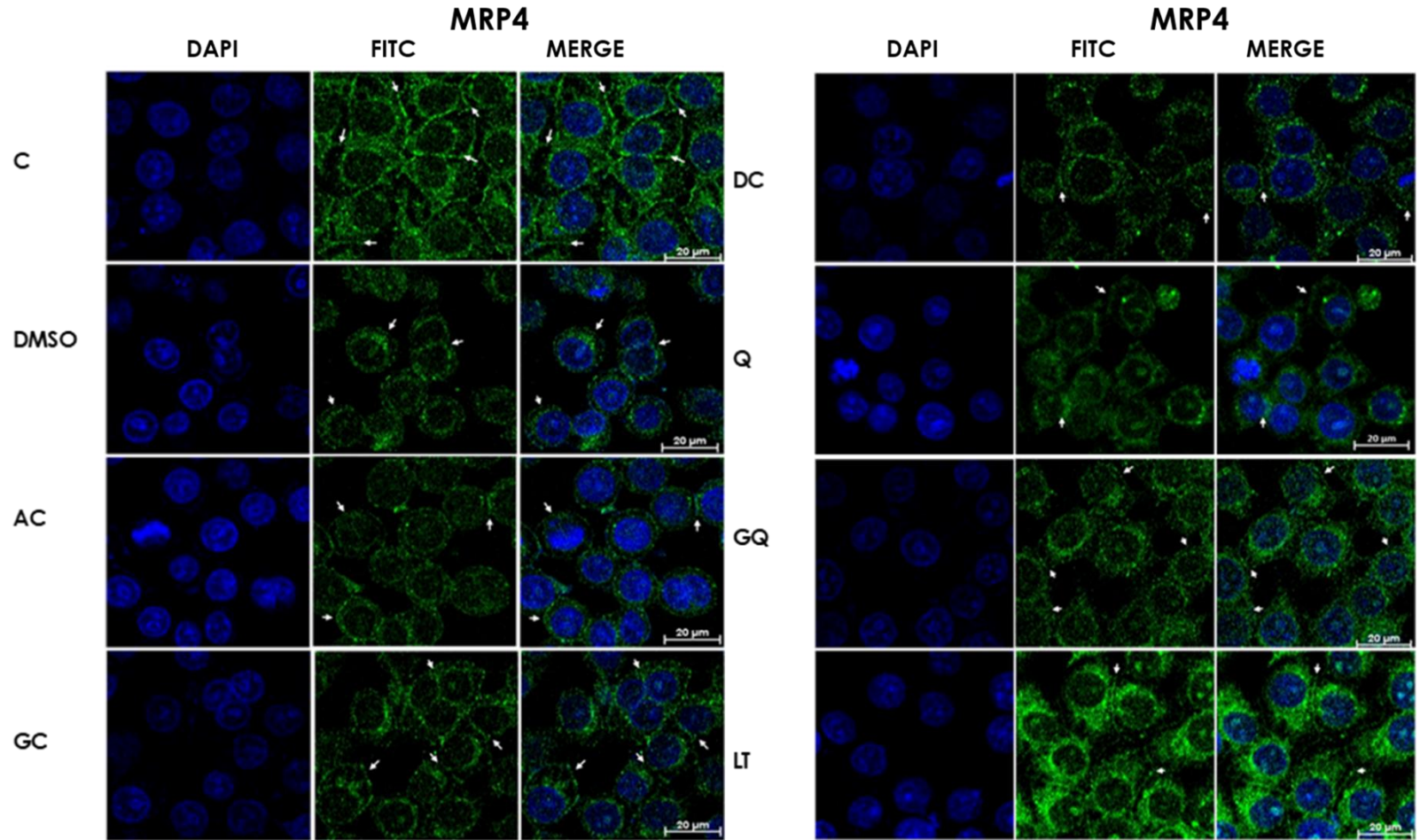


**FIGURA 26. LOCALIZACIÓN DE MRP4 EN CULTIVO CONFLUENTE DE CÉLULAS HEpG2 TRAS EXPOSICIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SALES BILIARES.**

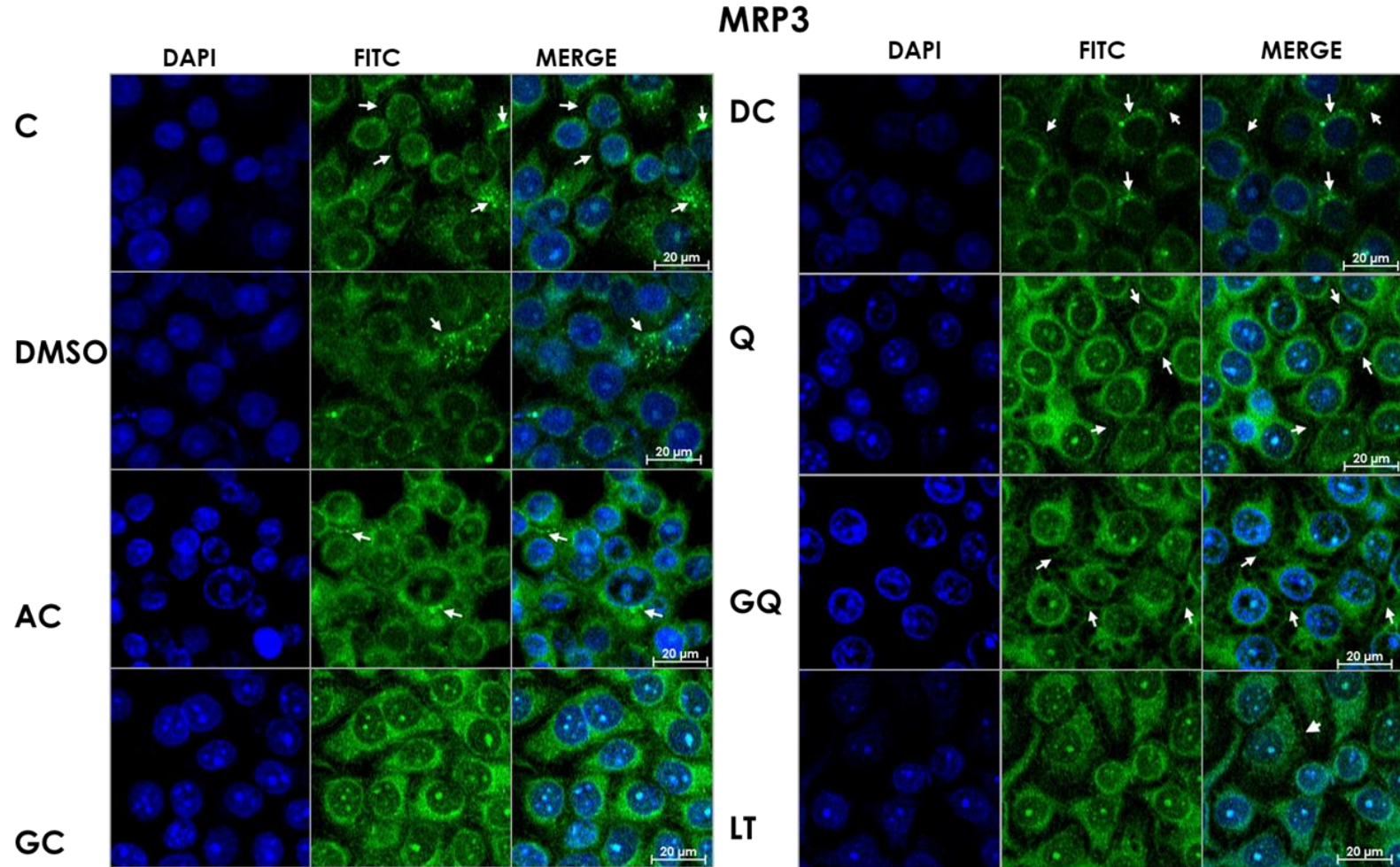


**FIGURA 27. LOCALIZACIÓN DE MRP3 EN CULTIVO CONFLUENTE DE CÉLULAS HEPG2 TRAS EXPOSICIÓN A DIFERENTES SALES BILIARES.**



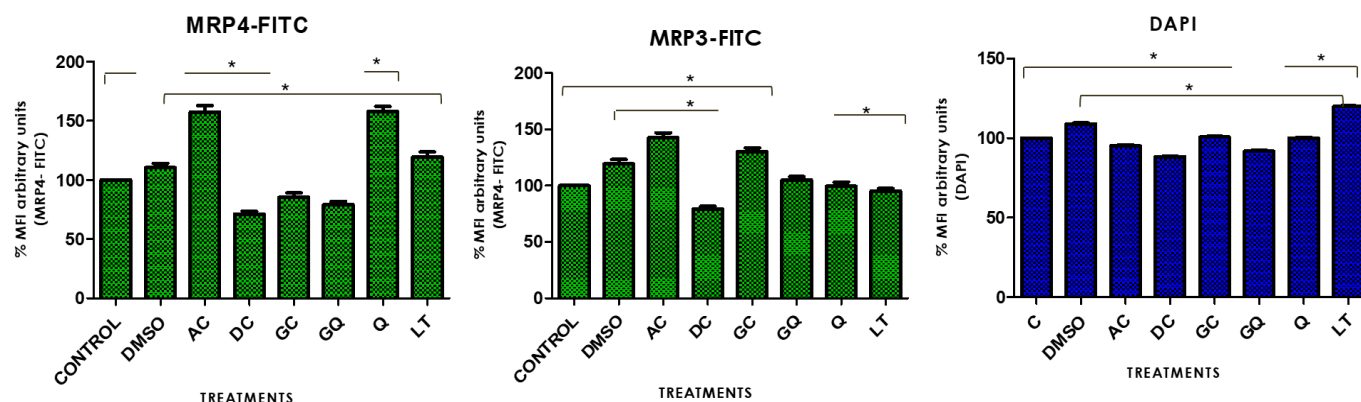


**FIGURA 28. 'CROPS' DE LA LOCALIZACIÓN DE MRP4 EN CULTIVO CONFLUENTE DE CÉLULAS HEpG2 TRAS EXPOSICIÓN A DIFERENTES SALES BILIARES.**



**FIGURA 29. 'CROPS' DE LA LOCALIZACIÓN DE MRP3 EN CULTIVO CONFLUENTE DE CÉLULAS HEpG2 TRAS EXPOSICIÓN A DIFERENTES SALES BILIARES.** Se muestran imágenes adquiridas por microscopía confocal con 'crops' de inmunofluorescencias a través del microscopio Zeiss de al menos 8 cortes, pertenecientes a cultivos crecidos hasta confluencia sobre vidrio y expuestos a

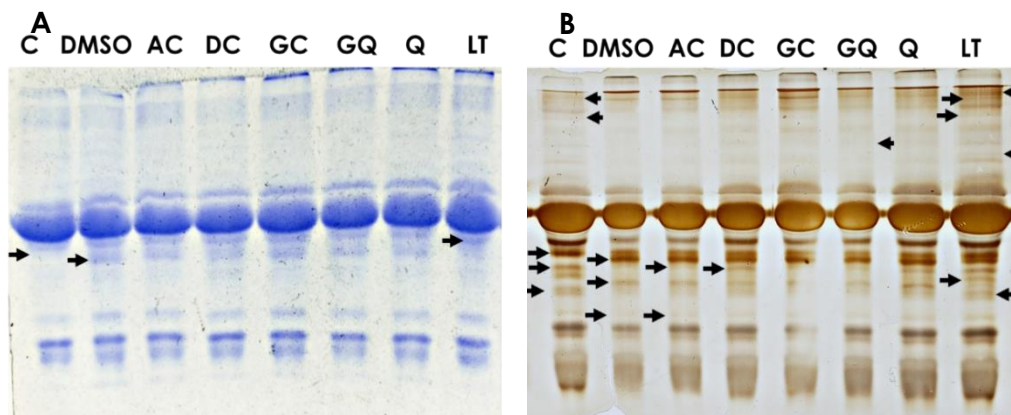
diferentes sales biliares durante 4 h, 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Con flechas blancas se ha indicado la localización de las proteínas de interés. En el panel de MRP4 se puede observar su localización predominante en la membrana basolateral de las células en la mayoría de las células tratadas con un halo en el área que corresponde al retículo endoplásmico a excepción del tratamiento con ácido cólico donde se observa la localización más fuerte en el área que corresponde al retículo endoplásmico. Para el panel MRP3 podemos observar cómo la marca más intensa corresponde al retículo endoplásmico, y las marcas en la membrana resultan tenues y encontramos la aparición de la marca en forma de manchones distribuidos de manera heterogénea, a excepción de los tratamientos con ácido quenodesoxicólico y glicoquenodesoxicólico donde la marca delinea perfectamente la membrana basolateral.



**GRÁFICA 9. A. Cuantificación en porcentaje de intensidad media de fluorescencia de MRP4-FITC.** Se observan diferencias significativas entre el control normal y los tratamientos con AC, DC Y Q. Mientras que todos los tratamientos resultaron diferentes respecto al control del vehículo DMSO. N=20. T3 Dunnette. \* $p < 0.005$ . **B. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de MRP3-FITC.** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos con AC, DC Y GC. Mientras que para el control del vehículo DMSO y los tratamientos con AC, DC, Q y LT resultaron diferentes. N=20. Bonferroni. \* $p < 0.005$ . **C. Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de DAPI.** Se encontraron diferencias significativas entre el control normal y todos los tratamientos, excepto Q. Mientras que respecto al vehículo DMSO todos los tratamientos resultaron diferentes. N=20. Bonferroni. \* $p < 0.005$

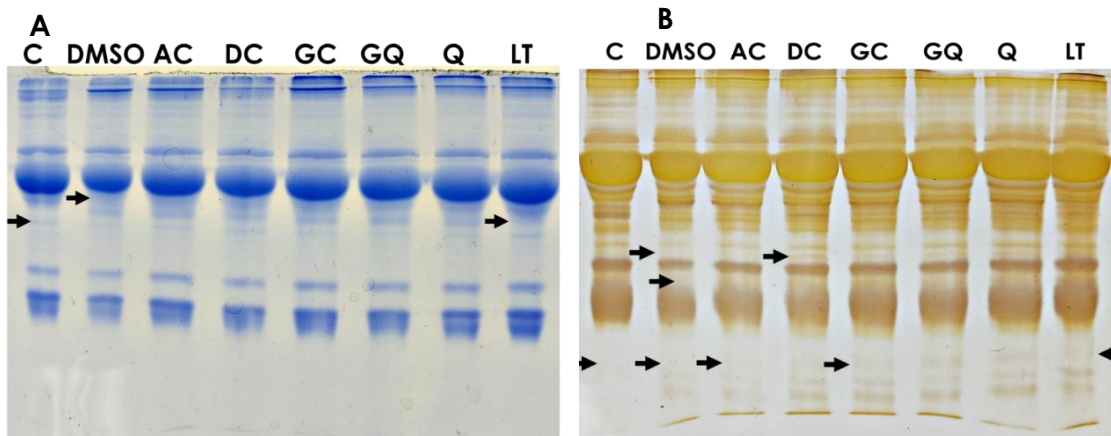
## 8.5 Análisis de proteínas secretadas al medio

Los sobrenadantes de los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de sales biliares se recolectaron por separado y se prepararon para ser analizados por SDS-PAGE a diferentes concentraciones, para observar mejor la presencia de las bandas proteicas como se muestra a continuación (**Figura 30**). Debido a la mayor sensibilidad de la tinción con plata, se procedió a teñir con este reactivo. Como se puede observar en las figuras, la proteína albúmina resulta muy abundante en el sobrenadante debido a que los hepatocitos la sintetizan y excretan, además el medio DMEM Advanced está suplementado con Albumax® dentro de su formulación; cabe mencionar que se intentó crecer este cultivo en DMEM suplementado con suero (sin Albumax), aminoácidos esenciales, no esenciales y glutamina; sin embargo, éste no se adaptó completamente ya que se observó un crecimiento muy lento, precediendo a la muerte del cultivo.



**FIGURA 30. A. GEL SDS-PAGE 10% TINCIÓN CON COOMASSIE** de los sobrenadantes recolectados, procedentes del cultivo de las células HPEG2 tras la exposición a AB's después de 4 h; con flechas se marcan algunas bandas cuya expresión es diferente al control normal (C) o el control del vehículo (DMSO). **B. SDS-PAGE 10% TINCIÓN CON**

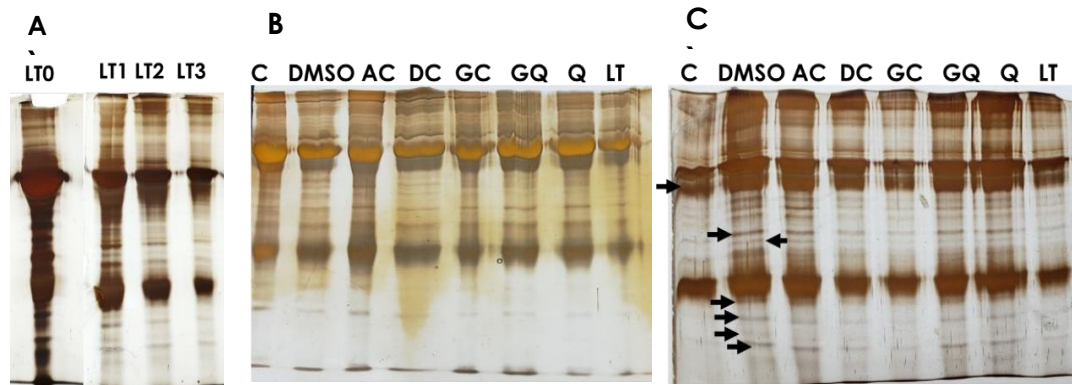
**PLATA.** Con esta técnica se observan con mayor detalle las bandas de menor abundancia, las cuales no pudieron ser detectadas con Coomassie. Con flechas se señalan las bandas cuya expresión es diferente respecto a los controles normal y del vehículo.



**FIGURA 31. A. GEL SDS-PAGE 12% TINCIÓN CON COOMASSIE** de los sobrenadantes recolectados, procedentes del cultivo de las células HPEG2 tras la exposición a AB's después de 4 h. Nuevamente se corrieron las muestras en geles más concentrados para observar las bandas de menor peso molecular, con flechas se indican algunas bandas cuya expresión es diferente al control normal (C) o el control del vehículo (DMSO). **B. SDS-PAGE 12% TINCIÓN CON PLATA** Se observa con mayor detalle la aparición y el despliegue de las bandas de menor abundancia no pudieron ser apreciadas con Coomassie; con flechas se señalan las bandas cuya expresión es diferente respecto a los controles normal y del vehículo.

Como se puede observar en las **figuras 30 y 31**, en geles a diferentes concentraciones, las bandas cercanas a albúmina, tanto de mayor como menor peso no se pueden distinguir debido a ésta. Se necesita teñir más tiempo para que esas bandas puedan ser visualizadas puesto que son menos abundantes, sin embargo, al dejar teñir más tiempo la albúmina genera una mancha más grande aún, e imposibilita su visualización. Debido a esto se realizaron ensayos de depleción y precipitación seriada de albúmina (de 1 hasta 5 depleciones) (**Figura 32**) en un intento por eliminar la mayor cantidad posible de esta proteína y que las demás bandas pudieran apreciarse, sin embargo,

muchas proteínas de interés que en un principio (en geles sin depletar) se expresaban de manera diferente al control, tras 5 depleciones ya no pudieron ser apreciadas.



**FIGURA 32. DEPLECIONES SERIADAS DE ALBUMINA. A. EJEMPLIFICACIÓN DEL EFECTO DE LAS DEPLECIONES SERIADAS DE ALBÚMINA**, SDS PAGE LT0: Tratamiento elegido al azar (LT) sin depleción, LT1: primera depleción de ese tratamiento, LT2: segunda depleción del tratamiento; LT3: tercera depleción del tratamiento **B. Y C. SDS-PAGE 12% TINCIÓN CON PLATA DESPUÉS DE LA QUINTA PRECIPITACIÓN Y DEPLECIÓN SERIADA DE ALBÚMINA**, con flechas se indican las bandas de proteína que se expresan diferente respecto al control, desafortunadamente algunas proteínas que en un principio eran de interés se perdieron durante la precipitación. Si bien es un método efectivo, podría ser que la acumulación de sales que se genera durante el ensayo haya precipitado otras proteínas.

## 11. DISCUSIÓN

Los AB's poseen estructuras químicas similares, exhiben diversas propiedades físicas y características biológicas completamente distintas<sup>37</sup>, son conocidos por su capacidad para ayudar a la solubilización y digestión de xenobióticos lipofílicos, vitaminas liposolubles, ácidos grasos, y también es conocida su capacidad de regular su propia síntesis a través de mecanismos de retroalimentación<sup>38</sup> y con la conversión de colesterol en AB's proporcionan una vía crítica para mantener la homeostasis del colesterol y prevenir su acumulación, así como la de triglicéridos y metabolitos tóxicos, lesiones en el hígado y otros órganos<sup>39</sup>. Sin embargo también han sido implicados en varias enfermedades como la colestasis, cánceres hepáticos e intestinales, cirrosis hepática y diabetes mellitus<sup>38,40</sup>.

Inicialmente se evaluó con ensayos de MTT el efecto de los diferentes AB a diversas concentraciones (25  $\mu$ M hasta 750  $\mu$ M), sobre la viabilidad de cultivos de células HEPG2, una línea celular de hepatocitos provenientes de un caso de hepatocarcinoma celular, utilizando como control del vehículo la máxima cantidad de DMSO utilizada en todos los tratamientos (3.3 % v/v). Se observó que la interacción del cultivo con altas concentraciones (750  $\mu$ M) durante 4h de algunos los siguientes AB: DC, Q, GQ generaron la lisis del cultivo seguramente debido a su composición química, en concordancia con lo reportado en la literatura que los AB's no conjugados (como AC, DC, Q) son generalmente más hidrófobos que sus formas conjugadas correspondientes y se ha demostrado que las concentraciones crecientes de AB's solubilizan las membranas y causan la disociación de las proteínas integrales de la membrana<sup>57,58</sup>. Por el contrario, los tratamientos con CA, GC y LT a esa concentración mantuvieron viabilidades por encima del 74%, lo que demuestra que éstos AB son menos lesivos.

Para los posteriores análisis se eligieron diversas concentraciones de cada uno de los AB's y se incubaron durante 4 h, el tratamiento con 750  $\mu\text{M}$  AC generó cambios morfológicos similares a los del vehículo (DMSO), caracterizados por el redondeo de las células, por lo cual es posible que este efecto se deba más al efecto causado por el vehículo que por el AB.

En el caso de los tratamientos (GC, 50  $\mu\text{M}$  DC, Q, GQ y 50  $\mu\text{M}$  LT) probados a menores concentraciones, no se observaron cambios morfológicos importantes. Los tratamientos con GC, Q y LT a concentraciones medias (150 a 50  $\mu\text{M}$ ) mostraron un aumento en la viabilidad que excedió el 100% en comparación con el control no tratado.

Si bien este ensayo es ampliamente utilizado para medir viabilidad y proliferación, el fundamento del ensayo de MTT es que, para la mayoría de las células viables la actividad mitocondrial es constante y por tanto un aumento o disminución en el número de células viables está relacionado linealmente con la actividad mitocondrial (reductasa mitocondrial: esta actividad mitocondrial se ve reflejada en la conversión de la sal de tetrazolio (MTT) en sales de formazán, la cual se solubiliza para ser medida, entonces cualquier aumento o disminución en el número de células viables puede ser detectado midiendo la concentración de formazán. Considerando que no es posible que las células proliferen en un tiempo corto, dado que el tiempo de duplicación de las células reportado para el cultivo HEPG2 es de 1.98 h<sup>130</sup> y el tiempo de tratamiento es de 4 h, los datos obtenidos sugieren que los AB a estas concentraciones ejercen efecto sobre la actividad metabólica y que tienen efecto sobre la actividad mitocondrial o la producción de estrés oxidativo. Está documentado que la reducción de MTT puede verse afectada de manera significativa por varios factores que incluyen perturbaciones metabólicas y energéticas, estrés oxidativo, cambios en la actividad de las oxidoreductasas o exocitosis y tráfico celular. La



sobreestimación o subestimación de la viabilidad en el ensayo de MTT suele deberse a afecciones metabólicas y mitocondriales de las células sometidas a tratamientos mediados por estrés; de acuerdo con esto, se ha demostrado que múltiples compuestos pueden interferir con la tasa de reducción del MTT dando como resultado inconsistencias. Este tipo de discrepancias en el ensayo de MTT se ha observado tras los tratamientos que estimulan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el agotamiento del glutatión, apertura de poros, transición de la permeabilidad mitocondrial y disminución del ATP<sup>131</sup>. Efectos similares son causados por la exposición a AB's<sup>132</sup> esto puede explicar las sobreestimaciones en los ensayos de MTT después de algunos tratamientos por ejemplo (GC, Q, LT) a concentraciones medias aunque morfológicamente no se detectaran cambios significativos.

Los AB's tanto libres como los conjugados no pueden cruzar las membranas celulares por sí solos, para ello existe un sistema de transporte especial para lo anterior. Son los miembros de la familia de transportadores ABC que participan para mover los AB's tanto hacia dentro como fuera de la célula<sup>62, 63</sup>. En el presente estudio, se evaluó la expresión del mRNA de los transportadores de la familia ABC tras los tratamientos con las diferentes AB's utilizando técnicas de RT-qPCR. En el caso de los transportadores que permiten el flujo de los AB's hacia el canalículo biliar, *MRP2* y *MDR1*, fueron los mayormente inducidas por la mayoría de las especies biliares; así, en orden de inducción por los AB's se determinó que para *MRP2*: Q>AC>LT>GC>GQ>DC y para *MDR1*: Q>GQ>AC>LT>DC>GC y de manera particular se pudo observar que únicamente AC indujo la expresión de estos dos transportadores. En otros estudios coincidentes con nuestros resultados, se ha reportado que Q a 100 µM es capaz de inducir la expresión del gen *MDR1 in vitro* en células del epitelio tubular renal<sup>133</sup>.

En el caso de los transportadores basolaterales, en donde ocurre la salida de los AB's hacia la sangre<sup>134</sup> (sinusoides hepáticos), *MRP4* Q>L>GC>AC>GQ>DC y *MRP3* Q>LT>GC>DC>AC>GQ, se determinó que en ambos casos Q, LT y GC resultaron ser los AB's que indujeron mayormente la expresión de los mensajeros de estos transportadores. En general hay que resaltar que Q y sus derivados son los mayores inductores de la sobreexpresión de los transportadores evaluados, muy posiblemente debido a su estructura química, mientras que DC (50 µM) generó la disminución de todos éstos. La falta de inducción de estos mensajeros a su vez disminuiría el flujo de salida de los AB's y esto probablemente tenga relación con su toxicidad, reportada en fenómenos colestásicos. Además, es conocido que las altas concentraciones de AB's secundarios en las heces, la sangre y la bilis se han relacionado con la patogénesis de los cálculos biliares de colesterol y el cáncer de colon<sup>135</sup>. Lo anterior revela que los requisitos estructurales para el reconocimiento por los transportadores de la familia ABC no son simples, existiendo una gran complejidad en el reconocimiento por el ligando.

Algunos autores han reportado que la regulación positiva de los mensajeros de *MDR1* y *MRP3* en hepatitis viral y en la necrosis de células hepáticas de diferentes etiologías, sugieren que esto puede ser un mecanismo protector general, más que un efecto inducido por toxinas involucradas en patologías<sup>82</sup>.

Los RN's, incluidos CAR, PPAR, VDR y FXR, se activan mediante concentraciones micromolares de AB's y desempeñan papeles en la regulación de los sistemas de transporte hepatobiliar implicados en el metabolismo de los AB's, en líneas celulares y en modelos de colestasis animal<sup>102</sup>. Las reacciones protectoras celulares requieren de un "sensor de AB's" en las células. Se ha reportado que los AB's están directamente

involucrados en la regulación de la expresión génica en el hígado y el intestino a través de la interacción con el receptor nuclear farnesoide, que es el que proporciona dicha función de sensor y que puede ser activado por ligandos estructuralmente diferentes, incluyendo AB's primarios, secundarios y conjugados con glicina o taurina<sup>136</sup>. Al evaluar la expresión de éste encontramos que aumenta su expresión por los AB's en distintas intensidades: FXR: GQ>Q>AC>DC>LT>GC, donde coincidentemente con lo reportado, Q tiene la habilidad de activar fuertemente a FXR humano, y en menor medida AC Y DC y finalmente todavía en menor intensidad LT<sup>136</sup>. Probablemente estas diferencias en el grado de activación se deban a las ligeras diferencias estructurales entre los AB's, aunque provienen de un mismo precursor. En el caso de Q posee un radical R1- $\alpha$ OH y R2-H; DC R1-H y R2- $\alpha$ OH; AC R1- $\alpha$ OH R2-Aoh; LT R1-H y R2-H<sup>136</sup>; al parecer la presencia de R1-OH favorece la activación de este receptor. FXR es un RN clave que controla la síntesis de AB's al suprimir a la enzima *CYP7A1*. También se ha observado que su ausencia produce ausencia de *BSEP* (bomba de exportación de AB) y como respuesta adaptativa a esto, la expresión de *MRP4* se ve aumentada para disminuir la concentración de AB y evitar así la toxicidad dentro de la célula. En el presente trabajo también buscamos la expresión de *BSEP*, sin embargo resultó indetectable para nuestro sistema; en ese sentido, el mRNA de *BSEP* en células HEPG2 se ha reportado que se encuentra severamente disminuido (indetectable) en asociación a la alteración de las isoformas de *FXR2 $\alpha$*  en este tipo celular<sup>137</sup>.

Se ha sugerido que los AB's son importantes reguladores metabólicos de la homeostasis de los lípidos, la glucosa y la energía. Los agonistas de los "Receptor Activado Proliferador de Peroxisomas" (PPAR) regulan el metabolismo de las lipoproteínas, la oxidación de los ácidos grasos, la homeostasis de la glucosa y la inflamación, y por lo tanto se ha encontrado aplicación para estos RN como medicamentos antidiabéticos, para el

tratamiento de la dislipidemia y la resistencia a insulina. Estudios recientes han demostrado que la activación de *PPAR $\alpha$*  altera la síntesis, conjugación y transporte de AB's, y también la síntesis, absorción y transporte inverso de colesterol<sup>43</sup>. En nuestro trabajo, al evaluar *PPAR* encontramos que su sobreexpresión es inducida por los AB's en el orden que sigue *PPAR*: Q>GQ>GC>LT>DC>AC, Q resulta ser uno de los tratamientos que induce su sobre expresión, lo que posiblemente se relaciona en que este RN puede estar funcionando como sensor y auxiliar en la sobrecarga de AB's para evitar la toxicidad intracelular, dado que está documentado que *PPAR* reprime la transcripción de *CYP7A*, lo que resulta en la disminución de la síntesis de AB's<sup>43</sup>.

Otro RN que se evaluó es el Receptor Constitutivo de Androstano (CAR) que también funciona como xenosensor alternativo para defender el cuerpo contra agresiones químicas persistentes, responde a una amplia gama de compuestos químicamente distintos, incluidos endobióticos y xenobióticos, regulando la eliminación de sustancias químicas nocivas y metabolitos tóxicos en el hígado y el intestino, mediante la inducción de genes implicados en su metabolismo. Al medir la expresión de este receptor encontramos que únicamente GC indujo la sobreexpresión de CAR y del control del vehículo DMSO, muy posiblemente también en auxilio a la desintoxicación celular. Está documentado que CAR y PXR (Receptor x Pregnano) regulan los transportadores *Oatp* reflejando así su rol en las vías de desintoxicación, además los roedores deficientes en estos dos RN presentan un alto nivel de AB's que los conduce a daño hepático comparado a su contraparte silvestre<sup>109</sup>.

Se ha documentado que VDR funciona como receptor de AB's secundarios como el ácido litocólico y participa en el metabolismo de los AB's al inducir un mecanismo de desintoxicación del LT en el hígado y el intestino, sin

embargo, en nuestros estudios en células HEPG2 ninguno de los tratamientos indujo la sobreexpresión, por el contrario, disminuyeron comparado con el control de células sin tratar. Por debajo del control quedaron en el siguiente orden VDR: Q>GQ>DC>AC>LT>GC.

Con ensayos de RT-qPCR, nos enfocamos al estudio de dos de los transportadores de las membranas basolaterales de los hepatocitos y que permiten el flujo biliar hacia el torrente sanguíneo: MRP3 y MRP4, los cuales son menos abundantes que los que se encuentran presentes en el canalículo.

El análisis inicial de la expresión de ambos transportadores en la fracción subcelular membranal por medio de western blot en cultivos no confluentes, MRP3 resultó negativo y para MRP4 (en ensayos preliminares) se encontró ligeramente la banda correspondiente; consideramos que esto se relaciona con la poca afinidad que tiene el anticuerpo por epítopes lineales. Por ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia donde tras aplicar los tratamientos y procesar las muestras como fue descrito anteriormente, se observó en todos los tratamientos que el interior celular se teñía por completo incluyendo la zona que corresponde al núcleo, con mayor intensidad en el área que corresponde al retículo endoplásmico y nucleolos, así, la única diferencia notable en los tratamientos fue la variación en la intensidad, donde en el caso de ambos transportadores AC resultó la marca sobre expresada con mayor intensidad de la marca de ambos transportadores.

Con base en los resultados anteriores y para determinar si esta marca estaba co-localizando con el núcleo, se hicieron ensayos de co-localización en cada uno de los controles y los tratamientos, sin embargo el coeficiente de Pearson fue negativo; igualmente se analizaron los perfiles de fluorescencia y con reconstrucciones en 3D, concluyendo finalmente que no había

interacción entre los transportadores y el núcleo, simplemente que las marcas estaban cerca una de la otra, una ocupando (DAPI) el espacio vacío (FITC) que libera la otra.

Se sembraron células en densidades crecientes y al analizar la expresión y localización de MRP3 y MRP4 mediante inmunofluorescencia con microscopía confocal, se observó que a bajas densidades ambos receptores no se encuentran en la localización clásica, sino que se distribuyen por toda la célula; en el caso de MRP4, a medida que aumenta la confluencia celular, la marca de proteína se dirige a su ubicación clásica que es la membrana basolateral; por otro lado, MRP3 se observó en la membrana basolateral y en forma de cúmulos distribuidos en el citoplasma de forma heterogénea, posiblemente en vesículas o compartimentos intracelulares. Un fenómeno similar, en concordancia con nuestros resultados ha sido reportado en las células de la línea HuH7, donde en tiempos de cultivo prolongados, se observa la localización de MRP4 en la membrana basolateral y la de MRP3 de forma atípica que los autores han descrito como atípico, y en compartimentos intracelulares en el citoplasma, esto último en adicionalmente en HEpG2<sup>134,138</sup>. Estas observaciones indican la importancia en la polarización o madurez del cultivo celular que adquiere el cultivo celular a largo plazo al alcanzar la confluencia, lo que permite la correcta expresión y función de estos transportadores y otras funciones descritas para este fenómeno<sup>2</sup>.

En ensayos subsecuentes, luego de alcanzar la confluencia celular, se administraron los tratamientos, se dejaron incubar por 4 h y se analizaron las expresiones de ambos transportadores por western blot, donde Q ligeramente aumentó la expresión de MRP4, mientras que MRP3 no dio positivo, por ello también se analizaron por microscopía confocal donde se observó el marcador perteneciente a MRP4 en la membrana basolateral en

todos los tratamientos, y en el caso de se presentó mayor intensidad del marcador en el citoplasma hacia el retículo endoplásmico (redireccionamiento) y evidentemente existen diferencias en las intensidades de fluorescencia (expresión proteica) según el tratamiento, siendo que AC> Q> LT indujeron la sobreexpresión de MRP4, concordante con lo reportado de la afinidad de MRP4<sup>134</sup>.

Por otro lado, en el caso de MRP3 tras la exposición a los tratamientos, la marca se observó tanto en la membrana lateral como en cúmulos en compartimentos intracelulares con diferencias entre las intensidades de fluorescencia para cada tratamiento (expresión de proteínas) en donde CA> GCA sobre expresaron MRP3 en ese orden.

Cuando analizamos los sobrenadantes colectados tras el tratamiento por medio de SDS-PAGE a diversas densidades, teñidos con Coomasie y plata observamos las bandas pertenecientes a las proteínas, resultó que LT fue el tratamiento que produjo la secreción de más proteínas respecto a los controles y tratamientos, por ello previo a la identificación de estas proteínas diferenciales realizamos depleciones seriadas de albúmina con sales, por ser ésta la proteína más abundante que genera interferencias en la identificación por espectrometría de masas. Sin embargo, al llegar a la quinta depleción resultó ser que varias proteínas de interés se habían precipitado y eliminado juntamente con la albúmina, el cual es uno de los riesgos que supone este método tras varias depleciones.

## 12. CONCLUSIÓN

Finalmente, concluimos que la polarización de los hepatocitos, específicamente de las células HepG2, es un evento importante para la correcta expresión y función de los transportadores de la familia ABC, además de apoyar la importancia de los transportadores basolaterales MRP3 y MRP4, que se sobre-expresan como respuesta adaptativa en ayuda de patologías que involucran sobrecarga de AB's, en enfermedades biliares como la colestasis, con mayor importancia MRP4 que MRP3, cuya expresión aberrante apoya las hipótesis de otros investigadores de que la presencia de éste último juega un rol de tipo compensatorio. De los AB's probados, los ácidos biliares primarios mostraron mayor capacidad de inducción de los transportadores y RN's evaluados, el ácido quenodesoxicólico fue responsable de la sobreexpresión a nivel de RNAm de MRP3 y MRP4 posiblemente por su estructura química, al poseer en su primer radical un grupo  $\alpha$ OH a diferencia de los de más AB's y también es un fuerte activador de FXR, el cual juega un rol importante en la homeostasis de los AB's regulando la expresión de transportadores presentes en la membrana celular controlando el flujo y eflujo de AB's e incluso regulando su propia síntesis, mientras que el otro AB primario, ácido cólico demostró que no es un AB fuertemente tóxico comparado con su derivado secundario, el ácido desoxicólico e indujo la expresión de ambos transportadores (MRP3 y MRP4) a nivel de proteína. Los principales RN's activados por los AB's fueron PPAR y FXR, lo cual coincide con las funciones de desintoxicación y preservación de la homeostasis de estos receptores durante enfermedades colestásicas.



### 13. PERSPECTIVAS

-Determinación de las moléculas secretadas al medio después del tratamiento con AB con especial atención al tratamiento con ácido litocólico y probar en otra línea celular de intestino como CaCo2 dado que éste es un ácido biliar secundario y se encuentra más abundante en intestino.

-Evaluar los efectos sobre los transportadores con las mismas concentraciones para un estudio comparativo entre todo el grupo de ácidos y en un *pool*

#### 14. REFERENCIAS

- [1] Irwin Arias, Allan Wolkoff, James Boyer DS. The Liver: Biology and Pathobiology. 2011. <https://doi.org/10.1002/9780470747919>.
- [2] Treyer A, Musch A. Hepatocyte polarity. *Compr Physiol* 2013;3:243–87. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120009>.
- [3] Weiss L. *Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology*. 6 th. USA: Urban & Schwarzenberg; 1988.
- [4] Weibel ER, Stäubli W, Gnägi HR, Hess F a. Correlated Morphometric and Biochemical Studies on the Liver Cell. *J Cell Biol* 1969;42:68–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.42.1.68>.
- [5] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43. <https://doi.org/10.1002/hep.20969>.
- [6] Yamamoto K, Ogawa K. Fine structure and cytochemistry of lysosomes in the Ito cells of the rat liver. *Cell Tissue Res* 1983;233:45–57. <https://doi.org/10.1007/BF00222231>.
- [7] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247>.
- [8] Senoo H, Yoshikawa K, Morii M, Miura M, Imai K, Mezaki Y. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative – past, present and future. *Cell Biol Int* 2010;34:1247–72. <https://doi.org/10.1042/cbi20100321>.
- [9] Friedman SL. Mac the knife? Macrophages– the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:29–32. <https://doi.org/10.1172/jci23928>.

- [10] Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbé E, et al. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol. Pathol.*, vol. 24, SAGE Publications Inc.; 1996, p. 100–11. <https://doi.org/10.1177/019262339602400114>.
- [11] Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R, Braet F. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells. *Semin Liver Dis* 1997;17:265–86. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1007204>.
- [12] Luo DZ, Vermijlen D, Ahishali B, Triantis V, Plakoutsi G, Braet F, et al. On the cell biology of pit cells, the liver-specific NK cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:1–11. <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i1.1>.
- [13] Matsumura T, Thurman RG. Predominance of glycolysis in pericentral regions of the liver lobule. *Eur J Biochem* 1984;140:229–34. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08091.x>.
- [14] Lawrence GM, Jepson MA, Trayer IP, Walker DG. The compartmentation of glycolytic and gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver and its significance to renal and hepatic metabolism. *Histochem J* 1986;18:45–53. <https://doi.org/10.1007/BF01676198>.
- [15] McKillop D, Butters CJ, Hill SJ, Simons PJ, Edwards TL, Doughty SE. Enzyme-inducing effects of bicalutamide in mouse, rat and dog. *Xenobiotica* 1998;28:465–78. <https://doi.org/10.1080/004982598239399>.
- [16] Gläßer G, Gebhardt R, Gaunitz F. Heterogeneous expression of mRNA in rat liver lobules as detected by differential display. *Histochem Cell Biol* 2000;114:357–62. <https://doi.org/10.1007/s004180000201>.
- [17] Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;360:1155–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7).

- [18] Jones MW, Young M. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Gallbladder*. StatPearls Publishing; 2018.
- [19] Housset C, Chrétien Y, Debray D, Chignard N. Functions of the Gallbladder. *Compr Physiol* 2016;6:1549–77.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c150050>.
- [20] Torsoli A, Corazziari E, Habib FI, Cicala M. Pressure relationships within the human bile tract: Normal and abnormal physiology. *Scand J Gastroenterol* 1990;25:52–7.  
<https://doi.org/10.3109/00365529009093127>.
- [21] Krishnamurthy GT, Krishnamurthy S. Hepatic Bile Entry Into and Transit Pattern Within the Gallbladder Lumen: A New Quantitative Cholescintigraphic Technique for Measurement of Its Concentration Function. *J Nucl Med* 2002;43:901–8.
- [22] Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol* 2013;3:1035–78.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>.
- [23] Toouli J, Buschell M, Stevenson G, Dent J, Wycherley A, Iannos J. Gallbladder emptying in man related to fasting duodenal migrating motor contractions. *Aust N Z J Surg* 1986;56:147–51.  
<https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1986.tb01872.x>.
- [24] Shabanzadeh DM, Sorensen LT, Jorgensen T. A Prediction Rule for Risk Stratification of Incidentally Discovered Gallstones: Results from a Large Cohort Study. *Gastroenterology* 2016;150:156-167.e1.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.002>.
- [25] Andrea C, Enzo A. Cholesterol gallstones larger than 3cm appear to be associated with gallbladder cancer: Identification of a high risk group of patients that could benefit from preventive

cholecystectomy. *Ann Surg* 2016;263:e56.  
<https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001082>.

- [26] Banales JM, Huebert RC, Karlsen T, Strazzabosco M, LaRusso NF, Gores GJ. Cholangiocyte pathobiology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019;16:269–81. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0125-y>.
- [27] Hofmann AF. Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.10046>.
- [28] Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol* 2013;3:1035–78. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120027>.
- [29] Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Compr Physiol* 2013;3:567–98. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120011>.
- [30] Hofmann AF, Mysels KJ. Bile salts as biological surfactants. *Colloids and Surfaces* 1987;30:145–73. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(87\)80207-X](https://doi.org/10.1016/0166-6622(87)80207-X).
- [31] Barbhuiya MA, Sahasrabuddhe NA, Pinto SM, Muthusamy B, Singh TD, Nanjappa V, et al. Comprehensive proteomic analysis of human bile. *Proteomics* 2011;11:4443–53. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100197>.
- [32] Zakarias T, Bunkenborg J, Gronborg M, Molina H, Thuluvath PJ, Argani P, et al. A proteomic analysis of human bile. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:715–28. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400015-MCP200>.
- [33] Hofmann AF. Biliary secretion and excretion in health and disease: Current concepts. *Ann Hepatol* 2007;6:15–27. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31949-0](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31949-0).
- [34] Erlinger S. Review article: New insights into the mechanisms of hepatic transport and bile secretion. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:575–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1996.tb01705.x>.

- [35] Müller M, Jansen PLM. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 1997;272. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.6.g1285>.
- [36] Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: Clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 2005;39. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000155551.37266.26>.
- [37] Monte MJ, Marin JJG, Antelo A, Vazquez-Tato J. Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 2009;15:804–16.
- [38] Alnouti Y. Bile acid sulfation: A pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci* 2009. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn268>.
- [39] Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 2013;3:1191–212. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120023>.
- [40] Hofmann AF, Hagey LR. Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2461–83. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7568-6>.
- [41] Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JMA, et al. Bile acids: From digestion to cancers. *Biochimie* 2013;95:504–17. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.022>.
- [42] de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab* 2013;17:657–69. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.013>.
- [43] Chiang JYL, Li T. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. *PPAR Res* 2009;2009. <https://doi.org/10.1155/2009/501739>.

- [44] Wang DQ-H, Tazuma S, Cohen DE, Carey MC. Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G494–502. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00156.2003>.
- [45] Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:678–93. <https://doi.org/10.1038/nrd2619>.
- [46] Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, et al. Targeted Deletion of FATP5 Reveals Multiple Functions in Liver Metabolism: Alterations in Hepatic Lipid Homeostasis. *Gastroenterology* 2006;130:1245–58. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.02.006>.
- [47] Hofmann AF. Bile acids as drugs: principles, mechanisms of action and formulations. *Ital J Gastroenterol* 1995;27:106–13.
- [48] Hulzebos CV V, Renfurm L, Bandsma RHH, Verkade HJJ, Boer T, Boverhof R, et al. Measurement of parameters of cholic acid kinetics in plasma using a microscale stable isotope dilution technique: application to rodents and humans. *J Lipid Res* 2001;42:1923–9.
- [49] Stellaard F, Sackmann M, Berr F, Paumgartner G. Simultaneous determination of pool sizes and fractional turnover rates, of deoxycholic acid, cholic acid and chenodeoxycholic acid in man by isotope dilution with  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  labels and serum sampling. *Biol Mass Spectrom* 1987;14:609–11. <https://doi.org/10.1002/bms.1200141106>.
- [50] Russell DW. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003;72:137–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>.

- [51] Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD, Russell DW. Disruption of the Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene in Mice. *J Biol Chem* 2000;275:16536–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001811200>.
- [52] Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of Cholesterol Oxidation Products in Human Plasma by Isotope Dilution-Mass Spectrometry. *Anal Biochem* 1995;225:73–80. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1110>.
- [53] Russell DW. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu Rev Biochem* 2003;72:137–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>.
- [54] Mihalik SJ, Steinberg SJ, Pei Z, Park J, Kim DG, Heinzer AK, et al. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J Biol Chem* 2002;277:24771–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203295200>.
- [55] Falany CN, Fortinberry H, Leiter EH, Barnes S. Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J Lipid Res* 1997;38:1139–48.
- [56] Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 2016. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1127483>.
- [57] Coleman R, Lowe PJ, Billington D. Membrane lipid composition and susceptibility to bile salt damage. *BBA - Biomembr* 1980. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90075-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90075-9).
- [58] Heuman DM, Bajaj RS, Lin Q. Adsorption of mixtures of bile salt taurine conjugates to lecithin-cholesterol membranes: implications for bile salt toxicity and cytoprotection. *J Lipid Res* 1996.



<https://doi.org/http://dx.doi.org/>.

- [59] Fujisawa T, Mori M. Influence of various bile salts on  $\beta$ -glucuronidase activity of intestinal bacteria. *Lett Appl Microbiol* 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00180.x>.
- [60] Noh DO, Gilliland SE. Influence of Bile on Cellular Integrity and  $\beta$ -Galactosidase Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J Dairy Sci* 1993. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77454-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77454-8).
- [61] Makishima M, Okamoto a Y, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk a, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999;284:1362–5. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1362>.
- [62] Love MW, Dawson PA. New insights into bile acid transport. *Curr Opin Lipidol* 1998. <https://doi.org/10.1097/00041433-199806000-00007>.
- [63] Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease. *Annu Rev Biochem* 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055>.
- [64] Gopal-Srivastava R, Hylemon PB. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*. *J Lipid Res* 1988.
- [65] Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 1997;26:1667–77. <https://doi.org/10.1002/hep.510260641>.
- [66] Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *AnnuRevPhysiol* 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300>.
- [67] Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, et al. Molecular and functional characterization of an

organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 1995. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90588-X](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90588-X).

- [68] Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2007;453:611–20. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0152-8>.
- [69] Dawson PA, Oelkers P. Bile acid transporters. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:109–14. <https://doi.org/10.1097/00041433-199504000-00009>.
- [70] Bhogal HK, Sanyal AJ. The molecular pathogenesis of cholestasis in sepsis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2013. <https://doi.org/10.1002/nbm.3369.Three>.
- [71] Fuchs M, Sanyal AJ. Sepsis and Cholestasis. *Clin Liver Dis* 2008;12:151–72. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.11.002>.
- [72] Amelsberg A, Schteingart CD, Ton-Nu HT, Hofmann AF. Carrier-mediated jejunal absorption of conjugated bile acids in the guinea pig. *Gastroenterology* 1996;110:1098–106.
- [73] Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. Bile acid-induced liver toxicity: Relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses* 1986. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(86\)90137-4](https://doi.org/10.1016/0306-9877(86)90137-4).
- [74] Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* 1993;17:869–81.
- [75] Perez MJ, Macias RIR, Duran C, Monte MJ, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJG. Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* 2005;43:324–32. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.02.028>.

- [76] Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999.  
<https://doi.org/10.1172/JCI4765>.
- [77] Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790–9.  
<https://doi.org/10.1172/JCI1325>.
- [78] Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998;4:165–78.
- [79] Marin JJG, Barbero ER, Herrera MC, Tabernero A, Monte MJ. Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* 1993;18:1182–92.  
<https://doi.org/10.1002/hep.1840180526>.
- [80] Monte MJ, Barbero ER, Villanueva GR, Serrano MA, Marin JJG. Role of rate-limiting enzymes of nucleotide metabolism in taurocholate-induced DNA synthesis inhibition. *J Hepatol* 1996.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(96\)80073-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(96)80073-0).
- [81] Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006;312:233–6.  
<https://doi.org/10.1126/science.1121435>.
- [82] Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PLM, Roskams TAD. High expression of MDRI, MRPI, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J*

Pathol 2003;200:553–60. <https://doi.org/10.1002/path.1379>.

- [83] Rost D, Mahner S, Sugiyama Y, Stremmel W. Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Liver Physiol* 2002;282:G720–6. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00318.2001>.
- [84] Müller M, Mayer R, Hero U, Keppler D. ATP-dependent transport of amphiphilic cations across the hepatocyte canalicular membrane mediated by mdr1 P-glycoprotein. *FEBS Lett* 1994;343:168–72. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80312-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80312-9).
- [85] Higgins CF. P-glycoprotein and cell volume-activated chloride channels. *J Bioenerg Biomembr* 1995;27:63–70. <https://doi.org/10.1007/BF02110332>.
- [86] Liu Y, Huang L, Hoffman T, Gosland M, Vore M. MDR1 Substrates/Modulators Protect against  $\beta$ -Estradiol-17 $\beta$ -d-Glucuronide Cholestasis in Rat Liver. *Cancer Res* 1996;56.
- [87] Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, et al. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1997;25:1539–42. <https://doi.org/10.1002/hep.510250635>.
- [88] Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JM, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6914–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6914>.
- [89] Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 2007;453:643–59. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0109-y>.

- [90] Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1996;23:1061–6. <https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v23.pm0008621134>.
- [91] Sandusky GE, Mintze KS, Pratt SE, Dantzig AH. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in normal human tissues and carcinomas using tissue microarrays. *Histopathology* 2002;41:65–74.
- [92] Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y. Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 1999;274:15181–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15181>.
- [93] Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem* 2000;275:2905–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2905>.
- [94] König J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999;29:1156–63. <https://doi.org/10.1002/hep.510290404>.
- [95] Kool M, van der Linden M, de Haas M, Scheffer GL, de Vree JML, Smith AJ, et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:6914–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6914>.
- [96] Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 2003;22:7537–52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206953>.
- [97] Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL. Cellular localization and up-

regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 2001. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23501>.

- [98] Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 by bile acids and organic anions. *J Biol Chem* 2003;278:23529–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303515200>.
- [99] Donner MG, Keppler D. Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001;34:351–9. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.26213>.
- [100] Zelcer N, Wetering K Van De, Waart R De, Scheffer GL, Marschall HU, Wielinga PR, et al. Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *J Hepatol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.07.022>.
- [101] Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731–44.
- [102] Chai J, Luo D, Wu X, Wang H, He Y, Li Q, et al. Changes of Organic Anion Transporter MRP4 and Related Nuclear Receptors in Human Obstructive Cholestasis. *J Gastrointest Surg* 2011;15:996–1004. <https://doi.org/10.1007/s11605-011-1473-2>.
- [103] Gernot Zollner †, Hanns-Ulrich Marschall ‡, Martin Wagner † and Michael Trauner\* †. Role of Nuclear Receptors in the Adaptive Response to Bile Acids and Cholestasis: Pathogenetic and Therapeutic Considerations 2006. <https://doi.org/10.1021/MP060010S>.
- [104] Mennone A, Soroka CJ, Cai S-Y, Harry K, Adachi M, Hagey L, et al.

Mrp4<sup>-/-</sup> mice have an impaired cytoprotective response in obstructive cholestasis. *Hepatology* 2006;43:1013–21. <https://doi.org/10.1002/hep.21158>.

- [105] Zollner G, Wagner M, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, et al. Expression of bile acid synthesis and detoxification enzymes and the alternative bile acid efflux pump MRP4 in patients with primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2007;27:920–9. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01506.x>.
- [106] Chiang JY. Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 2002;23:443–63.
- [107] Bhalla S, Ozalp C, Fang S, Xiang L, Kemper JK. Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1 $\beta$ . Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem* 2004;279:45139–47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405423200>.
- [108] Ortega-Domínguez B, Herrera-Ramírez M, Tecalco-Cruz AC. Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma. *TIP* 2015;18:131–43. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.005>.
- [109] Dash AK, Yende AS, Kumar S, Singh SK, Kotiya D, Rana M, et al. The Constitutive Androstane Receptor (CAR): A Nuclear Receptor in Health and Disease. *J Endocrinol Reprod* 2014;18:59–74.
- [110] Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 2007;28:940–6. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl249>.
- [111] Guo GL, Lambert G, Negishi M, Ward JM, Brewer HB, Kliewer SA, et al. Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor,

and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem* 2003;278:45062–71.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307145200>.

- [112] Beilke LD, Aleksunes LM, Holland RD, Besselsen DG, Beger RD, Klaassen CD, et al. Constitutive androstane receptor-mediated changes in bile acid composition contributes to hepatoprotection from lithocholic acid-Induced liver injury in mice. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1035–45.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.023317>.
- [113] Makishima M. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* (80- ) 1999;284:1362–5.  
<https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1362>.
- [114] Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 2007;24:1803–23.  
<https://doi.org/10.1007/s11095-007-9289-1>.
- [115] Chiang JYL. Bile acid regulation of gene expression: Roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 2002;23:443–63.  
<https://doi.org/10.1210/er.2000-0035>.
- [116] Han S, Chiang JYL. Mechanism of vitamin D receptor inhibition of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2009;37:469–78.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.025155>.
- [117] Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: Pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 2006;3:231–51. <https://doi.org/10.1021/mp060010s>.
- [118] Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya



S, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. Arch Toxicol 2013.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>.

[119] Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, Guzmán C, Castell J V., Donato MT, et al. Human upcyte hepatocytes: Characterization of the hepatic phenotype and evaluation for acute and long-term hepatotoxicity routine testing. Toxicol Sci 2016.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw078>.

[120] Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2014.  
<https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>.

[121] Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. Protoc. Vitro. Hepatocyte Res., Springer New York; 2015, p. 77–93.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5).

[122] Sormunen R, Eskelinen S, Lehto VP. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. Lab Investig 1993.

[123] Javitt NB. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. FASEB J 1990.  
<https://doi.org/10.1096/fasebj.4.2.2153592>.

[124] Guo L, Dial S, Shi L, Branham W, Liu J, Fang JL, et al. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. Drug Metab Dispos 2011. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035873>.

- [125] Jover R, Bort R, Gómez-Lechón MJ, Castell J V. Re-expression of C/EBP $\alpha$  induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett* 1998. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00746-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00746-7).
- [126] Rodríguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell J V., et al. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: Molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 2002. <https://doi.org/10.1080/00498250210128675>.
- [127] Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* 2007. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014902>.
- [128] Donato M, Jover R, Gómez-Lechón M. Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering. *Curr Drug Metab* 2013. <https://doi.org/10.2174/1389200211314090002>.
- [129] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- [130] Louisa M, Suyatna F, Wanandi S, Asih PS, Syafruddin D. Differential expression of several drug transporter genes in HepG2 and Huh-7 cell lines. *Adv Biomed Res* 2016;5:104. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.183664>.
- [131] Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 2015;574:193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>.

- [132] Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorak K. Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 2009;15:3329. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.3329>.
- [133] Kneuer C, Honscha W, Gäbel G, Honscha KU. Adaptive response to increased bile acids: induction of MDR1 gene expression and P-glycoprotein activity in renal epithelial cells n.d. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0235-1>.
- [134] Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G640-9. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00354.2005>.
- [135] McGarr SE, Ridlon JM, Hylemon PB. Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: A review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:98–109. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000150240.26758.86>.
- [136] Kuipers F, Claudel T, Sturm E, Staels B. The Farnesoid X Receptor (FXR) as modulator of bile acid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5:319–26. <https://doi.org/10.1023/B:REMD.0000045103.00467.9a>.
- [137] Chen Y, Song X, Valanejad L, Vasilenko A, More V, Qiu X, et al. Bile salt export pump is dysregulated with altered farnesoid X receptor isoform expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:1530–41. <https://doi.org/10.1002/hep.26187>.
- [138] Carrasco-Torres G, Fattel-Fazenda S, López-Alvarez GS, García-Román R, Villa-Treviño S, Vásquez-Garzón VR. The transmembrane transporter ABCC3 participates in liver cancer progression and is a potential biomarker. *Tumor Biol* 2016;37:2007–14. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3999-5>.

