



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
PAPEL DE LA VÍA DE HGF/MET EN LA
ENFERMEDAD HEPÁTICA COLESTÁSICA

Autor: Irene de la Hoz Peña

Fecha: Julio 2020

Tutor: Aránzazu Sánchez Muñoz

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	3
2	INTRODUCCIÓN.....	4
2.1	 ÁCIDOS BILIARES.....	4
2.2	 ENFERMEDAD HEPÁTICA COLESTÁSICA.....	6
2.3	 VÍA DE SEÑALIZACIÓN HGF/MET.....	9
2.3.1	 HGF	9
2.3.2	 Receptor Met	10
2.3.3	 Vía HGF/Met	10
3	OBJETIVOS	12
4	MATERIAL Y METODOS.....	12
5	RESULTADOS Y DISCUSION.....	12
6	CONCLUSIONES	17
7	REFERENCIAS	18

1 RESUMEN

La unión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a su receptor Met con actividad tirosina quinasa activa una serie de rutas bioquímicas con diversas funciones entre las que destacan la proliferación y supervivencia celular.

La enfermedad hepática colestásica es un síndrome clínico en el que se produce obstrucción o reducción del flujo biliar y que se presenta en diversas patologías. El acúmulo de sales biliares con el que cursa puede llevar a daño de hepatocitos y en último lugar a fallo hepático.

La vía HGF/Met es considerada una diana terapéutica importante que está actualmente en estudio gracias a su acción reparadora de daño tisular y acción preventiva del mismo. El papel sobre la supervivencia celular y la reparación tisular está mediado por las proteínas antiapoptóticas cuya expresión es inducida por esta vía, así como la protección frente al estrés oxidativo con el que cursan muchas de estas patologías, ya que la vía lleva a la activación de moléculas que controlan el estado redox basal de las células.

Múltiples estudios han aportado información sobre el importante papel de HGF en la protección frente al daño hepático, por lo que se está trabajando en estrategias terapéuticas dirigidas a esta vía a nivel de prevención y tratamiento en estas patologías.

ABSTRACT

The binding of the hepatocyte growth factor (HGF) to its tyrosine kinase receptor Met activates several biochemical pathways that promotes various biological activities and functions including cell proliferation and survival.

Cholestasis is a clinical syndrome consisting in obstruction or reduction of bile flow that is present in various pathologies. The accumulation of bile acids can lead to hepatocyte damage and ultimately liver failure.

For this reason, the HGF/Met pathway is considered an important therapeutic target that is currently being studied due to its preventive and regenerative action against tissue and cell damage. The role it plays in cell survival and tissue repair is mediated by the anti-apoptotic proteins whose expression is induced by this pathway, as well as the protection against oxidative stress, as this pathway leads to the activation of molecules that control the basal redox state of the cells.

Multiple studies have provided information about the importance of HGF in protection against liver damage, which is leading to the development of its use in therapeutic strategies directed at this pathway both for prevention and treatment of these pathologies.

2 INTRODUCCIÓN

El hígado es una glándula localizada en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, bajo el diafragma, protegido por las costillas y recubierto por la cápsula de Glisson, una cápsula de tejido conectivo fibroso que divide el órgano en lóbulos y lobulillos mediante la formación de tabiques.(1) Entre sus funciones se encuentran la captación, almacenamiento y distribución de nutrientes y vitaminas a través del torrente sanguíneo, el metabolismo de los hidratos de carbono, compuestos nitrogenados y lípidos, el almacenamiento de glucógeno, la biosíntesis de aminoácidos, urea y nucleótidos, la secreción de bilis y la detoxificación. Mantiene las concentraciones sanguíneas de glucosa y de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, very low density level).

Al ser un órgano tan esencial, las enfermedades hepáticas tanto por infecciones víricas, por drogas, o por otras patologías suelen tener un desenlace fatal, siendo una importante causa de muerte. (2,3)

En cuanto a su organización, el hígado está dividido en dos lóbulos, derecho e izquierdo. En la cara inferior derecha se localiza la vesícula biliar, encargada del almacén de la bilis producida a nivel hepático. Presenta una cubierta serosa, llamada peritoneo visceral, que se encuentra rodeando al hígado en toda su superficie salvo en la región en la que se une al diafragma. A nivel celular, la organización del hígado se basa en la repetición de una estructura básica llamada lobulillo hepático, en el que se encuentran la vena central o centrolobulillar (figura 1). En los vértices, entre los lobulillos se encuentra el espacio portal compuesto por tejido conectivo y la triada portal, formada por una rama de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conducto biliar (encargado de recoger la bilis). La vena porta se encarga del transporte de sangre poco oxigenada proveniente del tracto gastrointestinal, bazo y páncreas, la vena central drena el contenido resultante de la actividad de los hepatocitos y la arteria hepática se encarga del transporte de la sangre oxigenada desde la aorta. Los vasos portales y la vena central se comunican entre sí mediante los capilares sinusoidales, cuya pared está recubierta por endotelio y macrófagos (células de Kupffer). (1)

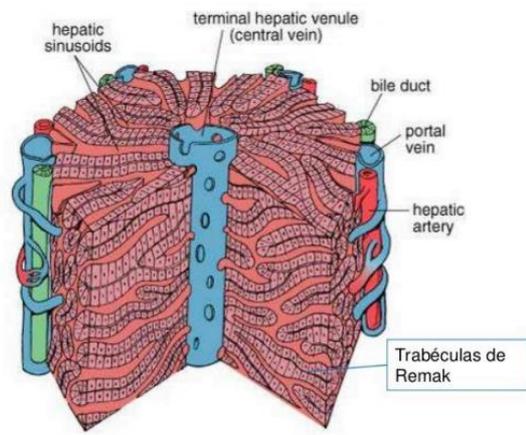


Figura 1. Diagrama de lobulillo hepático.

Ross. Histología 5 edición

2.1 ÁCIDOS BILIARES

El tracto hepatobiliar está formado por una red de canalículos biliares, formados por la región apical de hepatocitos adyacentes, donde se genera la bilis, y por los conductos biliares intrahepáticos, formados por los colangiocitos, responsables de hasta un 40% del volumen biliar. (4,5) La circulación enterohepática (Figura 2) de los ácidos biliares comienza con su síntesis en los hepatocitos, su transporte hasta el intestino a través de los conductos biliares y desde ahí, a través de la vena portal hepática vuelven al hígado. Su síntesis a partir del colesterol está controlada por genes reguladores y el receptor de farnesoides X (FXR). (6)

La bilis es una solución acuosa formada por solutos orgánicos e inorgánicos, cuya concentración varía a lo largo del tracto hepatobiliar. De esta forma se distingue entre bilis primaria o canalicular y bilis modificada o bilis ductular. La bilis canalicular es modificada en

los conductos biliares a través de transportadores de electrolitos y canales iónicos localizados en los colangiocitos, estas modificaciones determinan la fluidificación y alcalinización de la bilis, y dan lugar a la bilis ductular. En el proceso de formación de la bilis intervienen numerosas proteínas transportadoras localizadas en hepatocitos y colangiocitos, y está regulada por estímulos metabólicos, hormonales y neurovegetativos. (4,5)

Los ácidos biliares acceden a distintos tejidos mediante proteínas transportadoras cuya expresión está regulada por FXR y hormonas circulantes como el factor de crecimiento de fibroblastos.

Los ácidos biliares circulantes se encuentran principalmente conjugados con glicina o taurina. Esta conjugación está mediada por la enzima ácido biliar-CoA:aminoácido N-aciltransferasa (BAAT), y supone un aumento de la hidrofilia y la solubilidad de estos compuestos, reduciendo así su toxicidad y facilitando su metabolización a otros ácidos biliares. Cuando se produce un daño hepático, la proporción de ácidos biliares no conjugados aumenta notablemente. (6)

Varios estudios afirman que niveles elevados de ácidos biliares pueden provocar la muerte de hepatocitos. Los ácidos biliares producen la muerte de hepatocitos a distintas concentraciones en función de su grado de conjugación, lo cual varía entre las distintas especies. Para minimizar el daño hepático producido por los ácidos biliares se puede recurrir a la reducción del tamaño del depósito de ácidos biliares, impulsar la salida de los ácidos biliares al suero o impulsar otras rutas de excreción alternativas y la promoción de la conjugación con la taurina. (6)

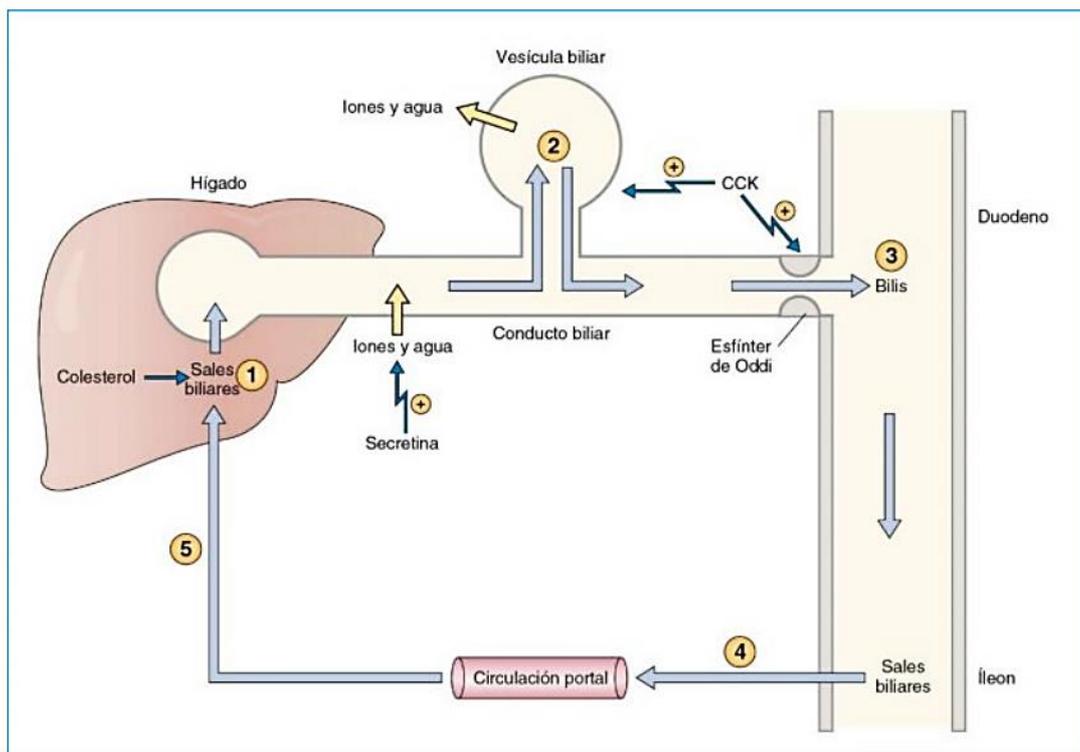


Figura 2. Circulación enterohepática de sales biliares. Imagen disponible en: <http://www.ucla.edu.ve/> [consultado el 26-05-2020]

2.2 ENFERMEDAD HEPÁTICA COLESTÁSICA

La colestasis es un síndrome clínico que cursa con la obstrucción o reducción del flujo biliar o del metabolismo de las sales biliares y que acompaña a numerosas patologías humanas como la cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Alagille y atresia biliar entre otros. (7) Como mecanismo adaptativo frente a la obstrucción, la excreción de los ácidos biliares puede llevarse a cabo a través del tracto urinario, pero este proceso, si ocurre de forma prolongada, deriva en daño renal. (6)

En función de la localización de la alteración se clasifican en colestasis intrahepática y extrahepática. En la colestasis intrahepática, la alteración tiene lugar en el hepatocito o en las vías biliares localizadas en el interior del parénquima hepático; en este caso, pueden deberse a diversas causas que llevan a la reducción del flujo biliar. En la colestasis extrahepática, la obstrucción del flujo tiene lugar en una localización posterior a la salida de las vías biliares del hígado; esta obstrucción puede ser total o parcial. También pueden clasificarse en función de su desarrollo cronológico en agudas y crónicas, siendo consideradas crónicas cuando su duración supera los 6 meses.(8) (9) En función de su etiología presentan una gran variedad (Tabla 1):

Colestasis intrahepática según etiología	Colestasis extrahepática según etiología:
<p>Aguda:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hepatitis vírica • Hepatitis toxica • Colestasis pura por fármacos • Colestasis benigna postoperatoria • Asociada a infecciones bacterianas <p>Crónica en adultos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cirrosis biliar primaria • Hepatitis autoinmune (presentación colestásica) • Colangitis esclerosante • Colangiocarcinoma <p>Crónica en población infantil:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atresia biliar • Déficit de α-1-antitripsina • Displasia arteriohepática • Enfermedad de Caroli • Enfermedad de Byler <p>Otras presentaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recurrentes del embarazo • Idiopática recurrente benigna <p>Causas menos frecuentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sarcoidosis • Enfermedad de Hodgkin • Insuficiencia cardiaca • Amiloidosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Coledocolitiasis • Neoplasia de la cabeza del páncreas • Neoplasia de vías biliares • Lesiones inflamatorias de los conductos biliares • Pancreatitis <p>Causas menos frecuentes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemobilia • Parásitos • Quiste de colédoco • Divertículo duodenal

Tabla 1. Clasificación de la colestasis en función de su etiología. (9)

La clínica con la que suelen cursar los pacientes incluye ictericia (coloración amarillenta de la piel), coluria (presencia de bilirrubina en la orina), acolia (falta de coloración en las heces) y a veces prurito (picor) intenso. Estas manifestaciones asociadas a la colestasis derivan de la acumulación en el plasma de las sustancias que normalmente se excretan en la bilis y de la disminución de la excreción biliar en el tubo digestivo; a su vez, pueden deberse a la causa de desarrollo de la patología. El acúmulo de sales biliares provoca daños en hepatocitos y colangiocitos, que lleva al desarrollo de apoptosis y oncosis (una necrosis hepática derivada de la colestasis obstructiva). Estos daños, junto a las reacciones inflamatorias llevan al desarrollo de fibrosis, cirrosis y fallo hepático en última instancia. (7)

Debido a la obstrucción del flujo biliar, se observa un aumento en suero de los niveles de productos que se excretan en condiciones normales por vía biliar, como sales biliares, bilirrubina conjugada, fosfatasa alcalina (ALP), gamma-glutamil transferasa (GGT), 5' nucleotidasa, colesterol total y esterificado. Los niveles elevados de GGT y de 5' nucleotidasa son indicadores de que el aumento del nivel de ALP se debe a una afección hepática, mientras que si solo se observa un aumento en los niveles de GGT, es menos específico de colestasis, pudiendo deberse a inducción enzimática derivada del consumo de alcohol o drogas.(8) Los niveles de transaminasas dependen de la etiología de la colestasis. (9) A parte de estos productos excretados por vía biliar, se producen cambios en la concentración de ácidos biliares en los distintos compartimentos fisiológicos, ya que tanto la colestasis intrahepática como la extrahepática cursan con un descenso en la formación de ácidos biliares secundarios, ya que no pueden ser metabolizados por las bacterias intestinales al estar obstruido el flujo hacia el intestino. (6) Estas variaciones en los niveles séricos son uno de los factores que se miden en el diagnóstico de colestasis. En el caso de lesiones de conductos intrahepáticos, colangiocarcinomas y enfermedades granulomatosas, los pacientes presentan una elevación muy marcada de los niveles de ALP. En los casos de colestasis anictérica o disociada, los pacientes presentan alteraciones en los niveles de enzimas de colestasis con excepción de la bilirrubina, que mantiene niveles normales. Otro signo clínico propio de las colestasis es el alargamiento del tiempo de protrombina. (9)

Para excluir en el diagnóstico (Figura 3) si se trata de conductos intrahepáticos o extrahepáticos dilatados, el primer paso suele ser una ecografía abdominal, ya que es una técnica sensible, específica, no invasiva y relativamente barata; aunque presenta limitaciones como la posibilidad de no observar alteraciones de los conductos biliares propias de colangitis esclerosante, así como el hecho de que la región inferior de los conductos biliares y el páncreas no se observan con facilidad con esta técnica. Frente a la presencia de alteraciones en los conductos biliares, el diagnóstico posterior dependerá de la sospecha de la patología que presente el paciente, pudiendo recurrir a técnicas como:

- Colangiopancreatografía de resonancia magnética (MRCP, magnetic resonance cholangiopancreatography) se considera una opción segura para la exploración del tracto biliar, presentando una elevada precisión en la detección de obstrucción del tracto biliar. Se usa en pacientes que presenten una colestasis de origen desconocido.
- Ecografía endoscópica (EUS), permite la detección de cálculos en los conductos biliares y lesiones que provoquen la obstrucción a nivel extrahepático. Se usa como alternativa a MRCP.
- Colangiopancreatografía endoscópica (ERCP), es la técnica empleada para la visualización de los conductos biliares y el tratamiento de obstrucciones biliares extrahepáticas, aunque presenta una tasa de complicaciones significativa, por lo que se usa en casos en los que no se pueda recurrir a MRCP ni EUS.

Si en los estudios de imagen no se observa obstrucción mecánica de los conductos, se lleva a cabo el diagnóstico de colestasis intrahepática. En los casos en los que el paciente presente historia clínica que haga sospechar que su patología se debe a alteraciones a nivel extrahepático, se debe recurrir a diagnóstico clínico y se suelen repetir las pruebas de imagen. Cuando se ha descartado la obstrucción extrahepática se recurren a distintas técnicas en función de la clínica:

- Detección en suero de la presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA), se lleva a cabo en pacientes adultos con colestasis intrahepática crónica.
- Biopsia hepática, es la técnica empleada en pacientes que presenten resultados negativos en la detección de anticuerpos antimitocondriales y anticuerpos antinucleares específicos de cirrosis biliar primaria. Se usa cuando el diagnóstico no está claro y es muy importante prestar atención al estado de los conductos biliares en la evaluación histológica. (8)

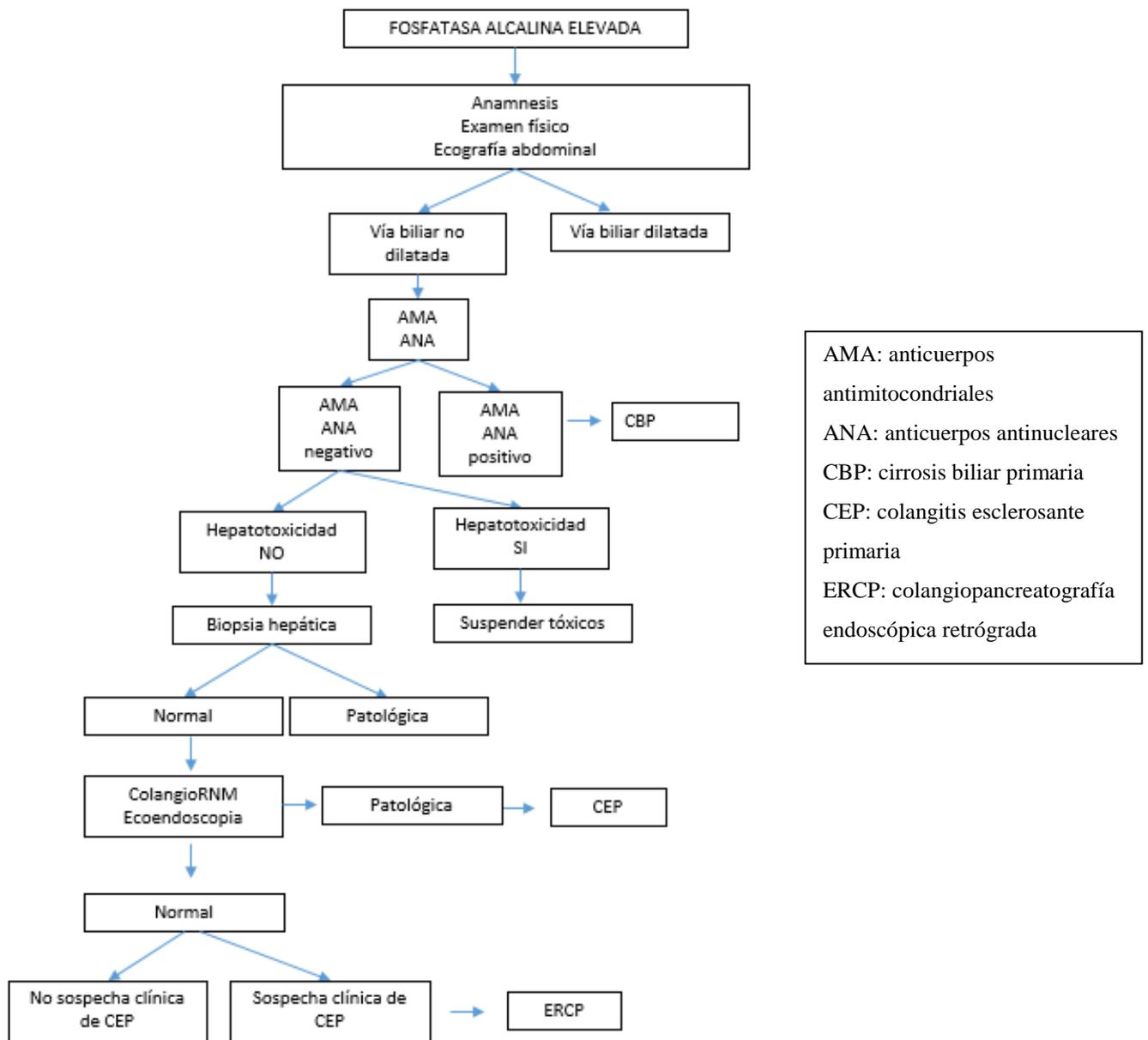


Figura 3. Algoritmo diagnóstico de la colestasis intrahepática. (Adaptado de: EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. Liver Journal of Hepatology 51 (2009) 237-267)

En cuanto al tratamiento de estas patologías varía en función de la afección, pudiendo tratar quirúrgicamente afecciones como cálculos renales, mientras que otras patologías suelen requerir trasplante de hígado, como es el caso de la atresia biliar, la colangitis biliar primaria y la colestasis intrahepática familiar progresiva. (6) El enfoque en el que se suele basar el tratamiento de las colangiopatías se basa en limitar el daño en los conductos biliares, ya que las estrategias terapéuticas para estimular la proliferación colangiocelular son limitadas. Por esto, las estrategias actuales suelen basarse en la protección de los colangiocitos frente a los mecanismos de muerte celular asociados a estas colangiopatías. Uno de los fármacos más usados en estas patologías hepáticas es el ácido ursodesoxicólico (UDCA, ursodeoxycholic acid), un ácido biliar hidrofílico que presenta la capacidad de contrarrestar la apoptosis y necrosis inducida por las sales biliares, que ha sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de cirrosis biliar primaria, aunque sus efectos a largo plazo no se conocen del todo. (10)

En los casos en los que los pacientes presentan alargamiento del tiempo de protrombina, la administración de vitamina K vía parenteral corrige esta alteración, salvo en los casos de disfunción hepatocelular grave, en los que la administración no es útil.

2.3 VÍA DE SEÑALIZACIÓN HGF/MET

2.3.1 HGF

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, hepatocyte growth factor) es producido por las células mesenquimales y células del estroma y entre sus funciones se encuentran la estimulación de la proliferación de células epiteliales y la morfogénesis (formación de estructuras tridimensionales complejas a partir de células epiteliales) y angiogénesis de varios órganos. (11)

Es sintetizado en forma de precursor inactivo pro-HGF sobre el que actúan unas serinproteasas específicas entre las que se encuentran el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), el activador de plasminógeno tisular (tPA), el factor de coagulación XIIa y el activador de HGF (HGF-A). (12–14)

Su forma activa está compuesta por dos subunidades (Figura 4) (15), una subunidad α de 69 kDa, o cadena pesada y una subunidad β de 34 kDa, o cadena ligera, unidas por puentes disulfuro. La subunidad α está formada por un péptido señal, una estructura de horquilla con el extremo N-terminal y cuatro dominios kringle que son estructuras altamente conservadas en bucle, estabilizadas por puentes disulfuro intramoleculares, que conforman una pequeña región espaciadora entre las cadenas α y β . La subunidad β está formada por un motivo de tipo serin proteasa, pero no presenta actividad catalítica al no presentar la triada catalítica Asp-His-Ser. (11,16,17)

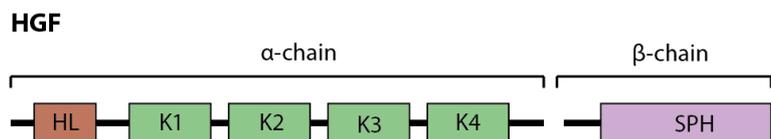


Figura 4. Estructura del HGF. (Fuente: Adaptado de " The Role of HGF/c-Met Pathway Signaling in Human Medulloblastoma"- Faria C, Smith C, Rutk J - In: Molecular Targets of CNS Tumors. InTech- 2011)

HL (estructura de horquilla), K1-K4 (dominios Kringle), SPH (dominio serin proteasa)

Aunque el HGF no sea específico del hígado, el hecho de que tenga actividad en hepatocitos aumenta la posibilidad de que sea clínicamente útil en determinadas patologías relacionadas con el hígado. (16) Fue identificado inicialmente como un potente mitógeno de hepatocitos, pero estudios más recientes indican que la unión de HGF al receptor Met activa una serie de vías de señalización que actúan sobre diversos procesos biológicos en una gran variedad de células, y no tiene solo efecto mitógeno, si no también morfogénico, motogénico y antiapoptótico. Tiene un papel importante al atenuar la progresión de distintas enfermedades al actuar como un factor de reparación intrínseco. Los niveles de HGF en el organismo varían en función de distintos factores como la edad, el sexo, el embarazo y el desarrollo de patologías. (12)

2.3.2 RECEPTOR MET

Es codificado por el protooncogén c-met o Met, que da lugar a un receptor transmembrana con actividad tirosina quinasa. Se expresa en células epiteliales de multitud de tejidos, y también en células endoteliales y neuronas. Esta expresión es inducida por factores entre los que se encuentra el HGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la interleucina-1 y 6 (IL-1 y 6) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α).

El receptor Met es un heterodímero (Figura 5) (15) formado por una subunidad α de 50 kDa en la región extracelular, que presenta el extremo N-terminal y una subunidad β de 140 kDa formada por un dominio semaforina (SEMA), un dominio integrina (PSI) rico en cisteína, cuatro dominios de tipo inmunoglobulina (IPT), una región transmembrana, una región yuxtamembrana, un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa y una cola C-terminal.

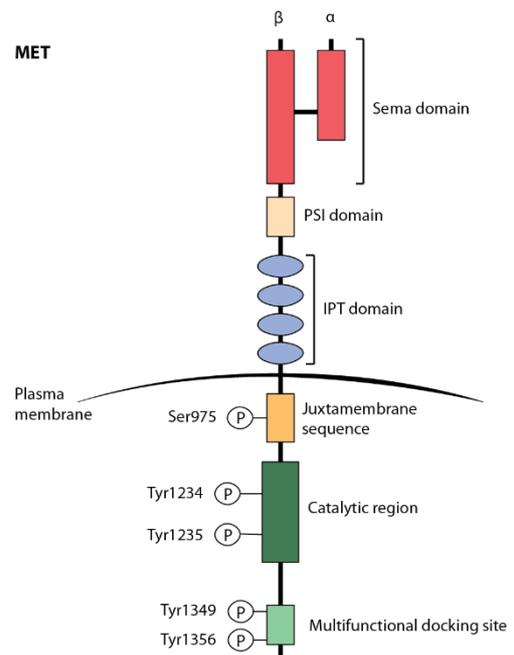


Figura 5. Estructura del receptor Met (Fuente: Adaptado de "The Role of HGF/c-Met Pathway Signaling in Human Medulloblastoma"- Faria C, Smith C, Rutk J - In: Molecular Targets of CNS Tumors. InTech- 2011)

2.3.3 VÍA HGF/MET

La ruta HGF/Met (Figura 6) induce y coordina procesos entre los cuales se encuentran la mitogénesis (proliferación celular), la supervivencia (protección frente a la apoptosis), la diferenciación, la motogénesis y la morfogénesis. (18) Esta vía de señalización está relacionada con el desarrollo de determinados cánceres, debido a su papel sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral, habiéndose descrito la sobreexpresión de HGF y Met en distintos tipos de tumores. (11,19)

La unión de HGF al receptor Met resulta en la homodimerización del receptor y la fosforilación cruzada de los residuos de tirosina Tyr 1234 y Tyr 1235, localizados en la región catalítica. Tras este proceso, los residuos de Tyr 1349 y Tyr 1356 localizados en el extremo C terminal se fosforilan y generan un sitio de anclaje para el reclutamiento de proteínas que participan en la transducción de señales, entre las que destacan dos proteínas adaptadoras: la proteína Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) y la proteína de unión asociada a Grb2

llamada Gab1 (Grb2-associated protein 1); y proteínas transductoras de señales, como la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) y STAT3 (transductor de señal y activador de transcripción).

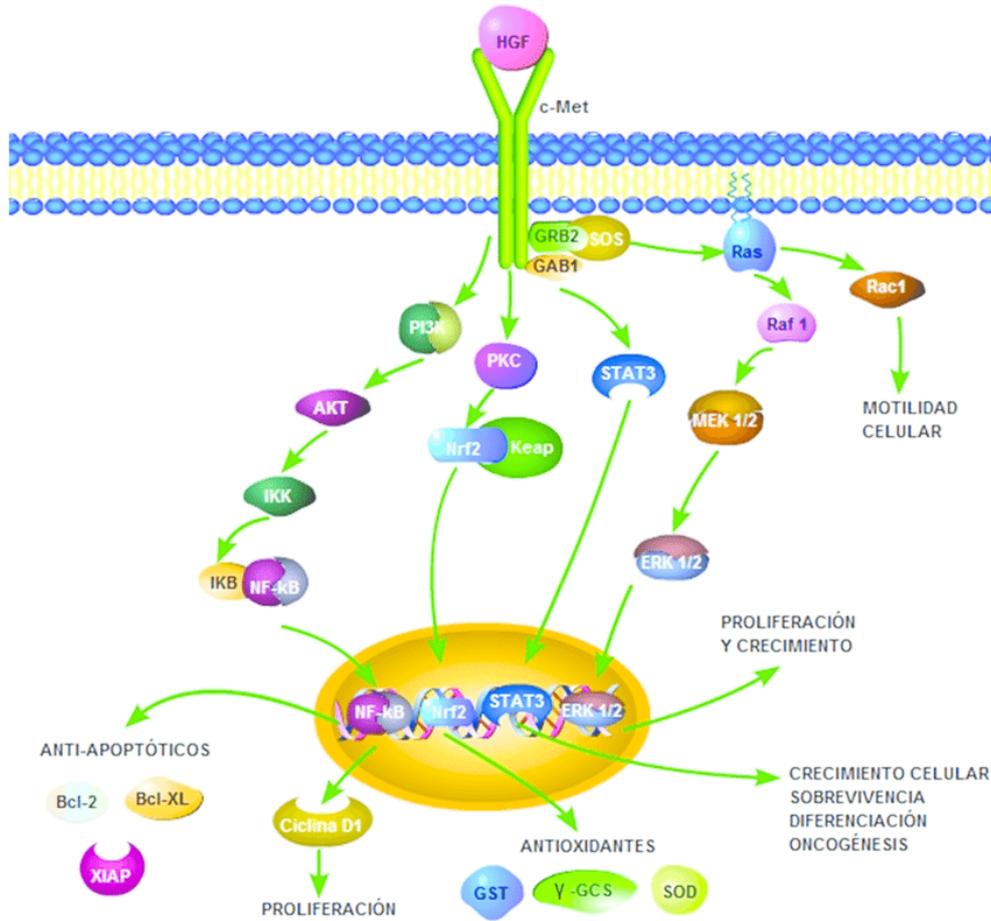


Figura 6. Vía HGF-Met (Fuente: " EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SU RECEPTOR C-MET EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR EL ALCOHOL" - Palestino-Domínguez M, Clavijo-Cornejo D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE – 2012)

La vía HGF/Met presenta una peculiaridad gracias al dominio yuxtamembrana del receptor, que contiene la Ser 956 y la Tyr 1093, que al ser fosforiladas inician el proceso de endocitosis y el reclutamiento de ligasas de ubiquitinas que llevan a cabo la degradación del receptor tras la activación de éste, permitiendo así una regulación negativa de la ruta. (20)

La fosforilación de la Tyr 1313 localizada en el extremo C terminal genera un sitio de unión por el que tiene preferencia PI3K. Por otro lado, la fosforilación de Tyr 1349 y Tyr 1356 lleva a la unión y/o activación de proteínas como Grb2 y Gab1. (20,21)

La ruta mediada por PI3K lleva a la activación de factores como NF-kB que favorecen la expresión de proteínas antiapoptóticas, como las proteínas de la familia Bcl-2 (linfoma de células B 2), y la proteína inhibidora de apoptosis XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), por lo que ejerce un papel importante en la supervivencia celular y la reparación tisular.

En cuanto a la protección frente al estrés oxidativo, esta vía es capaz de regular el estado redox basal de las células. Esta acción reguladora está mediada entre otros por el factor de transcripción Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), encargado de la regulación de la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores, como los que codifican para glutatión S-transferasa (GST), gamma-glutamyl cistein sintetasa (γ -GCS) y NADPH deshidrogenasa.

Durante el desarrollo de la colestasis, el daño hepático induce la liberación de HGF, que lleva a la activación de Nrf2 y éste a su vez da lugar a la respuesta antioxidante mediante la inducción de diversas enzimas, contrarrestando así el daño hepático.

3 OBJETIVOS

Entre los objetivos de este trabajo se encuentra destacar la importancia de la vía HGF/Met en el contexto de las patologías hepáticas, especialmente la enfermedad hepática colestásica y el papel que juega esta vía en su prevención, diagnóstico y tratamiento,- con el fin de poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas en dichas patologías.

Asimismo, se pretende analizar los resultados de estudios en este campo. En concreto me he centrado en dos trabajos en los que se estudia el efecto de HGF frente al daño colestásico inducido por ANIT en ratones, en los que se analizan tanto parámetros bioquímicos como alteraciones fisiopatológicas de los animales.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica enfocada al papel del factor de crecimiento hepático sobre la enfermedad hepática colestásica. La revisión se basó en publicaciones y artículos científicos obtenidos de bases de datos como PubMed y Elsevier.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uno de los primeros estudios llevados a cabo para conocer la actividad de HGF frente al daño hepático fue realizado en California por investigadores del departamento de investigación de endocrinología, mediante experimentos con ratas a las que se les indujo colestasis intrahepática mediante la administración de ANIT (cu-naphthylisothio-cyanate). Los efectos hepatotóxicos derivados de la administración de ANIT se ponían de manifiesto 48 h tras su administración y consistían en aumentos de los niveles séricos de bilirrubina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y ALP. Estas alteraciones bioquímicas se presentaban junto con alteraciones fisiológicas, como extensión del edema periportal, hipertrofia del epitelio del conducto biliar y regiones del parénquima hepático con necrosis.

METODOLOGÍA

ANIT fue disuelto en aceite de cacahuete a una concentración de 12,7 mg/ml y fue administrado vía intraperitoneal en dosis de 50 mg/kg. La hepatotoxicidad de esta dosis fue establecida en estudios preliminares. Se usó HGF humano recombinante diluido en una solución estéril de tampón fosfato salino (PBS) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%.

Los experimentos fueron realizados usando dos lotes de HGF que presentaron la misma potencia in vitro. HGF fue administrado vía intravenosa (i.v.) en volúmenes de 0,3 mL en las dosis descritas. Los animales a los que no se les administraba HGF fueron inyectados vía i.v. con el mismo volumen de vehículo. Se trata de un experimento simple ciego.

- Experimento 1:

ANIT fue inyectado a tiempo 0 (50 mg/kg). Se inyectó HGF (320 µg/kg por inyección) o vehículo en la vena lateral de la cola 30 min antes de la administración de ANIT y posteriormente a las 6, 12, 24, 30 y 36h tras la administración de ANIT. A las 48h, se recolectaba suero y se analizaban los niveles totales de bilirrubina, ALT, AST y ALP. Las muestras de hígado fueron fijadas en formol tamponado neutro al 10%, incorporadas en parafina, seccionadas y teñidas con hematoxilina y eosina para el análisis histopatológico.

- Experimento 2:

La administración de ANIT y HGF se realizó como en el experimento 1, con la diferencia de que se usaron dosis distintas de HGF (32, 105 y 320 µg/kg por inyección), con la finalidad de conocer si los efectos protectores de HGF eran dosis-dependiente.

- Experimento 3:

Se emplearon catéteres insertados en la vena yugular para facilitar la inyección i.v. de HGF y del vehículo. Se realizó para determinar si HGF era efectivo incluso si la administración se retrasaba hasta 12h tras la administración de ANIT. Todos los animales recibieron una inyección intraperitoneal de ANIT a tiempo 0. Un grupo recibió 6 inyecciones vía i.v. de HGF (280 µg/kg por inyección), en los mismos tiempos que en el experimento 1. Un segundo grupo fue administrado el vehículo 30 min antes de la administración de ANIT y 6 h tras la administración de ANIT, y tras esto recibió 4 inyecciones de HGF (280 µg/kg por inyección) a las 12, 24, 30 y 36 horas. Un tercer grupo fue administrado vehículo sin HGF a cada tiempo. Se usó un grupo de animales no tratados como grupo control.

RESULTADOS:

- Experimento 1.

Las dosis de ANIT usadas en estos estudios no tuvieron un efecto notable en el tiempo de protrombina, pero provocaron un aumento notable en los niveles séricos de bilirrubina, ALT, AST y ALP (Figura 7A).

Estos efectos de ANIT fueron atenuados en los animales a los que se les administró HGF.

- Experimento 2.

Los efectos sobre la regulación de los niveles séricos de las enzimas varían en función de la dosis de HGF, siendo los niveles enzimáticos significativamente reducidos en los animales a los que se les administró la dosis de 320 µg/kg. La dosis de HGF de 105 µg/kg tuvo efectos sobre los niveles de ALT y bilirrubina, disminuyéndolos, pero no tuvo efectos significativos sobre los niveles de AST ni ALP. La dosis de HGF de 32 µg/kg no mostró ningún efecto significativo sobre ninguno de los parámetros medidos. (Figura 7B)

- Experimento 3.

Se observó que la administración retrasada de HGF fue igual de efectiva en los parámetros medidos. (Figura 7C)

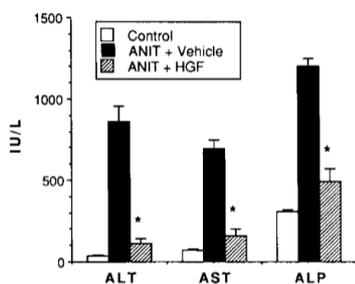


Figura 7A (16)

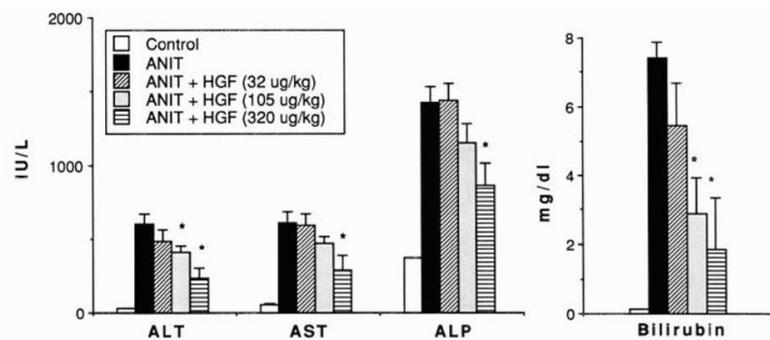
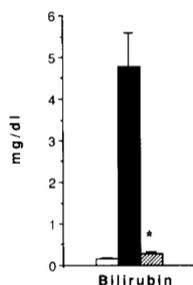


Figura 7B (16)

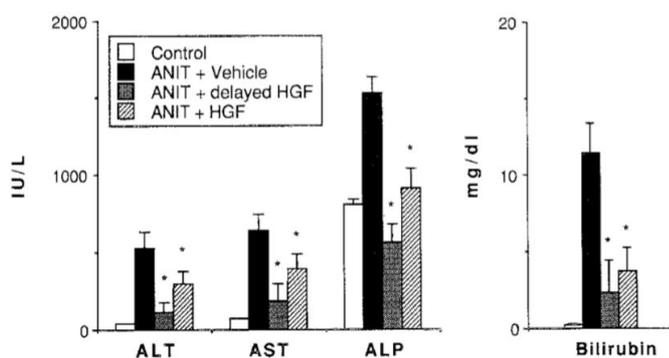


Figura 7C (16)

En cuanto a los efectos a nivel histológico en los animales a los que se administró el HGF tras 12h, estos fueron comparables con los encontrados en los animales que recibieron el HGF 30 min antes de la administración de ANIT. En ambos casos, la administración de HGF no tuvo efectos en la colangiohepatitis, pero si actuó previniendo las lesiones parenquimales.

En este experimento, además de corroborar el efecto reductor de la hepatotoxicidad por la administración de HGF de estudios anteriores como el de Ishiki *et al.* (22), se demostró que el retraso de la administración de HGF hasta 12h tras la administración de ANIT, no tenía efecto sobre su efectividad, aunque el acumulo de dosis total en estas situaciones se redujese.

Los efectos protectores de HGF se manifestaron como reducción de los niveles de enzimas hepáticas y bilirrubina total en el suero. Hay que tener en cuenta que aunque HGF fue efectivo en todos los experimentos, la magnitud de la respuesta fue variable, ya que en algunos experimentos, HGF bloqueaba casi al completo los efectos del ANIT, obteniendo resultados muy similares a las ratas control, mientras que en otros experimentos los efectos de HGF eran menos notables (como se observa si comparamos la figura 7 A y 7 C, en las que se emplea el mismo lote de HGF). Se desconoce la causa de esta variabilidad, pero se cree que puede deberse a los grupos de animales de experimentación.

Los efectos protectores de HGF fueron más constantes que los efectos sobre los niveles serológicos de los marcadores. Los animales que recibieron administración de HGF no presentaban daños a nivel periportal, independientemente de los niveles serológicos de los marcadores detectados. Una explicación posible es que los mecanismos que producen el daño

a nivel histológico son más sensibles al HGF que los que producen el aumento de los niveles séricos de las enzimas y la bilirrubina. (16)

En un estudio más reciente, se analizó la capacidad de HGF para contrarrestar el daño causado por ANIT. El mecanismo de ANIT en la colestasis incluye la disminución de la expresión de los transportadores de ácidos biliares, la interrupción de las uniones estrechas celulares y la obstrucción biliar debido a la descamación de las células epiteliales del conducto biliar.

METODOLOGÍA

Se emplearon ratones CD1 (*Mus musculus domesticus*), los cuales fueron divididos en dos grupos, uno al que se le administró ANIT (60 mg/kg, intragástrico, diluido en aceite de soja) y un segundo grupo al que no se le administró ANIT. 24 horas tras la administración de ANIT al primer grupo, se administró a ambos grupos una dosis de 10 µg/kg de HGF vía intravenosa. 48 horas tras el tratamiento con ANIT los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo una extracción de sangre, bilis y tejido hepático para los posteriores análisis.

Se llevó a cabo la determinación de los niveles de: AST, ALT, ALP, GGT, sales biliares y bilirrubina. Se determinaron las especies reactivas de oxígeno (ROS) in situ, y se llevó a cabo un análisis de imagen mediante inmunofluorescencia para estudiar la amplitud de los canalículos biliares así como un análisis de la estructura del conducto biliar mediante microscopía electrónica.

RESULTADOS

Se comprobó que ANIT inducía daño hepatobiliar dependiente del tiempo de exposición. Se observaron aumentos de los niveles séricos de AST, bilirrubina total, sales biliares y ALP. Estos niveles disminuían ligeramente a las 48 horas y se cree que fue debido a la activación de transportadores a nivel renal que servían como vía de excreción alternativa. A nivel macroscópico se observó en los animales tratados con ANIT inflamación a nivel de la vesícula biliar, desarrollo de hepatomegalia y áreas necróticas. Todo esto muestra claramente que ANIT induce daño hepatobiliar.

En cuanto al papel de HGF frente a estos daños, se observó:

- HGF presenta propiedades anticoléstaticas. Se observó una disminución notable de los niveles séricos de AST, ALT, ALP y GGT en los animales tratados con HGF (frente a los tratados exclusivamente con ANIT), así como un descenso en los niveles de bilirrubina total y los niveles de sales biliares. A nivel macroscópico, los animales tratados con HGF+ANIT mostraron un descenso significativo de las lesiones tisulares, la inflamación de la vesícula biliar y la hepatomegalia.
- HGF corrige las alteraciones del flujo biliar inducidas por ANIT. El grupo al que se le administró solo ANIT, presentó un descenso del flujo biliar mientras que el grupo tratado con HGF presentó valores normales de flujo.
- HGF disminuye el estrés oxidativo inducido por ANIT. El tratamiento con ANIT provocaba un aumento del contenido celular de O₂⁻. Estos niveles de ROS disminuían notablemente en el grupo tratado conjuntamente con HGF, lo cual se correspondía con los datos obtenidos sobre la normalización de la peroxidación lipídica en el grupo al que se le administró HGF.
- HGF actúa preservando la unión estrecha de las estructuras celulares alteradas por la exposición a ANIT. El tratamiento con HGF mostró un aumento de la amplitud del canalículo biliar comparado con el grupo no tratado.

- HGF normaliza las alteraciones inducidas por ANIT sobre la proteína reguladora de conductancia transmembrana (CFTR), que participa en el control de la secreción de sodio, cloro, agua y bicarbonato. En las colangiopatías es común el defecto de la secreción de bicarbonato; este proceso de secreción tiene efectos protectores frente al daño colestásico en los conductos biliares, por lo que se considera un factor crítico en la protección del epitelio biliar. En el estudio se observó que ANIT indujo un descenso significativo de la expresión de CFTR y que el tratamiento combinado con HGF restauró la expresión de la misma a valores normales.
- HGF protege los cilios de los colangiocitos frente al daño por ANIT. Los cilios primarios de los colangiocitos tienen un papel importante en la normal secreción biliar. El análisis con microscopía electrónica mostró que los cilios de los animales tratados con ANIT eran de menor tamaño y casi inexistentes, mientras que su morfología se restauraba en el tratamiento combinado con HGF.
- HGF induce la expresión de los transportadores ABC. Se evaluó la expresión génica de los genes *Abcc2*, *Abcb11*, *Abcc3* y *Abcc4*. La bomba exportadora de sales biliares (Bsep, expresión regulada por *Abcb11*) y la proteína 2 asociada a la resistencia de fármacos (Mrp2, expresión regulada por *Abcc2*) aumentaban su expresión en el grupo tratado con ANIT como respuesta adaptativa frente a la colestasis, y la administración de HGF contrarrestaba estos efectos. Por otra parte, la expresión de las proteínas 3 y 4 asociadas a la resistencia de fármacos (Mrp3, expresión regulada por *Abcc3* y Mrp4, expresión regulada por *Abcc4*) aumentaban su expresión en los animales tratados con HGF y ANIT. Estos cambios de la expresión de los transportadores permitían una mejor depuración de sales biliares y bilirrubina del organismo de los animales tratados con HGF y ANIT.

DISCUSIÓN

En este estudio se llegó a la conclusión de que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la colestasis inducida por ANIT, y el daño oxidativo representa uno de los primeros efectos de ANIT sobre los hepatocitos, al desencadenar mecanismos como la desorganización de la actina, seguido de la internalización de la Bsep y de Mrp2, así como alteraciones de las uniones celulares.

Los antioxidantes presentan efectos anticolestáticos en la colestasis inducida por ANIT, y algunos de ellos simultáneamente activan Nrf2, lo cual sugiere una relación entre ambos fenómenos. Por ello, es muy probable que HGF lleve a cabo sus efectos anticolestáticos mediante la activación de Nrf2, que regula a su vez la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores, como la NADPH deshidrogenasa. Los resultados de este estudio muestran un aumento notable del contenido de ROS inducido por ANIT y la normalización de los niveles mediado por HGF.

En los ratones que fueron tratados con ANIT y HGF se observó un aumento de la expresión de los transportadores basolaterales de sales biliares Mrp3 y Mrp4, que permite mantener valores intracelulares bajos de sales biliares a pesar del fallo en la secreción de las mismas. Los sustratos preferentes para cada transportador son bilirrubina (principalmente sus conjugados glucurónidos) para Mrp3 y ácidos biliares conjugados para Mrp4. Ambas sales biliares endógenas son sustancias altamente citotóxicas que llevan a la muerte celular por necrosis y apoptosis, incluyendo alteraciones funcionales mitocondriales que llevan a la generación de mayor estrés oxidativo. Por otro lado, HGF ejerce un efecto diferencial sobre los transportadores canaliculares al disminuir la expresión de Bsep y Mrp2, disminuyendo así el efecto colerético, lo cual tiene importantes implicaciones terapéuticas tanto en obstrucciones biliares como en colangiopatías.

Uno de los hallazgos novedosos en este estudio es el hecho de que la expresión de CFTR está reducida en animales tratados con ANIT y se restaura a valores normales al tratarlos conjuntamente con HGF. Entre los efectos dañinos de ANIT se encuentra la inducción de la respuesta inflamatoria, y se ha observado que las citoquinas proinflamatorias ejercen una regulación negativa sobre CFTR. Esta disminución de la actividad de CFTR puede contribuir en el desarrollo de la colestasis al reducir la coleresis (secreción de bilis por el hígado), ya que la falta de cloruro a nivel luminal lleva a una disminución de la actividad del intercambiador aniónico AE2, que media el intercambio de bicarbonato y cloruro, lo cual provocará un descenso del flujo biliar que agravará el proceso obstructivo.

En cuanto al papel sobre los cilios primarios de los colangiocitos, éstos juegan un papel importante en la proliferación de los colangiocitos en situaciones de colestasis obstructiva al mediar la respuesta adaptativa del organismo. Al contrarrestar los daños producidos por ANIT sobre los cilios, HGF permite que los conductos biliares lleven a cabo el mecanismo reparador y el reemplazo de las células dañadas. (23)

6 CONCLUSIONES

Las enfermedades hepáticas colestásicas siguen siendo patologías poco estudiadas en relación con su incidencia en la práctica clínica, por lo que sería interesante analizarlas tanto desde el punto de vista clínico como fisiológico para conseguir más información acerca de las vías de señalización que median los mecanismos hepatoprotectores así como los efectos que tienen sobre la respuesta frente al daño hepático,- lo que permitirá una mejor actuación frente a las mismas.

La vía HGF/Met ha demostrado jugar un importante papel durante el desarrollo y/o la progresión de enfermedades hepáticas. Los efectos protectores del factor HGF se han puesto de manifiesto en numerosos ensayos y modelos experimentales de daños de distinta naturaleza y etiología, como se ha mostrado en los estudios con ratones con colestasis inducida por ANIT, en los cuales HGF revertía gran parte de los daños o los atenuaba mediante la activación de distintas vías de señalización que llevaban a la normalización de los niveles séricos de enzimas propias de procesos colestásicos, la reducción del estrés oxidativo y al mantenimiento y restauración de las estructuras celulares, entre otros. En base a los resultados de estos estudios preclínicos, la vía HGF/Met constituye una interesante diana terapéutica para el desarrollo de estrategias de abordaje de enfermedades hepáticas colestásicas.

7 REFERENCIAS

1. Megías M, Molist P PM. Órganos animales. Sistema digestivo. Hígado. Atlas de Histología Vegetal y Animal [Internet]. Atlas de histología vegetal y animal. Órganos animales. 2019 [citado 25 de mayo de 2020]. Recuperado a partir de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php>
2. Mall FP. A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat*. 1906 Jul 25;5(3):227–308.
3. Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem Cells and Liver Regeneration [Internet]. Vol. 137, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2009 [citado 19 de junio de 2020]. p. 466–81. Recuperado a partir de: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850900818X>
4. Bañales JM, Medina JF. Mecanismos moleculares en la formación de la bilis. *Gastroenterol Hepatol*. 2004;27(5):320–4.
5. Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: Disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* [Internet]. 2004 Nov [citado 27 de mayo de 2020];127(5):1565–77. Recuperado a partir de: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508504013952>
6. Woolbright BL, Jaeschke H. Inflammation and cell death during cholestasis: The evolving role of bile acids. *Gene Expr J Liver Res*. 2019;19(3):215–28.
7. Collares M, Valverde M, Fernández DI, Ormaechea DG. Colestasis intrahepática: un desafío diagnóstico Intrahepatic cholestasis: a diagnostic challenge. Vol. 36, *Arch Med Interna*. 2014.
8. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* [Internet]. 2009 [citado el 26 de mayo de 2020];51(2):237–67. doi.org/10.1016/j.jhep.2009.04.009
9. Rodés Teixidor J. Ictericia y colestasis. Barcelona; 1998.
10. Lazaridis KN, Larusso NF. The cholangiopathies [Internet]. Vol. 90, *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2015 [citado 27 de mayo de 2020]. p. 791–800. Available from Recuperado a partir de: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619615002670>
11. Kato T. Biological roles of hepatocyte growth factor-Met signaling from genetically modified animals (Review). Vol. 7, *Biomedical Reports*. 2017.
12. Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical application. *Clin Chim Acta*. 2003;327(1–2):1–23.
13. Naldini' L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs2 M, Hartmann2 G, Birchmeier2 W, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. Vol. 1, *The EMBO Journal*. 1992.
14. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of Hepatocyte Growth Factor by the Plasminogen Activators uPA and tPA. Vol. 143, *American Journal of Pathology*. 1993.
15. Faria C, Smith C, Rutk J. The Role of HGF/c-Met Pathway Signaling in Human Medulloblastoma. In: *Molecular Targets of CNS Tumors*. InTech; 2011.
16. FILIP ROOS, TIMOTHY G. TERRELL, PAUL J. GODOWSKI, STEVEN M. CHAMOW ARHS. Reduction of cu-Naphthylisothiocyanate-Induced Hepatotoxicity by Recombinant Human Hepatocyte Growth Factor. 1992;131(6):2540–4.
17. Molecular Characteristics of HGF and the Gene, and Its Biochemical Aspects - PubMed [Internet]. [citado 19 junio 2020]. Recuperado a partir de:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8422543/>
18. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* [Internet]. 1991 Nov 29 [citado 19 junio 2020];67(5):901–8. Recuperado a partir de: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867491903634>
 19. Comoglio PM, Trusolino L. Series Introduction: Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest*. 2002 Apr 1;109(7):857–62.
 20. Palestino-Domínguez M, Clavijo-Cornejo D, Gutiérrez-Ruiz MC, Gómez-Quiroz LE. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SU RECEPTOR C-MET EN LA PROTECCIÓN CONTRA EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR EL ALCOHOL. 2012;118–26.
 21. Organ SL, Tsao M-S. An overview of the c-MET signaling pathway [Internet]. [citado 29 abril 2020]. Recuperado a partir de: <http://tam.sagepub.com>
 22. Ishiki Y, Ohnishi H, Muto Y, Matsumoto K, Nakamura T. Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and has a potent antihepatitis effect in vivo. *Hepatology* [Internet]. 1992 Nov [citado 18 junio 2020];16(5):1227–35. doi: 10.1002/hep.1840160520
 23. Salas-Silva S, Simoni-Nieves A, Razori MV, López-Ramírez J, Barrera-Chimal J, Lazzarini R, et al. HGF induces protective effects in α -naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis by counteracting oxidative stress. *Biochem Pharmacol*. 2020;174.