



Universidad Nacional de Rosario

**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas**

**Tesis de Doctorado**

**Mecanismos intracelulares involucrados en la  
colestasis por estrógenos: rol del receptor de  
estrógenos.**

**Presentada por: Lic. Ismael R. Barosso**

**Rosario, Argentina**

**2013**

# **“Mecanismos intracelulares involucrados en la colestasis por estrógenos: rol del receptor de estrógenos.**

Ismael R. Barosso  
Licenciado en Biotecnología  
Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 21 de Agosto de 2008 y el 30 de Noviembre de 2012, bajo la dirección de los Dres. Enrique Sánchez Pozzi y Fernando A. Croceni.

Director y co-Director

Director: Dr. Enrique Sánchez Pozzi

Co-Director: Dr. Fernando Croceni

Jurado de Tesis:

Dra. Sandra M. Arriaga  
Dra. Liliana G. Bianciotti  
Dra. Ana M. Franchi

Parte de los resultados experimentales que se describen en el presente trabajo de Tesis han sido divulgados en las revistas y reuniones científicas que se detallan a continuación:

### ***Trabajos Publicados:***

Sequential activation of classic PKC and estrogen receptor  $\alpha$  is involved in estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide-induced cholestasis. **Ismael R. Barosso**, Andrés E. Zucchetti, Andrea C. Boaglio, M. Cecilia Larocca, Diego R. Taborda, Marcelo G. Luquita, Marcelo G. Roma, Fernando A. Crocenzi, Enrique J. Sánchez Pozzi. *Plos One* 2012. DOI 10.1371/journal.pone005711.

### ***Trabajos presentados en reuniones científicas:***

#### **Presentaciones a Congresos**

Estrogen Receptor is involved in the impairment of bile salt secretion induced by estradiol-17 $\beta$ -glucuronide in isolated rat hepatocyte couplets. **Barosso, Ismael R.**; Zucchetti, Andrés E.; Taborda, Diego; Sánchez Pozzi, Enrique J; Crocenzi, Fernando. *J. Hepatology* Supplement N° 1 Vol. 50, pág. S103, 2009.

Evaluación de la participación del receptor de estrógeno (RE) en la alteración de la excreción de sales biliares inducida por estradiol-17 $\beta$ -D-glucurónido (e) en Duplas Aisladas de Hepatocitos de Rata (DAHR). **Barosso Ismael.**; Zucchetti Andrés.; Taborda Diego.; Crocenzi Fernando.; Sánchez Pozzi Enrique. *Medicina*, Vol. 69 (supl I), 167, 2009.

En la colestasis por estradiol-17 $\beta$ -D-glucurónido (E17G) en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) la participación del Receptor de Estrógeno (RE) es posterior a la activación de PKC $\alpha$  (PKC). **Barosso, Ismael**, Zucchetti, Andrés; Taborda, Diego, Crocenzi, Fernando; Sánchez Pozzi, Enrique. *Medicina* Vol 70 (supl II) pág. 249, 2010.

El Receptor de Estrógenos (RE) participa en la colestasis por estradiol-17-D-glucurónido (E17G) en hígado aislado y perfundido de rata (HAPR). **Barosso, Ismael**, Zucchetti, Andrés; Ochoa, Elena, Crocenzi, Fernando; Sánchez Pozzi, Enrique. *Medicina* Vol 71 (supl III) pág. 209, 2011.

**A mis Padres  
Susana,  
Rubén**

# Índice General

<b>Abreviaturas.</b>	<b>I</b>
<b>Resumen</b>	<b>II</b>
<b>1 Introducción</b>	
<b>1.1 Generalidades.</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1 Fisiología Hepatobiliar.</i>	<b>1</b>
<i>1.1.2 Las sales biliares.</i>	<b>3</b>
<i>1.1.3 La secreción Biliar.</i>	<b>4</b>
<i>1.1.4 Sistema de transporte de los hepatocitos.</i>	<b>5</b>
<b>1.1.4.1 Regulación de la actividad de los sistemas de transporte canalicular.</b>	<b>10</b>
<i>1.1.4.1.1 Tráfico y reciclado de transportadores canaliculares.</i>	<b>11</b>
<b>1.2 Generalidades de Colestasis.</b>	<b>17</b>
<i>1.2.1 Colestasis inducidas por drogas.</i>	<b>18</b>
<b>1.2.1.1 Colestasis por 17<math>\alpha</math>-etinilestradiol (EE).</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1.2 Colestasis por estradiol-17-D-glucurónido (E17G).</b>	<b>20</b>
<i>1.2.2 Rol de vías de señalización intracelular en colestasis.</i>	<b>22</b>
<b>1.2.2.1 Señalización por PKC y PI3K/Akt.</b>	<b>22</b>
<i>1.2.2.1.1 Rol de las vías de señalización intracelular dependientes de PKC y PI3K en colestasis.</i>	<b>25</b>
<b>1.2.2.2 Generalidades de las vías GPR30/AC/PKA.</b>	<b>26</b>
<i>1.2.2.2.1 Generalidades de las vías de GPR30/AC/PKA en colestasis.</i>	<b>28</b>
<b>1.2.2.3 Otras vías de señalización.</b>	<b>29</b>
<b>1.3 Generalidades del Receptor de Estrógeno (RE).</b>	<b>30</b>
<b>2. Objetivos.</b>	
<b>2.1 Objetivo General.</b>	<b>35</b>

<b>2.2 Objetivos específicos.</b>	<b>35</b>
<b>3 Metodología</b>	
<b>3.1 Reactivos.</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Animales.</b>	<b>37</b>
<b>3.3 Modelos experimentales <i>in vitro</i>.</b>	<b>37</b>
<b>3.3.1 Obtención de Colágeno tipo I a partir de cola de rata.</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2 Obtención de hepatocitos aislados.</b>	<b>40</b>
<b>3.3.3 Obtención de las duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR).</b>	<b>41</b>
<b>3.3.4 Preparación de cultivo primario de hepatocitos de rata en configuración “sándwich” (HRCS).</b>	<b>44</b>
<b>3.3.4.1 Preparación del colágeno y de la primera capa de colágeno en las placas de cultivo.</b>	<b>44</b>
<b>3.3.4.2 Obtención y sembrado de hepatocito. Día “0” de cultivo.</b>	<b>44</b>
<b>3.3.4.3 Agregado de la segunda capa de colágeno. Día “1” de cultivo.</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Obtención de fracciones celulares.</b>	<b>46</b>
<b>3.4.1 Preparación de homogenados celulares.</b>	<b>46</b>
<b>3.4.2 Preparación de fracciones celulares (citosol y membrana total).</b>	<b>46</b>
<b>3.5 Técnicas aplicadas en el modelo de cultivo primario de hepatocitos.</b>	<b>46</b>
<b>3.5.1 Medición de la activación del REα.</b>	<b>47</b>
<b>3.5.2 Medición de la activación de PKCα por translocación a membrana.</b>	<b>48</b>
<b>3.5.3 Medición de la activación de PKA.</b>	<b>48</b>
<b>3.6 Técnicas aplicadas en el modelo de DAHR.</b>	<b>49</b>
<b>3.6.1 Evaluación de la función secretora de <i>Abcb11</i> y <i>Abcc2</i> en DAHR.</b>	<b>49</b>
<b>3.6.2 Estudios de localización intracelular de <i>Abcb11</i> y <i>Abcc2</i> en DAHR.</b>	<b>51</b>
<b>3.7 Estudios preliminares en el cultivo primario de HRCS.</b>	<b>52</b>

<b>3.7.1 Expresión de <i>Abcc2</i> y <i>abcb11</i> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>52</b>
<b>3.7.2 Expresión de <i>REα</i> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>53</b>
<b>3.7.3 Funcionalidad del transportador canalicular <i>Abcc2</i> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>54</b>
<b>3.8 Técnicas aplicadas en el cultivo primario de HRCS.</b>	<b>55</b>
<b>3.8.1 Knock-down del <i>REα</i> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>55</b>
<b>3.8.1.1 Diseño y síntesis de ARN de interferencia para <i>REα</i> de rata.</b>	<b>55</b>
<b>3.8.1.2 Protocolo de transfección en el cultivo primario de HRCS.</b>	<b>56</b>
<b>3.8.1.3 Viabilidad celular de la transfección.</b>	<b>56</b>
<b>3.8.2 Evaluación de la localización de <i>Abcb11</i> y <i>Abcc2</i> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>57</b>
<b>3.9 Rol de <i>REα</i> en la colestasis por E17G.</b>	<b>58</b>
<b>3.9.1 Activación del <i>REα</i> por E17G en cultivo primario de hepatocitos.</b>	<b>58</b>
<b>3.9.2 Determinación de los efectos protectores de ICI182,780.</b>	<b>58</b>
<b>3.9.2.1 Determinación de la concentración de trabajo de ICI.</b>	<b>58</b>
<b>3.9.2.2 Estudios concentración-respuesta de ICI sobre alteraciones colestásicas producidas por E17G.</b>	<b>59</b>
<b>3.9.2.3 Protección de la localización de <i>Abcb11</i> y <i>Abcc2</i> en DAHR.</b>	<b>59</b>
<b>3.9.3 Evaluación de la localización de <i>Abcb11</i> y <i>Abcc2</i> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>60</b>
<b>3.10 Caracterización de la participación del <i>REα</i> en la colestasis por E17G.</b>	<b>60</b>
<b>3.10.1 Vías de señalización de <i>PI3K</i> y <i>REα</i>.</b>	<b>60</b>
<b>3.10.1.1 Estudios de co-inhibición de <i>PI3K</i> y <i>REα</i>.</b>	<b>60</b>
<b>3.10.2 Vías de señalización de <i>PKC<math>\alpha</math></i> y <i>REα</i>.</b>	<b>61</b>
<b>3.10.2.1 Estudios de co-inhibición de <i>PKC<math>\alpha</math></i> y <i>REα</i>.</b>	<b>61</b>
<b>3.10.2.2 Análisis de la activación de <i>PKC<math>\alpha</math></i> por WB en condiciones de inhibición de <i>REα</i>.</b>	<b>61</b>



3.10.2.3 Análisis de la activación de RE $\alpha$ por WB en condiciones de inhibición de PKC $\alpha$ .	61
3.10.3 Vías de señalización de GPR30/AC/PKA y RE $\alpha$ .	62
3.10.3.1 Evaluación de la activación de RE $\alpha$ y de la activación de PKC $\alpha$ .	62
3.10.3.2 Evaluación del estado de fosforilación de los sustratos de PKA.	62
3.11 Experimento <i>in vivo</i> .	63
3.11.1 Estudio en animal entero.	63
3.11.1.1 Análisis de la fosforilación de RE $\alpha$ <i>in vivo</i> por WB.	63
3.11.2 Modelo de Hígado Aislado y Perfundido de rata (HAPR).	64
3.11.2.1 Tratamiento en HAPR.	64
3.11.2.2 Estudio Funcional de Abcb11 y Abcc2 en HAPR.	65
3.11.2.2.1 Determinación de SB.	65
3.11.2.2.2 Determinación de DNP-G.	66
3.11.2.3 Estudios de localización de transportadores en HAPR.	66
3.12 Análisis estadístico.	67
4 Resultados.	
4.1 Estudios <i>in vitro</i> .	68
4.1.1 Estudio de la participación del RE $\alpha$ en la colestasis.	68
4.1.1.1 Evaluación de la activación del RE $\alpha$ por E17G en cultivo primario de hepatocitos.	68
4.1.1.2 La inhibición del RE $\alpha$ protege parcialmente las alteraciones colestásicas producidas por E17G en DAHR.	69
4.1.1.2.1 Análisis del efecto a diferentes concentraciones de ICI.	69
4.1.1.2.2 Efecto de ICI en la alteración de la actividad de abcb11 y abcc2 inducida por E17G.	69
4.1.1.2.3 El tratamiento con ICI previene la internalización de los transportadores Abcb11 y Abcc2 provocada por E17G.	71

<b>4.1.1.3 Knock-down del RE<math>\alpha</math> en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>72</b>
<i>4.1.1.3.1 Validación de la transfección.</i>	<b>72</b>
<i>4.1.1.3.2 Viabilidad celular en la transfección.</i>	<b>73</b>
<i>4.1.1.3.3 Evaluación de la localización de Abcc2 y Abcb11 en cultivo primario de HRCS.</i>	<b>74</b>
<b>4.1.2 Relación del RE<math>\alpha</math> con otras vías de señalización implicadas en la colestasis por E17G.</b>	<b>77</b>
<b>4.1.2.1 Evaluación de la relación de la vía de PI3K con RE<math>\alpha</math>.</b>	<b>77</b>
<i>4.1.2.1.1 RE<math>\alpha</math> participa de manera complementaria con PI3K en la falla secretora canalicular inducida por E17G.</i>	<b>77</b>
<b>4.1.2.2 Relación de la vía de PKC<math>\epsilon</math> con RE<math>\alpha</math>.</b>	<b>78</b>
<i>4.1.2.2.1 RE<math>\alpha</math> no actúa de manera complementaria con PKC<math>\epsilon</math> en la falla secretora canalicular inducida por E17G.</i>	<b>78</b>
<i>4.1.2.2.2 La activación de RE<math>\alpha</math> precede a la activación de PKC<math>\epsilon</math> (PKC<math>\alpha</math>).</i>	<b>79</b>
<b>4.1.2.3 Evaluación de la interacción de la vía de GPR30/AC/PKA con RE<math>\alpha</math>.</b>	<b>80</b>
<i>4.1.2.3.1 La activación de RE<math>\alpha</math> y PKC<math>\alpha</math> es independiente a la activación de GPR30.</i>	<b>81</b>
<i>4.1.2.3.2 La activación de RE<math>\alpha</math> y PKC<math>\alpha</math> es independiente a la activación de AC.</i>	<b>82</b>
<i>4.1.2.3.3 El ICI previene parcialmente la activación de PKA inducida por E17G.</i>	<b>83</b>
<b>4.2 Experimentos in vivo.</b>	<b>84</b>
<i>4.2.1 Activación de RE<math>\alpha</math> en el modelo de animal entero.</i>	<b>84</b>
<b>4.2.2 Estudios en hígado aislado y perfundido de rata (HAPR).</b>	<b>85</b>
<i>4.2.2.1 Estudios de Flujo Biliar y Velocidad de excreción de DNF-G y Sales Biliares.</i>	<b>85</b>
<i>4.2.2.2 estudios de localización de transportadores en HAPR.</i>	<b>88</b>
<b>5 Discusión.</b>	<b>91</b>
<b>6 Conclusión.</b>	<b>107</b>
<b>Bibliografía.</b>	<b>109</b>

## Índice de Figuras.

<b>1.1 Sistemas de transporte del hepatocito.</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Esquemmatización de fuente y degradación de transportadores canaliculares.</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Posibles orígenes de las colestasis adquiridas.</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Estructura química del agente colestásico estradiol 17<math>\beta</math>-D-glucurónido.</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Diagrama de la obtención y estudios realizados en las DAHR.</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Esquemmatización de cómo se realiza el análisis densitométrico.</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Expresión de Abcb11, Abcc2 y RE<math>\alpha</math> en el cultivo primario de HRCS.</b>	<b>54</b>
<b>3.4. Funcionalidad de Abcc2 en el cultivo primario de HRCS.</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Estimación de la activación de RE<math>\alpha</math> por E17G.</b>	<b>68</b>
<b>4.2. Determinación de la protección máxima de ICI vs la injuria producida por E17G en la AVc de CGamF (izquierda) y GS-MF (derecha).</b>	<b>69</b>
<b>4.3. Prevención del daño producido por E17G en la Acumulación Vacuolar canalicular (AVc) de CGamF y GS-MF.</b>	<b>70</b>
<b>4.4. El inhibidor del receptor de estrógeno ICI previene la deslocalización de Abcb11 y Abcc2 inducida por E17G en DAHR.</b>	<b>72</b>
<b>4.5. <i>Knock-down</i> de RE<math>\alpha</math>.</b>	<b>73</b>
<b>4.6. Liberación de LDH en cultivos de células transfectadas.</b>	<b>74</b>
<b>4.7. Imágenes confocales representativas que muestran la distribución celular de Abcc2 (verde) en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>75</b>

<b>4.8. Imágenes confocales representativas que muestran la distribución celular de Abcb11 (verde) en cultivo primario de HRCS.</b>	<b>76</b>
<b>4.9. Efecto de la co-incubación de ICI y Wm sobre la alteración en la AVc de CGamF (A) y GS-MF (B) inducida por E17G</b>	<b>77</b>
<b>4.10. Efecto de la co-incubación de ICI y Gö6976 sobre la alteración en la AVc de CGamF (A) y GS-MF (B) inducida por E17G.</b>	<b>78</b>
<b>4.11. Activación de PKC<math>\alpha</math> mediada por E17G en presencia del inhibidor ICI.</b>	<b>79</b>
<b>4.12. Activación RE<math>\alpha</math> en presencia del inhibidor Gö6976.</b>	<b>79</b>
<b>4.13. Activación de RE<math>\alpha</math> y PKC<math>\alpha</math> mediada por E17G en presencia del inhibidor G15.</b>	<b>81</b>
<b>4.14. Activación de RE<math>\alpha</math> y PKC<math>\alpha</math> en presencia inhibidor DDA.</b>	<b>82</b>
<b>4.15. Activación de PKA por E17G en presencia de ICI.</b>	<b>83</b>
<b>4.16. La activación del RE<math>\alpha</math> por estradiol-17<math>\beta</math>-D-glucuronido <i>in vivo</i>.</b>	<b>84</b>
<b>4.17. ICI 182,780 protege contra el daño inducido por E17G del flujo biliar en el modelo de HAPR.</b>	<b>86</b>
<b>4.18. ICI 182,780 protege contra el daño inducido por E17G de la excreción de dinitrofenil-glutation y taurocolato en el modelo de HAPR.</b>	<b>87</b>
<b>4.19. La inhibición del RE<math>\alpha</math> previene la internalización de Abcb11 y Abcc2 en el modelo de HAPR.</b>	<b>89</b>
<b>4.20. Densitometría de las imágenes confocales de Abcb11 y Abcc2.</b>	<b>90</b>
<b>5.1. Modelo propuesto de la participación del RE<math>\alpha</math> en la colestasis por E17G.</b>	<b>106</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1. Vías de señalización activadas por estradiol no conjugado en diferentes tipos de células y tejido.</b>	<b>32</b>
<b>Tabla 2.1 Pre-tratamientos y tratamientos realizados en los estudios de deslocalización de Abcc2 y Abcb11 en el modelo de DAHR.</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 4.1. Estimación de los parámetros de la curva dosis-respuesta de la falla secretoria canalicular inducida por E17G en presencia de ICI (1 <math>\mu</math>M) representada en la Figura 4.3.</b>	<b>71</b>
<b>Tabla 4.2. La disminución de la excreción de TC y DNF-G por E17G y su prevención por la inhibición de RE<math>\alpha</math>.</b>	<b>88</b>

## Abreviaturas.

- ANOVA, análisis de la variancia,
- AC, adenilato ciclasa,
- BSA, albumina sérica bovina,
- CDNB, 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno,
- CGAmF, colil-glicil-amido-fluoresceína
- CMFDA, Cloro metil fluoresceína di acetato,
- Cy2, cianina 2
- Cy3, cianina 3
- AVc, acumulación vacuolar canalicular,
- DAHR, duplas aisladas de hepatocitos de rata ,
- DMSO, dimetilsulfoxido,
- DNF-G, dinitrofenil-glutati3n,
- E<sub>2</sub>, 17-β-estradiol
- E17G, estradiol-17β-D-glucur3nido,
- FITC, isotiocianato de fluoresceína,
- GFP, proteína de fluorescencia verde,
- GPR30, receptor asociado a proteína G 30,
- GSH, glutati3n reducido,
- GS-MF, glutati3n-metilfluoresceína,
- GSSG, glutati3n oxidado,
- HAPR, hígado aislado y perfundido de rata,
- HRCS, hepatocitos de rata en configuraci3n sándwich,
- ICI, ICI182,780,
- i.v., intravenosa;
- MAPK, “*Mitogen-activated protein kinase*”,
- MDR/Mdr, proteínas de resistencia a multidroga,
- MRP/Mrp, proteínas asociadas a la resistencia a multidroga,
- NAD, nicotinamida adenina dinucle3tido,
- NTCP/Ntcp, polip3ptido cotransportador de Na<sup>+</sup> y taurocolato,
- OATP/Oatp, polip3ptido transportador de aniones orgánicos,
- OCT/Oct, polipeptido transportador de cationes orgánicos,
- PBS, soluci3n amortiguadora de sales de fosfatos,
- PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa,
- PKA, proteína quinasa A,
- PKC<sub>c</sub>, proteína quinasa C (clásicas),
- PKC<sub>n</sub>, proteína quinasa (novel),
- RE, receptor de estr3genos,
- RE<sub>α</sub>, Receptor de estr3genos alfa,
- SB, sales biliares,
- TC, taurocolato ,
- TLC, taurolitocolato,
- TMD, dominio transmembrana,
- Transportadores ABC, transportadores “ATP binding cassette”,
- Transportadores SLC, transportadores “solute carrier”,
- WB, western blots.

## Resumen.

El estradiol 17 $\beta$ -D-glucurónido (E17G) induce colestasis aguda en la rata con internalización endocítica de los transportadores canaliculares, Abcb11 y Abcc2. Las vías de señalización de la proteína quinasa clásica (PKC $\alpha$ ) y las vías de señalización de PI3K juegan roles complementarios en la colestasis por E17G, también se ha reportado la participación de la vía GPR30/AC/PKA. Ya que el estradiol no conjugado es capaz de activar estas vías de señalización a través de la activación del receptor de estrógeno alfa (RE $\alpha$ ), en este trabajo de Tesis se postula como hipótesis la participación de RE $\alpha$  en las manifestaciones colestásicas del E17G en el modelo de Hígado Aislado y Perfundido de rata (HAPR) como así también en modelos de cultivos primario de hepatocitos de rata. En el modelo de HAPR y en cultivo primario de hepatocitos, el E17G activó el RE $\alpha$ . En HAPR, E17G disminuyó el flujo biliar y las excreciones de dinitrofenil-glutation, y taurocolato (sustratos específicos de Abcc2 y Abcb11, respectivamente) en aproximadamente 60 %; la pre-administración de ICI (inhibidor de RE $\alpha$ ) previno en forma casi completa estas disminuciones. En el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR), un modelo polarizado de hepatocitos en cultivo, el tratamiento con E17G disminuyó la acumulación vacuolar canalicular de colil-glicil-amido fluoresceína (sustrato de Abcb11) con un CI50 de 91 $\pm$ 1  $\mu$ M. El tratamiento con ICI aumentó la CI50 a 102 $\pm$ 1  $\mu$ M, y similarmente previno la disminución de la acumulación vacuolar canalicular del sustrato de Abcc2, glutatión-metil fluoresceína, con una CI50 de 104 $\pm$ 1 $\mu$ M sin ICI y un CI50 de 164 $\pm$ 2  $\mu$ M en presencia del inhibidor. El inhibidor ICI también previno completamente la internalización endocítica de los transportadores canaliculares Abcb11 y Abcc2.

La participación de RE $\alpha$  se confirmó a través del uso de *knock-down* del RE $\alpha$  en cultivo primario de hepatocitos en configuración “sándwich” (HRCS) donde se observó que la disminución de la expresión de RE $\alpha$  previno la internalización de ambos transportadores cuando las células fueron tratadas con E17G.

En el modelo de DAHR, la protección de ICI tuvo un efecto sumatorio cuando fue probado conjuntamente con Wortmanina, un inhibidor de PI3K pero no se observó un efecto sumatorio con el inhibidor Gö6976, un inhibidor de PKC $\epsilon$ ; sugiriendo que RE $\alpha$  forma parte de la vía de señalización de PKC $\epsilon$  pero no de la vía de señalización de PI3K. Un análisis más detallado de las activaciones RE $\alpha$  y PKC $\epsilon$  inducida por E17G, demostró que ICI no afecta a la activación PKC $\epsilon$  mientras que Gö6976 impidió la activación de RE $\alpha$ , lo que indica que la activación de PKC $\epsilon$  (evaluada a través de la activación de PKC $\alpha$ ) precede a la activación de RE $\alpha$ . Por otro lado, también se observó mediante la técnica de western blot en cultivo primario de hepatocitos que la activación de RE $\alpha$  ocurriría independientemente de la vía GPR30/AC/PKA y que probablemente la fosforilación de sustratos de PKA (o su mantenimiento en estado fosforilado) depende de la activación de RE $\alpha$ .

*Conclusión:* el RE $\alpha$  está implicado en la falla secretora biliar inducida por E17G y su activación ocurre luego de la activación de PKC $\epsilon$ . RE $\alpha$  activado participaría en cascadas de señalización que conducen a la desinserción como por ejemplo las derivadas de la activación de PKA.



# **1-INTRODUCCIÓN**

## 1.1. Generalidades.

### 1.1.1. *Fisiología Hepatobiliar*

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo representando un 3 % aproximadamente del peso total de un adulto y se encuentra localizado en la región abdominal correspondiente al hipocondrio derecho. Recibe el 25 % del gasto cardíaco a través de una doble irrigación suministrada por la vena porta y la arteria hepática. La circulación general depende de la arteria hepática, rama del tronco celíaco que contiene la sangre oxigenada. En tanto, la irrigación portal aporta el 75 % aproximadamente del flujo sanguíneo (15 ml/min) y contiene sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del tracto gastrointestinal y del bazo.

El hígado cumple múltiples funciones que exceden el marco de la fisiología digestiva. Sin embargo, su interposición entre el tracto digestivo y el resto del organismo le confiere una ubicación que le permite procesar grandes cantidades de aminoácidos, azúcares, lípidos, vitaminas y xenobióticos que ingresan por vía oral, siendo por lo tanto la captación de numerosos sustratos absorbidos en el intestino y su ulterior depósito, metabolización y distribución en la sangre y en la bilis un papel de primer orden que cumple el hígado (1).

En la Antigua Grecia la teoría de los cuatro humores propuesta por Hipócrates sostenía que todas las enfermedades y los cambios de temperamento o "humor" se explicaban a partir de la influencia de cuatro líquidos corporales que se denominaban "humores": sangre, flema, bilis negra y *bilis amarilla*. En esencia, esta teoría sostiene que el cuerpo humano está lleno de estos cuatro humores (líquidos), cuyo equilibrio indica el

## Introducción

---

estado de salud de la persona. Así, todas las enfermedades y discapacidades resultarían de un exceso o un déficit de los humores. Tanto griegos y romanos como el resto de posteriores sociedades de Europa que adoptaron y adaptaron la filosofía médica clásica, consideraban que cada uno de los cuatro humores aumentaba o disminuía en función de la dieta y la actividad de cada individuo. Cuando un paciente sufría de superávit o desequilibrio de líquidos, entonces su personalidad y su salud se veían afectadas.

La formación de bilis, conocida desde la antigüedad como uno de los cuatro humores, es una de las funciones más cruciales del hígado, dado que es esencial para la digestión y absorción normal de lípidos desde la luz intestinal. En su composición se destacan las sales biliares que son esenciales para dicho proceso. Además, es una vía de excreción para una gran variedad de compuestos tales como: bilirrubina, colesterol, hormonas y xenobióticos (2).

La célula parenquimatosa del hígado es el hepatocito. Esta es una célula epitelial polarizada con forma poliédrica conformada por ocho o más caras y que mide entre trece y treinta micras de diámetro. Su membrana plasmática puede dividirse en dos sectores o dominios, la membrana basolateral o sinusoidal, que relaciona al hepatocito con el espacio de Disse (intersticio) y los capilares sinusoides allí presentes, y la membrana apical, también llamada canalicular, que junto a la membrana homónima del hepatocito vecino constituyen el canalículo, el primer conducto de la vía biliar. Estos dominios de membrana expresan distintos sistemas de transporte, que juegan un rol clave en el transporte vectorial de solutos y agua desde la sangre sinusoidal hasta la bilis, contribuyendo así a la formación de la misma y a la excreción biliar de diversas sustancias (3).

## Introducción

---

El transporte requiere además que los espacios plasmático y canalicular no estén libremente conectados; la conservación de un espacio hermético en el lugar donde estos gradientes se forman, esto es en el canaliculo biliar, resulta indispensable para impedir la disipación de estos gradientes, ocasionado por la retrodifusión a plasma de los solutos que puede ocurrir por la vía paracelular. Estas propiedades dependen fundamentalmente de la integridad estructural y funcional de las uniones estrechas entre los hepatocitos, las cuales forman una especie de cinturón hermético entre hepatocitos vecinos conformando la *zonula occludens*, que separa al canaliculo biliar del espacio de Disse (4).

### **1.1.2 Las sales biliares.**

Los ácidos biliares son un grupo de compuestos derivados del colesterol que son sintetizados en los hepatocitos y excretados a bilis. La mayoría de los ácidos biliares son reabsorbidos por el intestino delgado y transportados nuevamente al hígado por la circulación portal (5), proceso conocido como recirculación enterohepática. La síntesis de ácidos biliares involucra la conversión enzimática de colesterol a ácidos biliares primarios. Se han caracterizados dos vías principales responsables de la síntesis de ácidos biliares (6):

1 - La *vía clásica* produce los ácidos biliares a través de la conversión de colesterol por las enzimas hepáticas CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1, lo que resulta en la síntesis de dos ácidos biliares primarios, el ácido cólico (CA) y el ácido quenodesoxicólico (CDCA), en cantidades aproximadamente iguales. La actividad de la enzima CYP7A1 es la etapa limitante en la síntesis de estos dos ácidos biliares.

2 - La *vía alternativa o ácida* involucra la conversión mitocondrial de colesterol a 27-hidroxicolesterol por la enzima CYP27A1. Este compuesto posteriormente sale al

## Introducción

---

citósol donde prosiguen las reacciones de síntesis convirtiéndose mayoritariamente en CDCA.

Los ácidos biliares primarios sintetizados en el hígado son conjugados con taurina o glicina. Tanto el carboxilo de la glicina como el grupo sulfato de la taurina están totalmente ionizados a pH fisiológico, por lo que estas formas conjugadas suelen ser denominadas sales biliares, que es la forma a la que se referirán a lo largo de este trabajo de Tesis. Las sales biliares son impermeables a las membranas y esto tiene el efecto de reducir la citotoxicidad en comparación a las especies no conjugadas y por lo tanto no ionizadas. La acumulación de grandes cantidades de ácidos biliares hidrofóbicos es tóxica para los hepatocitos y colangiocitos, por tanto, su síntesis y su transporte están estrictamente regulados (7).

### ***1.1.3 La secreción biliar.***

En la actualidad ha sido definitivamente confirmado el postulado de la publicación pionera de Sperber (8), el cual establece que la formación de la bilis es un proceso osmótico cuya fuerza impulsora está dada por la secreción activa de compuestos osmóticamente activos al canalículo. Por el contrario, cambios en la presión de perfusión sinusoidal no afectan la formación normal de bilis (9).

Para que un soluto sea capaz de promover el transporte primario de agua desde la sangre sinusoidal a la luz canalicular, éste debe ser secretado activamente y concentrado en el espacio canalicular. Una vez secretado, este soluto puede promover el movimiento de agua a través de las rutas paracelular y transcelular. El transporte transcelular es el más trascendente (10;11;12), y se encuentra facilitado por la existencia de canales de agua

## Introducción

---

(aquaporinas) en los dominios de membrana basolateral y canalicular del hepatocito (10;12;13).

De los solutos presentes en la bilis, sólo tres cumplen con los requisitos para ser fuerzas impulsoras primarias de su formación: las sales biliares (SB), el  $\text{HCO}_3^-$  y el glutatión. Las SB contribuyen a la fracción del flujo biliar (FB) denominada “dependiente de SB” (FBDSB), mientras que el  $\text{HCO}_3^-$  y el glutatión son responsables, al menos en gran parte, de la formación de la fracción del FB canalicular “independiente de SB” (FBcISB). Esta bilis primaria secretada a nivel canalicular es luego modificada por los colangiocitos durante su tránsito a través de los conductos biliares. Esta modificación va a ser la resultante de un balance entre la secreción de un fluido rico en  $\text{HCO}_3^-$ , estimulada por secretina, y una reabsorción constante y obligatoria de agua y electrolitos (flujo ductular) (10;14).

### ***1.1.4 Sistemas de transporte de los hepatocitos.***

En la mitología griega, tal vez el transportador más conocido era Caronte o Carón, quien era el barquero del Hades, encargado de transportar las sombras errantes de los difuntos recientes de un lado a otro del río Aqueronte si tenían un óbolo para pagar el viaje, razón por la cual en la Antigua Grecia los cadáveres se enterraban con una moneda bajo la lengua. Aquellos que no podían pagar tenían que vagar cien años por las riberas del Aqueronte, tiempo después del cual Caronte accedía a portearlos sin cobrar. Como conclusión de esta breve historia mitológica podemos decir que el ser transportado acarrea un costo ya sea de dinero (moneda) o tiempo (años en las riberas), y en el caso del transporte a través de membranas biológicas, de energía.

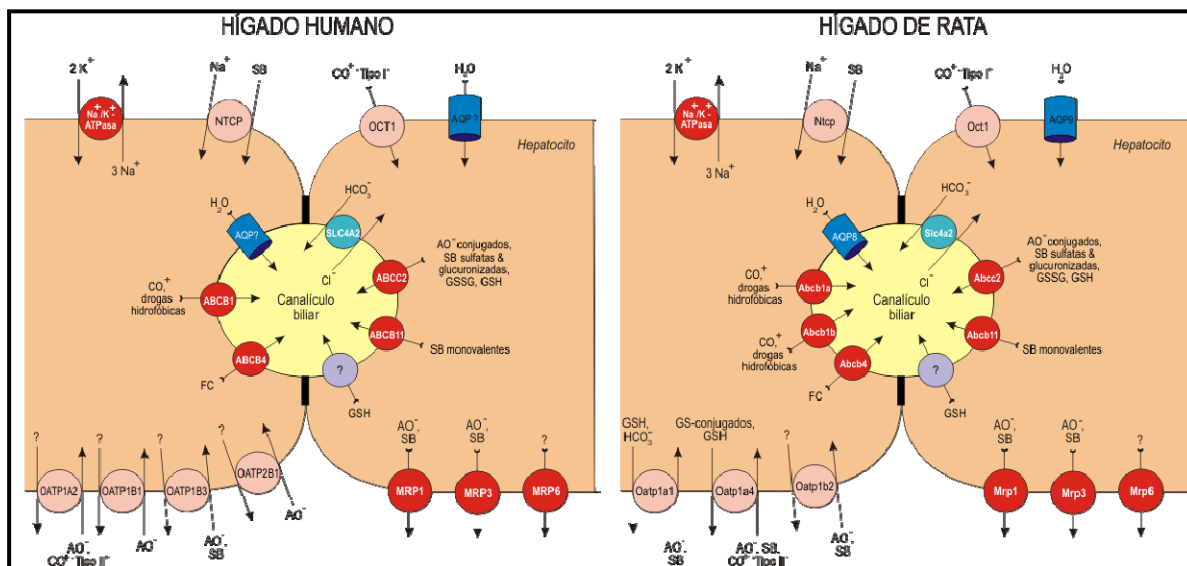
## Introducción

---

En los conceptos de la biología moderna los transportadores son proteínas especializadas que atraviesan la bicapa lipídica de la membrana celular e intervienen en la translocación de sustancias químicas dentro y fuera de las células mediante mecanismos activos y pasivos. El transporte activo se produce cuando los solutos son transportados a través de las membranas biológicas contra un gradiente de concentración y/o un potencial electroquímico. En el transporte activo primario, los sustratos pasan unidireccionalmente a través de bombas de transporte utilizando la energía generada a partir de la hidrólisis de ATP. Durante este proceso, los sustratos se unen al transportador, provocando un cambio conformacional en la proteína transportadora que permite la liberación del sustrato en el otro lado de la membrana. El transporte activo secundario se produce cuando el transporte contra gradiente de un sustrato es acoplado al transporte de un co-sustrato (típicamente, un ión). El acoplamiento del transporte de solutos a través de una membrana puede ocurrir en la misma dirección (co-transporte o simporte) o en direcciones opuestas (contra-transporte o antiporte). El transporte antiporte a menudo creará un gradiente electroquímico que por sí mismo podría ser utilizado para el transporte activo terciario.

La secreción biliar es un proceso fisiológico complejo que implica el flujo de sustancias desde el plasma hasta la bilis donde participan transportadores que se hallan en las membranas basolateral y canalicular del hepatocito (Figura 1.1)

# Introducción



**Figura 1.1 Sistemas de transporte del hepatocito.** Abreviaturas usadas: AO<sup>-</sup>, aniones orgánicos; CO<sup>+</sup>, cationes orgánicos; SB, sales biliares; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GS-conjugados, compuestos orgánicos conjugados con GSH; FC, fosfatidilcolina.

Las SB son transportadas a nivel basolateral por Ntcp/NTCP utilizando como fuerza impulsora el gradiente transmembrana de Na<sup>+</sup>, generado y mantenido por la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (15) y por Oatps/OATPs que transportan SB en forma independiente de Na<sup>+</sup> (de naturaleza no electrogénica). Los transportadores Oatps/OATPs son también encargados de captar otros aniones orgánicos a nivel basolateral (16;17).

Estos compuestos colefilicos son excretados dentro de la bilis principalmente por bombas dependientes de ATP pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), particularmente por la familia de *proteínas resistentes a multidrogas* (MDR/Mdr) o por la familia de *proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas* (MRP/Mrp) (18;19).



## Introducción

---

Las sales biliares monoaniónicas son transportadas en la membrana apical por la *bomba exportadora de sales biliares* (BSEP/Bsep) o ABCB11/Abcb11, la cuál es responsable del transporte del 80% de las sales biliares (17). Las sales biliares determinan el FBDSB. Abcb11 es un polipéptido multifuncional de 150-170 kDa con dos mitades homologas, cada una con seis dominios transmembranas, los cuales están implicados en la especificidad del sustrato y un dominio ABC, que contiene motivos involucrados en la unión e hidrólisis de ATP (20;21).

En contraste, el eflujo canalicular de sales biliares divalentes, sulfatadas o glucuronizadas, esta mediado por la proteína asociada a la resistencia a multidrogas 2 (Mrp2) o Abcc2 (22;23). Este transportador, perteneciente a la familia de transportadores ABC, también media la excreción biliar de muchos otros aniones orgánicos, incluyendo conjugados con glutatión (leucotrienos C4 o bromosulfoftaleína) o con ácido glucurónico (bilirrubina y estrógenos glucuronizados), glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH), este último con menor afinidad que GSSG (24;25). Tanto GSSG como GSH, son los principales determinantes del FBcISB (26). El transportador Abcc2 tiene una masa molecular de 200 kDa, con múltiples dominios transmembrana y dominios conservados de unión e hidrólisis de ATP (2;27). Estos dos transportadores canaliculares mencionados son los más relevantes involucrados en la formación de la bilis (18;28;29). El transporte activo de fosfatidilcolina a través de la membrana canalicular es mediado por la proteína de resistencia a multidrogas MDR3 (Mdr2 en roedores) o ABCB4/Abcb4, esto resulta en la formación de micelas mixtas en los canaliculos biliares, constituídas por sales biliares, fosfolípidos y colesterol y por lo tanto hace que las sales biliares sean menos citotóxicas (30).

## Introducción

---

Las proteínas ABCB/Abcb (MDRs/Mdrs), grupo al cual pertenece el transportador Abcb11/ABCB11, fueron originalmente descritas en líneas celulares cancerosas, a las cuales le conferían resistencia a agentes quimioterapéuticos. Éstos fueron los primeros transportadores ABC identificados en la membrana canalicular de hepatocitos normales. Además del transportador de sales biliares, tres productos génicos han sido identificados en roedores, Abcb1a (Mdr1a), Abcb1b (Mdr1b) y Abcb4 (Mdr2), mientras dos han sido identificados en humanos ABCB1 (MDR1) y ABCB4 (MDR3). ABCB4 comparte 75 % de identidad de aminoácidos con ABCB1, mientras que Abcb4 de rata comparte 72 % de identidad de aminoácidos con Abcb1b (31). La función de ABCB1/Abcb1 es facilitar el eflujo de una gran variedad cationes voluminosos (tipo II) anfífilicos, junto con otros compuestos hidrofóbicos, tales como metabolitos, toxinas endógenas y exógenas, hormonas esteroides, péptidos hidrofóbicos y algunos glicolípidos (31).

De manera similar, la proteína heterodimérica formada por ABCG5 (Abcg5)/ABCG8 (Abcg8), ambas pertenecientes a la subfamilia G de transportadores ABC, facilita la excreción biliar de colesterol, translocando este lípido desde la cara interna a la cara externa de la membrana canalicular, seguido por su incorporación a micelas mixtas (junto con fosfatidilcolina y SB) en la bilis (32;33).

El transporte canalicular de  $\text{HCO}_3^-$  es mediado por el intercambiador aniónico de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (AE2), también llamado Slc4a2. Este transportador pertenece a la familia de intercambiadores aniónicos independientes de  $\text{Na}^+$  y funciona regulando el pH intracelular cuando los hepatocitos son expuestos a un medio alcalino. Además, Slc4a2 (AE2) participa en la generación del flujo biliar dado que la excreción de  $\text{HCO}_3^-$  es una fuerza impulsora

primaria adicional del FBcISB. En humanos y en ratas, tres transcritos de Slc4a2 han sido descritos (27;34).

Como ya se ha comentado recientemente, la formación de la bilis es un proceso secretorio osmótico resultante de la secreción canalicular de agua en respuesta a gradientes osmóticos creados por el transporte activo de solutos. El flujo biliar depende finalmente de la actividad de estos transportadores canaliculares como así también de la permeabilidad al agua del dominio canalicular. Esta permeabilidad está determinada por canales de agua conocidos como aquaporinas (AQPs). En mamíferos, se han descrito 13 AQPs, de las cuales, se demostró que cuatro se expresan en hepatocitos: AQP0, AQP8, AQP9 y AQP11. Dentro de este grupo, AQP8 y AQP9 son las de mayor relevancia en la determinación del flujo biliar, localizándose la AQP9 en la membrana basolateral y la AQP8 en la membrana canalicular (12;35;36;37). Un gran número de estudios ha mostrado que la regulación, ya sea de la localización o de la expresión de AQP8, modifica la permeabilidad de la membrana canalicular al agua. Estos estudios sugirieron, por lo tanto, que AQP8 tendría un rol primordial en la formación de la bilis, facilitando el movimiento osmótico de agua (10;37;38;39;40;41;42).

### **1.1.4.1. Regulación de la actividad de los sistemas de transporte canalicular.**

La regulación de la actividad de los sistemas de transporte canalicular es de vital importancia para el mantenimiento de una adecuada tasa secretora biliar. La función de los transportadores de tipo ABC puede regularse a tres niveles diferentes: *transcripcional*, *post-transcripcional* y *post-traducciona*l; los eventos regulatorios a estos niveles producen cambios en la actividad de los transportadores que se manifiestan en el término de días, horas o minutos, respectivamente. La regulación de la actividad a largo plazo ocurre por

## Introducción

---

cambios en la expresión de los transportadores, lo que ocurre por modificaciones en el balance de síntesis y degradación de los mismos. La alteración en la tasa de síntesis de los transportadores implica cambios en la regulación *transcripcional* o *traduccional*. Por otro lado, la modificación de la tasa de degradación de los transportadores es un proceso ligado a la regulación *post-traduccional*. Este proceso puede implicar la internalización sostenida en el tiempo de los transportadores canaliculares de su dominio de membrana plasmática, seguido de la degradación lisosomal.

Otra regulación *post-traduccional* es la ligada a los cambios reversibles en la localización de los transportadores por inserción o internalización de los mismos mediada por el tráfico de vesículas desde o hacia un compartimiento de reciclaje endosomal que pueden ocurrir en un período de tiempo corto como parte de un mecanismo fisiológico destinado a regular rápidamente la densidad de los transportadores canaliculares en la membrana plasmática. Este es un proceso estrictamente regulado, y las vías de señalización implicadas están siendo caracterizadas activamente. Finalmente, cambios en el estado de fosforilación de los transportadores podrían regular su actividad aun estando localizado en la membrana.

### ***1.1.4.1.1. Tráfico y reciclado de transportadores canaliculares.***

El reclutamiento de transportadores hacia la membrana canalicular en respuesta a estímulos específicos representa un mecanismo clave por el cual puede modularse la densidad de transportadores en la misma y, por lo tanto, la  $V_{m\acute{a}x}$  de los procesos secretorios asociados a estos transportadores. Estos mecanismos regulatorios tienen lugar en el orden de minutos y podrían ser altamente efectivos para modular la secreción canalicular, ya que los  $K_m$  para el transporte de aniones y cationes orgánicos medidos en

## Introducción

---

vesículas de membrana canalicular sugieren que estos sistemas de transporte estarían trabajando, en situación basal, en condiciones cercanas a la saturación (29); de este modo, sería necesario modular su  $V_{\text{máx}}$  para lograr el aumento de la capacidad de transporte requerido bajo condiciones de estimulación.

Una de las fuentes de transportadores canaliculares es su síntesis *de novo*. Una vez sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, los transportadores canaliculares ATP-dependientes viajan a través del complejo de Golgi, dirigiéndose hacia la membrana apical e insertándose en la misma (43). Inicialmente, una serie de experimentos en hígado de rata habían evidenciado que muchas proteínas canaliculares luego de su síntesis eran transferidas a la membrana basolateral y luego al canalículo biliar por un mecanismo de transcitosis. Posteriormente, mediante estudios de marcado isotópico de proteínas realizados *in vivo* mediante pulso y caza de  $^{35}\text{S}$ -metionina, seguidos de inmunoprecipitación de los transportadores Abcb1 (Mdr1), Abcb4 (Mdr2) y Abcb11 (Bsep), se evidenció que estos transportadores, luego de su síntesis, son transferidos directamente a la membrana canalicular, dado que no pudieron ser detectados en ningún momento en el dominio basolateral (44). En otra serie de experimentos, se obtuvo evidencia confirmatoria de un mecanismo de transferencia directa utilizando un inhibidor del tráfico vesicular microtúbulo-dependiente como la colchicina, cuya administración condujo a la acumulación en la membrana basolateral de las proteínas de membrana canalicular de tráfico indirecto (ej.: cCAM105), pero no de transportadores del tipo ABC (45). Este estudio mostró también que el tráfico desde Golgi a la membrana canalicular difiere entre los transportadores estudiados. Mientras que Abcb1 y Abcb4 se hallan totalmente localizados en la membrana canalicular treinta minutos luego de la administración de  $^{35}\text{S}$ -metionina, Abcb11, por el contrario, sólo alcanza este dominio de membrana luego de dos

## Introducción

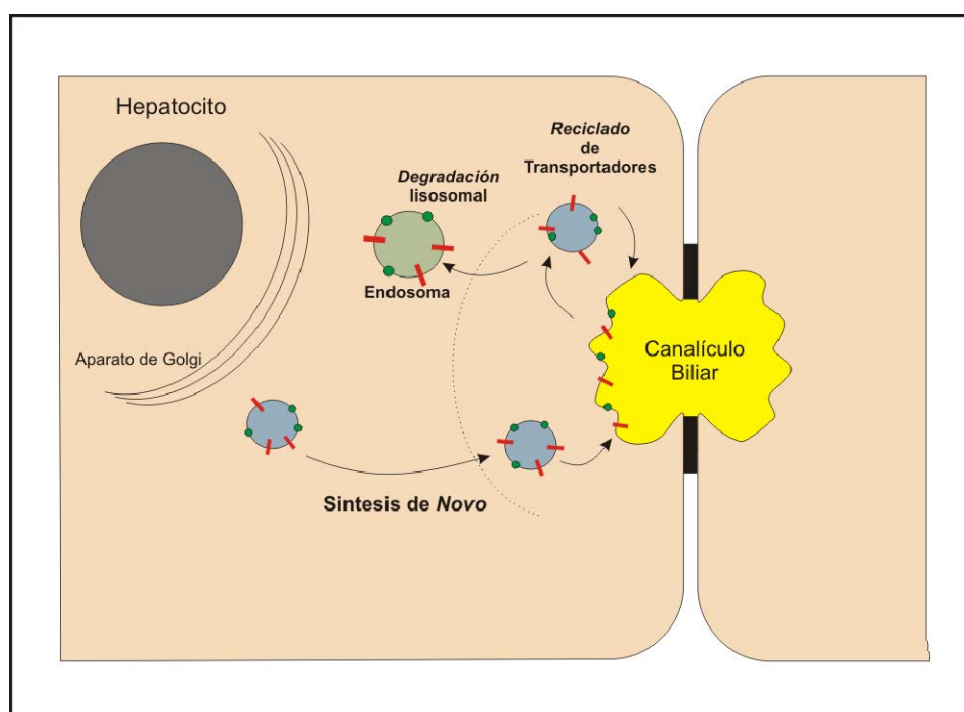
---

horas (43). Esto sugería que Abcb11 podría ser secuestrado en un compartimiento endosomal intracelular antes de alcanzar su destino final. Esta posibilidad fue confirmada en líneas celulares WIF-B transfectadas con genes que codificaban una proteína quimérica formada por el respectivo transportador unido a la “proteína fluorescente verde” (“green fluorescent protein”, GFP). En esta serie de experimentos se observó por microscopía confocal que, luego de la transfección, la proteína quimérica se localizaba en el dominio canalicular y también era reclutado en endosomas, colocalizando en ellos con la proteína Rab11a (marcador endosomal) (46). En otra serie de estudios realizados en estas líneas celulares, se observó que Abcc2, luego de su síntesis, además de localizarse en la membrana canalicular, también colocalizaba con este marcador endosomal indicando su reclutamiento en estos endosomas (46).

Otra fuente de transportadores canaliculares es el *reciclado* desde un compartimiento endosomal de transportadores pre-existentes; este compartimiento sirve como un reservorio, almacenando transportadores que estarán disponibles ante una demanda fisiológica. El proceso de reciclado comprende la inserción exocítica de vesículas que contienen dichos transportadores, seguido de su internalización endocítica, una vez que la demanda ha sido satisfecha (47). Asimismo, este compartimiento puede evitar que sufran degradación; esto podría explicar el elevado tiempo de vida media de estos transportadores, que puede llegar hasta cinco días (43). La existencia de este compartimiento de reciclado está sustentado por un número de evidencias experimentales recientes: mediante microscopía inmunoelectrónica, se demostró que, en los hepatocitos de rata, Abcb11 puede ser detectada en estructuras vacuolares cercanas a la membrana apical, además de en la propia membrana (20); esta localización pericanalicular pudo demostrarse también para Abcc2, Abcb11 y Abcb1 mediante tinción inmunofluorescente en el modelo

## Introducción

de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) (48); la administración de  $^{35}\text{S}$ -metionina *in vivo*, seguida del seguimiento tardío de su incorporación a proteínas reveló que Abcb11 se distribuye tanto en la membrana canalicular como en una fracción endosomal combinada, la cual podría representar el compartimiento de reciclado; el reciclado entre la membrana canalicular y endosomas subapicales pudo ser directamente visualizado para Abcb11 (49) y Abcc2 (50;51) (Figura 1.2).



**Figura 1.2 Esquemática de fuente y degradación de transportadores canaliculares.**

Mientras que los factores que gobiernan la inserción de transportadores ABC en la membrana canalicular fueron extensivamente estudiados, mucho menos se conoce acerca de los eventos que gobiernan la *internalización* de los transportadores desde el dominio apical. Rahner y *col.* (52) mostraron que marcadores de endocitosis de membrana y de fase fluida expuestos a la membrana apical de hepatocitos desde el lado luminal, fueron rápidamente internalizados por vesículas de clatrina y dirigidos a un compartimiento

## Introducción

---

subapical. Estudios recientes realizados por Lam *y col.* (53) sugieren que la internalización constitutiva de Abcb11 sería mediada por estas vesículas. En este estudio se encontró además en el dominio C-terminal (aminoácidos 1284-1321) de esta proteína una secuencia conservada entre especies ( $^{1310}\text{YYKLV}^{1314}$ ) que sería clave en la señal para la internalización constitutiva del transportador. A su vez, se observó por alineamiento de secuencias que esta secuencia se encuentra conservada en la familia de transportadores ABC canaliculares, lo cual permite especular que la endocitosis de muchos de estos transportadores se llevaría a cabo por mecanismos similares a los de Abcb11.

En estudios realizados en DAHR se evaluó la dependencia del tráfico vesicular de transportadores canaliculares, de la integridad de los microtúbulos y el citoesqueleto de actina. Utilizando tinción inmunofluorescente, seguida de visualización por microscopía confocal, Roelofsen *y col.* estudiaron el tráfico de Abcc2 luego del aislamiento de las DAHR (54). Estos autores observaron que, luego de una hora de aislamiento, Abcc2 (Mrp2) está principalmente confinado a grupos de vesículas junto a la membrana plasmática, las cuales son luego internalizadas y finalmente redirigidas a la membrana canalicular, de modo que luego de tres horas, la mayoría del Abcc2 celular está localizado en este dominio de membrana. Este estudio también mostró que este proceso es parcialmente dependiente de la integridad de los microtúbulos, ya que la administración de nocodasol, que inhibe la polimerización de los mismos, disminuyó el direccionamiento de Abcc2 a la membrana canalicular, sin llegar a bloquearlo totalmente. Este fenómeno fue observado también en otro estudio en el cual la administración de colchicina (compuesto que desorganiza microtúbulos) produjo sólo una alteración marginal en la capacidad de las DAHR para recuperar la función de transporte canalicular del sustrato de Abcb11 (Bsep), colil-lisil-fluoresceína (CLF) (55); este resultado indicaría que la mayoría de Abcb11 pudo



## Introducción

---

reinsertarse en el polo canalicular, aun cuando la función microtubular fue deteriorada. Por el contrario, la desorganización del citoesqueleto de actina, usando citocalasina D como agente diruptor, bloqueó completamente el restablecimiento de la capacidad de transporte de CLF (55). Tomados de conjunto, estos hallazgos indicarían que el movimiento de las vesículas conteniendo transportadores de membrana es mayormente dependiente de la integridad de la red de microfilamentos de actina. Roma *y col.* también estudiaron el rol de vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de PKC en la recuperación de la función de transporte canalicular y en la re inserción de Abcc2 en DAHR (55). Estos estudios mostraron que ambos procesos son dependientes de la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mientras que este fenómeno podría desencadenar al mismo tiempo un mecanismo contra-regulatorio, ya que la activación de isoformas de PKC  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes ejerce un efecto inhibitorio.

Como se describió hasta el momento, el mantenimiento de una densidad de transportadores apropiada en la membrana canalicular se encuentra finamente regulado y es clave, y de vital importancia para sostener una tasa secretora biliar adecuada. El desbalance de los procesos de desinserción y re inserción de transportadores con disminución de densidad de los mismos en el dominio canalicular puede producir alteraciones en la excreción biliar normal de los diferentes sustratos. La disminución de esta excreción normal de sustratos, en la cual nos enfocaremos en el presente trabajo de Tesis, lleva a una alteración conocida como colestasis y será tratada detalladamente en los siguientes apartados.

## 1.2. Generalidades de Colestasis.

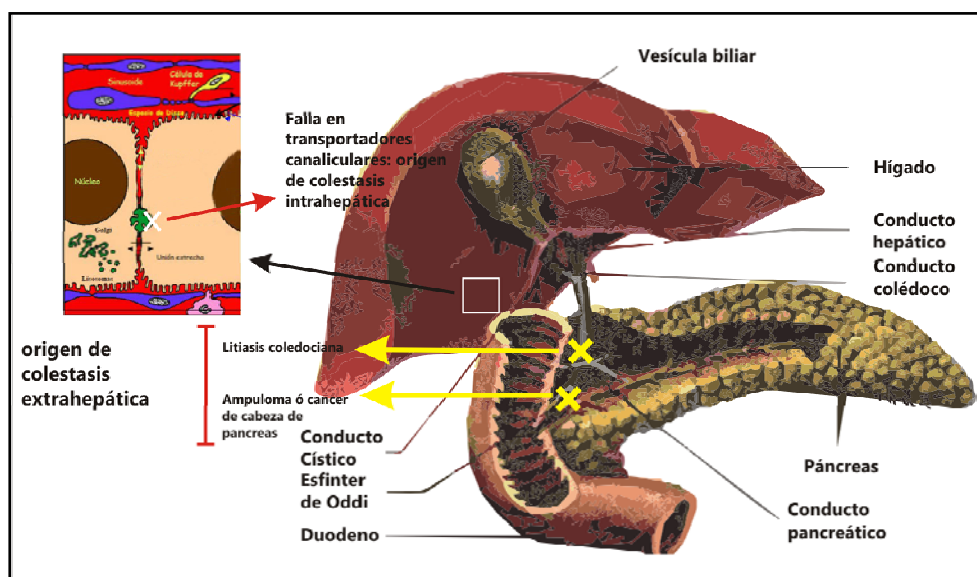
El término colestasis, el cual significa literalmente “estancamiento de la bilis”, indica, desde el punto de vista fisiopatológico, un disturbio de la secreción biliar capaz de provocar una reducción o cese total del flujo de bilis que llega al duodeno, llevando a la retención de constituyentes biliares en el hígado y en la sangre, conduciendo a manifestaciones clínicas características, como prurito e ictericia, incremento en la sangre de enzimas como fosfatasa alcalina,  $\gamma$ - glutamil transpeptidasa y 5'-nucleotidasa, así como a un variable aumento en la bilirrubina, sales biliares y colesterol (56;57).

Estos cuadros colestásicos pueden tener un origen genético o adquirido. Dentro de los trastornos genéticos podemos mencionar a aquellos que ocurren durante el desarrollo de los conductos biliares, como: atresia de las vías biliares, síndrome de Alagille, y enfermedad hepática fibropoliquística, etc. (56). Las colestasis adquiridas pueden ser de origen obstructivo o hepatocelular (Figura 1.3). La obstrucción puede deberse a la presencia de cálculos biliares o tumores, mientras que la hepatocelular se debe a un desorden funcional de los hepatocitos donde se está llevando a cabo la formación de bilis, ya sea por enfermedades inmunitarias (Cirrosis biliar primaria o Colangitis esclerosante primaria), por agentes infecciosos (citomegalovirus, colangitis bacteriana o infecciones por *Cryptosporidium*), en eventos isquémicos (post-trasplante, estenosis de arteria hepática o rechazo crónico del hígado trasplantado) y finalmente por drogas (ciclosporina A, anticonceptivos estrogénicos, andrógenos, antidepresivos tricíclicos, etc.) o endobióticos, por embarazo o por nutrición parenteral total, entre otros. Estos desórdenes colestáticos pueden estar asociados a defectos en la función de los sistemas de transporte hepatocelular involucrados en el transporte a bilis (56).

# Introducción

Estudios genéticos en el hombre y en animales transgénicos revelaron que la herencia de mutaciones recesiva en los genes que codifican para algunos de los transportadores hepáticos mencionados anteriormente producen fenotipos hepatobiliares; por ejemplo, un defecto en ABCB11 y ABCB4 produce colestasis intrahepática familiar tipo 2 y 3 respectivamente; un defecto en ABCC2 produce el Síndrome de Dubin Johnson y defectos en ABCG5 o ABCG8 producen sitosterolemia (58).

Varios modelos animales de colestasis hepatocelular reproducen las características de las enfermedades humanas colestáticas de tipo adquiridas y han ayudado en gran medida al entendimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a estas patologías.



**Figura 1.3: Posibles orígenes de las colestasis adquiridas.** Colestasis extrahepática por obstrucción del colédoco (por ej. Por litiasis o por ampuloma), ó colestasis intrahepática por falla en los sistemas de transporte canaliculares.

## 1.2.1. Colestasis inducidas por drogas.

Dentro de este grupo de colestasis, son de especial interés aquellas debidas a hormonas y derivados hormonales tales como estrógenos, testosterona C17-sustituida y

## Introducción

---

esteroides anabólicos (59). Los estrógenos son considerados agentes causales de la colestasis intrahepática del embarazo, así como también de aquella asociada a la administración de anticonceptivos orales o secundaria a la terapia de reemplazo hormonal (60). Debido a la importancia de su correlato clínico, la colestasis inducida por estrógenos en roedores es un modelo experimental de colestasis hepatocelular ampliamente utilizado. La injuria colestásica puede ser generada en el transcurso de días al administrar  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE) a ratas, o en minutos por administración de estradiol  $17\beta$ -D-glucurónido (E17G). Estos estrógenos inducen colestasis reduciendo tanto el FBDSB como el FBcISB (61).

### **1.2.1.1 Colestasis por $17\alpha$ -etinilestradiol (EE).**

El EE disminuye la captación sinusoidal de SB, en parte, por la disminución en la expresión de Ntcp en la membrana basolateral. A nivel canalicular, se demostró que EE disminuye el transporte ATP-dependiente de taurocolato en preparaciones vesiculares de membrana canalicular debido a una alteración post-transcripcional en la expresión de Abcb11 (62;63;64). La expresión del transportador Abcb11 se encuentra levemente afectada, mientras que la expresión de Abcc2 (Mrp2) disminuye en mayor grado, ambos a un nivel post-transcripcional (65). El EE también induce una disminución en la expresión de Oatps, afectando la transcripción de sus genes, junto con una inducción también transcripcional de Abcc3 (Mrp3) (64;66). La disminución en el flujo biliar independiente de SB inducida por EE puede deberse a la alteración en la excreción biliar de  $\text{HCO}_3^-$  (67) y GSH (68). La disminución en la excreción biliar de GSH puede, a su vez, estar asociada a una alteración a nivel post-transcripcional en la expresión de Abcc2 (65).

## Introducción

---

Finalmente, EE incrementa la permeabilidad de las uniones estrechas, con lo cual puede ocurrir reflujo por vía paracelular de los componentes determinantes de ambas fracciones del flujo biliar (65;67;68;69;70).

En cuanto a las vías de señalización involucradas en las acciones del EE, por un lado, se ha postulado que sus acciones se relacionan con la conversión a EE 17 $\beta$ -glucuronido (71;72) que es un potente colestásico (73), por lo que las vías de señalización activadas serían similares a las descritas para E17G (ver capítulo siguiente). Por otro lado, se ha observado que ratones “knock out” para el receptor de estrógenos (RE) no sufren toxicidad por EE (74); la participación del receptor de estrógenos en el modelo de colestasis crónica por EE en ratas podría deberse a que la unión al receptor de estrógenos podría facilitar la llegada del EE al retículo endoplásmico para su glucuronización o a que la unión al receptor de estrógeno podría iniciar vías de señalización intracelular como ha sido demostrado para el estradiol (74;75).

### **1.2.1.2 Colestasis por estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronido (E17G).**

El estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronido (E17G) es un metabolito endógeno del estradiol glucuronizado en su anillo D (Figura 1.4). Los niveles de metabolitos de estrógenos D-glucuronizados aumentan durante el embarazo, pudiendo éste ser un factor clave en la patogénesis de la colestasis intrahepática que ocurre en las mujeres embarazadas (76). La administración de E17G a ratas hembras produce una colestasis dosis-dependiente, aguda y reversible, afectando las fracciones dependiente e independiente de sales biliares del flujo biliar. La máxima caída del flujo biliar se registra luego de veinte minutos de inyectado el compuesto, recuperándose parcialmente alrededor de los ochenta minutos y restableciéndose totalmente luego de tres horas. El estudio sobre los cambios en la

## Introducción

localización y actividad de Abcc2 en el hígado de ratas inyectadas i.v. con E17G demostró que este derivado estrogénico produce una internalización endocítica de Abcc2, la cual va acompañada de un deterioro en la actividad de este transportador, evidenciado por una disminución en la capacidad de transporte del sustrato modelo dinitrofenil-glutación (77). Además, se evidenció que la reinserción de Abcc2 en la membrana canalicular dependía de la integridad de microtúbulos ya que animales a los que se les pre-administraba colchicina, no recuperaban totalmente el flujo biliar, ni la velocidad de excreción de bilirrubina, fenómeno asociado a la falla en la reinserción de Abcc2 (Mrp2) (78). También se observó que la administración de E17G a ratas mutantes que no expresan Abcc2 no induce colestasis. Este hecho condujo a postular la existencia de algún tipo de interacción entre E17G y Abcc2 en el momento en que E17G está siendo transportado vía Abcc2 a la bilis. Esta interacción afectaría de algún modo la localización y la actividad de Abcc2, desencadenando, al menos en parte, los fenómenos colestásicos observados (79).

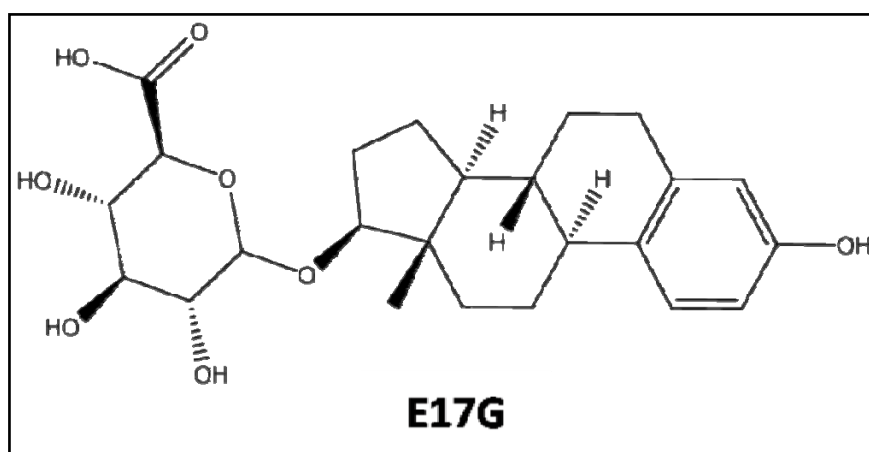


Figura 1.4: Estructura química del agente colestásico estradiol 17 $\beta$ -D-glucurónido.

## Introducción

---

Dado que Abcb11 es internalizado endocíticamente bajo las mismas condiciones que Abcc2, es posible que exista una asociación cercana entre estos transportadores canaliculares. Se ha propuesto la existencia de un mecanismo de trans-inhibición de Abcb11 inducido por E17G (80) a través de una interferencia con el transporte de sales biliares mediado por Abcb11 como consecuencia de la interacción entre E17G y Abcc2 aunque su relevancia *in vivo* es dudosa (79;81).

Las acciones colestásicas de E17G no parecen vincular a acciones directas del estrógeno sobre las estructuras que altera sino que actúa a través de activar distintas vías de señalización intracelular que se ha convertido en un hecho fundamental para explicar el desarrollo de diferentes modelos de colestasis (82;83;84;85;86)

### ***1.2.2. Rol de vías de señalización intracelular en colestasis.***

#### **1.2.2.1 Señalización por PKC y PI3K/Akt.**

La familia de proteínas quinasas C (PKCs) está constituida por un grupo de serin treonin quinasas dependientes de fosfolípidos. Esta familia consiste de al menos 10 miembros, divididos en 3 subgrupos: PKC clásicas (PKCc;  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II y  $\gamma$ ) que responden a  $\text{Ca}^{2+}$  y diacilglicerol (DAG), PKC noveles (PKCn;  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) que responden a DAG pero no a  $\text{Ca}^{2+}$  y PKC atípicas (PKCa;  $\delta$ ,  $\eta$ /t) que no responden ni a  $\text{Ca}^{2+}$  ni a DAG. Todas las isoformas, sin excepción, requieren fosfatidilserina para su activación (87;88).

En general, para las PKCc y PKCn, el proceso de transducción de señales se inicia cuando un estímulo (por ej., vasopresina o factor de crecimiento hepatocitario) se une a su receptor. En el primer caso, el complejo hormona-receptor cataliza el intercambio de GTP por GDP sobre la proteína G asociada, activándola. Esta proteína activa a su vez a una

## Introducción

---

fosfolipasa C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ) en la membrana plasmática. Los receptores tirosin quinasa, en cambio, desencadenan la activación de la PLC  $\gamma$ . Las PLCs producen dos mensajeros secundarios por hidrólisis del fosfatidil-inositol (4,5) bifosfato (PtdIns(4,5)2P). Los productos de esta hidrólisis son DAG e inositol trifosfato (IP3) (89). El DAG activa directamente a PKC, uniéndose a estructuras conocidas como “dedos de zinc”. El IP3, en cambio, difunde desde la membrana plasmática al retículo endoplasmático, en donde se une a receptores específicos y causa la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , liberándolo al citosol. El aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  junto con DAG y la interacción de la PKC con fosfolípidos ácidos hacen que la quinasa se encuentre en un estado catalíticamente competente (90). Finalmente, la fosforilación de PKC sobre sus proteínas blanco induce un cambio conformacional en las mismas, resultando en una modificación de sus propiedades funcionales. Las diversas isoformas de PKC participan en la regulación de proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular (87).

Las PKC $\alpha$  son selectivamente inhibidas por Gö 6976, un derivado indolocarbazol no-glicosídico metil y cianoalquil sustituido que compite con el sitio de unión a ATP de estas enzimas (91).

Las PI3K son una familia de enzimas que fosforilan la posición 3'-OH del anillo inositol de los fosfoinositósidos, generando así fosfatidil-inositoles (PtdIns). Estos mensajeros secundarios de naturaleza lipídica disparan una gran cantidad de respuestas intracelulares, dado que interactúan con cientos de proteínas diferentes, a través de sus dominios de unión especializados (92). Las PI3K son activadas por diversos estímulos, tales como factores de crecimiento, mediadores inflamatorios, hormonas,



## Introducción

---

neurotransmisores, inmunoglobulinas y antígenos. Se dividen en tres clases, sobre la base de sus características estructurales y la especificidad de sustrato lipídico *in vitro* (93).

Las PI3K clase I son heterodímeros que constan de una subunidad catalítica de un peso molecular de 110 kDa y una subunidad reguladora. Las PI3K I catalizan la conversión de fosfatidil-inositol (4,5) bifosfato (PtdIns (4,5) 2P) a fosfatidil-inositol (3, 4, 5) trifosfato (PtdIns(3, 4, 5)3P). Éstos últimos, reclutan proteínas con dominios HP (homología a la pleckstrina) como la proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos 1 (PDK1) y la proteína quinasa B (PKB/Akt) (92;93), amplificándose de este modo las cascadas de señalización

Las PI3K clase II son capaces de fosforilar PtdIns y PtdIns 4P *in vitro*, pero sus sustratos *in vivo* están bajo investigación. Esta familia de enzimas, con un peso molecular de 170-200 kDa, poseen tres miembros: PI3K C2  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , todas caracterizadas por su dominio de homología C2 carboxilo terminal. Son activadas por quimoquinas, citoquinas, insulina, factores de crecimiento, etcétera; sin embargo su modo de acción es escasamente entendido (94).

Las PI3K clase III, son únicamente capaces de fosforilar PtdIns y generar PtdIns 3P. La subunidad catalítica Vps34 posee un rol esencial en el tráfico desde el Golgi hasta distintas organelas de las proteínas sintetizadas de *novo*. Vps34 se asocia a p150, una serin treonin quinasa requerida para la activación y reclutamiento de Vps34 a las membranas del Golgi (95) y a los endosomas Rab5-positivos (96). En base a esta evidencia, p150 parece ser también importante en la endocitosis y tráfico vesicular (96).

## Introducción

---

En este trabajo de tesis, utilizamos el inhibidor pan-específico de las PI3K clase I y II, Wortmanina (Wm). La Wm, de origen fúngico, inhibe a las PI3K de manera irreversible y no competitiva respecto del ATP, uniéndose covalentemente a un residuo lisina en la posición 802 conservado, presente en la subunidad catalítica p110; esto causa un gran reacomodamiento del sitio activo de la enzima (97).

### ***1.2.2.1.1. Rol de las vías de señalización intracelular dependientes de PKC y PI3K en colestasis.***

Los cambios en la localización de los transportadores que ocurren en la colestasis dependen de la activación por el agente colestásico de vías de señalización críticas en la regulación de la endocitosis/exocitosis. Los ejemplos representativos corresponden a las isoformas de protein quinasas  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes (PKCc), mayormente PKC $\alpha$ , (88;98). Coincidentemente la activación pan-específica de PKC, clásicas y noveles, por forbol 12-myristato-13-acetato también induce redistribución de Abcc2 desde la membrana canalicular a la basolateral en células HepG2 (99). En línea con estos hallazgos, Crocenzi y *col* hallaron un rol crítico de PKCc en la internalización de Abcb11 y Abcc2, con la consecuente falla secretora de sales biliares y aniones orgánicos, en la colestasis inducida por E17G (84).

La activación de PI3K ha sido involucrada también como una pieza clave en la colestasis por taurolitocolato (TLC). En coincidencia con estos hallazgos, Boaglio y *col* (83;83) recientemente mostraron que la vía de PI3K y su efector Akt están involucrados en la internalización de Abcb11 y Abcc2 inducida por E17G. En este caso, PI3K/Akt actúa complementariamente con PKCc. Mientras PKCc sería responsable de la internalización endocítica, PI3K/Akt retrasaría la reinserción espontánea de las vesículas conteniendo transportadores en la fase de recuperación de la colestasis.

## Introducción

---

El bloqueo tanto de la vía PI3K-Akt como de la activación de PKC $\alpha$  mediante la utilización de inhibidores previene parcialmente la colestasis mientras que inhibiendo conjuntamente ambas vías las acciones del E17G se previenen completamente indicando un efecto independiente y complementario de las vías activadas por este metabolito estrogénico.

### **1.2.2.2. Generalidades de las vías GPR30/AC/PKA.**

Una de las vías de transducción de señales mejor caracterizada es la vía de señalización del AMPc, donde el ligando se une a un receptor acoplado a proteína G (GPCR), que asociada a una adenilato ciclasa (AC) provoca un aumento en los niveles de este segundo mensajero, llevando a la activación de una molécula efectora tal como PKA (100;101;102). El control temporal de la vía de señalización de AMPc no es sólo debido a la generación de señales por la AC, sino también depende de la acción de fosfodiesterasas de AMPc (PDEs), además en diferentes tipos celulares puede haber diferentes cantidades de moderadores de AMPc (103;104).

Una de las primeras evidencias de la existencia de GPR30 procede de la observación de que el 17- $\beta$ -estradiol puede estimular la actividad de la adenilato ciclasa y por lo tanto la producción de AMPc en las células MCF7 humanas de cáncer de mama (105). GPR30 es un receptor acoplado a proteína G, con siete dominios transmembrana, el receptor GPR30 humano está constituido por 375 aminoácidos con una masa molecular teórica de aproximadamente 41 kDa. Se propone que el N-terminal se encuentra fuera de la célula, y que los residuos de ácido aspártico en la región terminal pueden ser modificados por glicosilación si GPR30 se localiza en la membrana plasmática. Uno de los temas que

## Introducción

---

está en discusión es si GPR30 se localiza en la membrana plasmática, en el retículo endoplasmático o si se expresa en ambos lugares (106).

Se ha observado que el receptor GPR30 forma parte de una vía de señalización alternativa a aquellas activadas por estradiol no conjugado ( $E_2$ ). En los estudios de las vías de señalización de GPR30, muchos de los datos han sido obtenidos utilizando como modelo las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBR. El  $E_2$  se une a GPR30, la subunidad  $\alpha$  de la proteína G trimérica activada induce la activación de la adenilato ciclasa, que resulta en la producción de AMPc y la subsiguiente activación de la proteína kinasa A (PKA) (107;106;108). En hígado, se ha observado que  $E_2$  atenúa la injuria hepática asociada al trauma hemorrágico, inhibiendo los estadios tempranos de la apoptosis mediante activación de GPR30, seguido de PKA (107). En este trabajo de Tesis se ha utilizado como antagonista de GPR30 al compuesto G15, que se ha descrito que es un antagonista selectivo del mismo (109).

La holoenzima PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas (C) mantenidas en un estado inactivo por la asociación con un dímero de subunidades reguladoras (R) (110;111;112). Dos clases de holoenzimas PKA se han identificado, las tipos I y II, que difieren en sus subunidades regulatorias. Ambas subunidades R (RI y RII) (113;114) y la subunidad C puede existir como múltiples isoformas. Aunque existen grandes diferencias en la distribución tisular y en las propiedades bioquímicas y físicas de las isoformas de la subunidad regulatoria, la holoenzima contiene dos subunidades catalíticas unidas con homo o heterodímeros de las subunidades RI o RII (115;116). El AMPc se une cooperativamente a dos sitios denominados A y B en cada subunidad R. En la holoenzima inactiva, sólo el sitio B está

## Introducción

---

expuesto y disponible para la unión de AMPc. En caso de ocuparse el sitio B por un aumento de AMPc, esta unión aumenta la afinidad del AMPc en el sitio A por un cambio estérico intramolecular. La unión de cuatro moléculas de AMPc, dos a cada subunidad R, conduce a un cambio conformacional y a la disociación en un dímero de subunidad R con cuatro moléculas de AMPc unidos y dos monómeros catalíticos (117). Las subunidades C se convierten en catalíticamente activas y fosforilan sustratos dianas en residuos de serina o treonina que se presentan en un contexto de secuencia de R-R-X-S/T, R-K-X-S/T, K-R-S-X / T, o K-K-X-S /T (118).

En este trabajo de Tesis se han utilizado los inhibidores selectivos 2'-3'-didesoxiadenosina y H89 para las vías de señalización de AC y PKA, respectivamente y se ha usado un anticuerpo que detecta péptidos y proteínas que contienen un residuo phospho-S/T con una Arginina en la posición 3.

### ***1.2.2.2.1. Generalidades de las vías GPR30/AC/PKA en colestasis.***

Nuestro grupo de trabajo ha descrito dos roles distintos y opuestos para AMPc en colestasis: el aumento de AMPc que ocurre luego de la estimulación por glucagón o salbutamol, que participa de los procesos de reinserción de transportadores protegiendo de la colestasis por E17G, y el AMPc sintetizado a partir de la acción de E17G sobre GPR30, el cual es esencial para que se produzca la desinserción de los transportadores, que es el origen de la colestasis (119).

*In vitro*, Zucchetti y col (119) observaron que la inhibición farmacológica de GPR30 por el antagonista G15 producía un alto grado de protección, indicando que este receptor participa en la alteración funcional que E17G induce sobre los transportadores

## Introducción

---

canaliculares Abcc2 y Abcb11. Sin embargo, la activación específica de GPR30 con el agonista G1 no mostró efectos colestásicos a pesar de lograr aumentar AMPc y activar PKA, indicando que la activación de esta vía es necesaria pero no suficiente para producir estas alteraciones. La participación de AMPc fue evaluada mediante la determinación de sus niveles en DAHR, en donde se observaron aumentos moderados en presencia de E17G, los cuales fueron revertidos al inhibir GPR30, hecho que confirma que para producir estos aumentos se requiere la activación de este receptor.

### 1.2.2.3. Otras vías de señalización

La activación de quinasas dependientes de calcio-calmodulina (CaM-K) por medios convencionales requiere la unión del complejo calcio-calmodulina a la enzima para iniciar el proceso. Como se mencionó anteriormente, en las células en reposo, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y nuclear son bajos (aproximadamente 100 nM), mientras que luego de un estímulo adecuado los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma y en el núcleo pueden cambiar drásticamente debido a la apertura de los canales de calcio en la membrana extracelular y o por los canales de inositol trifosfato que se encuentran en el retículo endoplásmico. Este incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  es acompañado de un aumento de los niveles del complejo calcio-calmodulina llevando a la activación de las enzimas activadas por calcio-calmodulina como lo son la Cam-Ks (120).

Nuestro grupo tiene evidencia que en la colestasis por E17G está implicada la vía Calcio-calmodulina/Cam-KII. El E17G aumenta los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y activa Cam-KII; a su vez hemos evidenciado que los bloqueadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (nifedipina y verapamilo), los inhibidores de calmodulina (trifluoroperazina y W7) y de Cam-KII

(KN62) protegen de la alteración en los transportadores canaliculares inducida por el estrógeno (121).

### **1.3. Generalidades del Receptor de Estrógeno (RE).**

Cincuenta años atrás Jensen y Jacobsen (122) llegaron a la conclusión, basada en la unión específica del estradiol en el útero, que los efectos biológicos del estrógeno tenían que ser mediados por la unión a un receptor. Durante más de veinticuatro años, este receptor fue estudiado extensamente en varios laboratorios (123), hasta que en 1986, dos grupos de investigación informaron la clonación de este receptor de estrógeno (RE) (124). Hasta el año 1995, se postulaba que existía un único receptor de estrógeno y que éste era el responsable de mediar todos los efectos fisiológicos y farmacológicos de los estrógenos naturales, sintéticos y antiestrógenos conocidos en ese entonces. Sin embargo, en ese año, un segundo receptor de estrógeno (RE $\beta$ ), fue clonado a partir de una biblioteca de cDNA de muestras de próstata de rata (125). Interesantemente, las evidencias evolutivas del receptor de estrógeno y de las acciones estrogénicas sugieren que al principio los estrógenos influían en la reproducción independientemente del RE y que el receptor de estrógeno no respondía a los estrógenos y actuaba como un activador transcripcional constitutivo.

Se han caracterizado, por lo tanto, dos isoformas de Receptor de Estrógeno, RE $\alpha$  y RE $\beta$ . Ambos receptores poseen varios dominios funcionales, los dominios N-terminal tanto de RE $\alpha$  como de RE $\beta$  son altamente divergentes, mientras que los dominios de unión a ADN (DBD) y los dominios de unión a ligandos (LBD) son aproximadamente entre un 95% y un 55 % homólogos, respectivamente. Es importante resaltar que en el hígado solo se expresa RE $\alpha$  (126).

## Introducción

---

Además de los estrógenos, el RE también muestra afinidad por algunos contaminantes ambientales, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los ftalatos y pesticidas, que caben bajo la denominación común de xenoestrógenos (127) . Ciertos componentes de origen vegetal denominados fitoestrógenos (128) también tienen acciones estrogénicas biológicamente relevantes tanto en los seres humanos como en animales de consumo humano.

Además de los efectos transcripcionales bien caracterizados para el estradiol, hay efectos de acción rápida, es decir, que ocurren dentro de segundos o minutos después del estímulo por estradiol. Estos efectos rápidos involucran la activación de quinasas y fosfatasas y el aumento de flujos iónicos a través de membranas (129;130). Herramientas tales como ligandos selectivos (131) o la utilización de líneas celulares diseñadas para expresar selectivamente el RE en el núcleo, en el citoplasma o en la membrana pueden resultar útiles en el estudio de estas acciones no nucleares del RE (132).

Recientemente, en distintos modelos celulares se han observado efectos rápidos (segundos, minutos) luego de la estimulación con estradiol (Tabla 1.1), en contraste con sus efectos genómicos conocidos, que son mediados por la clásica vía del receptor nuclear RE; por ende las acciones estrogénicas pueden ser divididas en citosólicas/no genómicas o en genómicas (133;134).



## Introducción

<b>Vías de señalización activadas por estrógenos (no genómicas).</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Vías</b>	<b>Referencia</b>
<b>endotelio vascular</b>	PI3K/AKT	J Biol. Chem. (2003) 278:2118-2123
	MAPK	Circulation (2003) 108:3115-3121
	proteínas G	J Biol Chem (2003) 276:27071-27076
	Flujo de Ca <sup>2+</sup>	Am J. Physiol Heart Circ. Physiol. (2000).279: H319-H328
	activación de canal de K <sup>+</sup>	Circulation. (2000). 101: 1594-1597
<b>mama</b>	MAPK	Science (2005) 307: 1625-1630
	IGF-IR/PI-K/Akt	Endocrinology (2005) 146: 624-632
	PKC	Endocrinology (2002) 144: 1812-1824
	ERK	Mol Biol Cell (2002) 13: 3720-3729
<b>neuronas pituitarias</b>	Flujo de Calcio	J. Neurosci. (1999) 19: 2455-2463
	cAMP/PKA	Endocrinology (2003) 144: 306-312
	MAPK	J. Neurosci. (1998) 18: 6672-6680
<b>huesos</b>	Activación de PKC $\alpha$	J- Cell Biochem (2001) 81: 413-429
	activación de fosfolipasa C	Bone. (2004) 34: 100-111

**Tabla 1.1 Vías de señalización activadas por estradiol no conjugado en diferentes tipos de células y tejido.**

Las evidencias crecientes indican la presencia del RE en la membrana plasmática de células humanas donde se ha observado la activación de cascadas de señalización (MAPK/ERK, PI3K/Akt, PKC) y efectos celulares rápidos de E<sub>2</sub> (135). De qué manera el RE se localiza en la membrana celular aún no está claro; se ha propuesto que en las vías de señalización citosólicas está implicada la activación de un pool de RE $\alpha$  asociado a membrana mediante una palmitoilación que sufre post-traduccionalmente (135). La palmitoilación en la Cys-447 ha sido reportada como una manera de facilitar la asociación de RE $\alpha$  en membrana y asociarse con la proteína de anclaje caveolina-1.

Las activaciones de PKC $\epsilon$  y de la vía PI3K-Akt que han sido reportadas para E<sub>2</sub> en distintos tejidos incluyendo el hígado (75;136;137) también han sido informadas para

## Introducción

---

E17G como se indicó en párrafos anteriores(83;84). Por lo tanto, otras proteínas que participan en vías no genómicas inducidas por E<sub>2</sub> podrían participar en acciones colestásicas del E17G.

La participación del RE en vías no genómicas se manifiesta por la activación de sistemas de señalización celular. Se ha observado que una vez activado sufre una serie de fosforilaciones (138), siendo la fosforilación en la serina en la posición 118 la más relevante.

Entre las quinasas que pueden fosforilar al RE $\alpha$  (139), si bien muchas tienen que ver con acciones nucleares (quinasas dependientes de ciclinas, quinasas dependientes de ADN, etc), se destacan la GSK-3 $\beta$  (140) y la quinasa activada por mitógenos P38<sup>MAPK</sup> (141). GSK-3 $\beta$ , en particular, forma un complejo con ER $\alpha$  que lo estabiliza en citosol y puede modular su fosforilación y, por ende, su actividad (140).

Es sabido que RE $\alpha$  interactúa con PKC $\epsilon$  o PI3K-Akt (136;75) y debido a que la cavidad del ligando en el RE $\alpha$  tiene un tamaño mayor que el estradiol no conjugado (142) y a que el E17G tiene afinidad por RE (143;144) planteamos como hipótesis en este trabajo de Tesis que potencialmente el E17G podría interactuar con éste, y como consecuencia de esta interacción, que el RE $\alpha$  participaría en las vías de señalización activadas por E17G. Además, es de interés investigar qué otras posibles proteínas con participación en la transducción de señal podría iniciar la cascada que induce el E17G a activar cPKC y PI3K llevando a la colestasis.

Las estrategias utilizadas para evaluar la participación de una vía de señalización en particular fueron la utilización de inhibidores selectivos, en este caso el ICI182,780. El

## Introducción

---

compuesto ICI182,780 cuya nomenclatura es 7-alfa-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentilsulfinil)nonil]estra-1,3,5-(10)-trieno-3,17 beta-diol, ha sido desarrollado a partir de un programa para producir una serie de compuestos derivados de esteroides que contienen una cadena lateral larga sustituido en la posición 7-alfa. Esta cadena lateral es responsable de las propiedades antagonistas estrogénicas, teniendo la capacidad de bloquear la acción trófica del estradiol en el útero de rata completamente, y estar libre de la actividad agonista del estrógeno. Tales compuestos, como el ICI182,780, se han denominado en la literatura como anti-estrógenos "puros" (145). Estos estudios con ICI182,780 se complementaron con estudios de knock-down del RE $\alpha$  y con la medición de su activación, estimada por la fosforilación en Ser-118.

## **2-OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivo General.

El presente trabajo de Tesis doctoral tiene como objetivo general evaluar el rol del RE $\alpha$  en la colestasis inducida por estradiol-17-D- $\beta$ -glucurónido.

## 2.2 Objetivos específicos:

- Evaluar la participación del RE $\alpha$  en el modelo de *in vitro* de colestasis por estradiol-17-D- $\beta$ -glucurónido.
- Evaluar la participación del RE $\alpha$  en la colestasis por estradiol-17-D- $\beta$ -glucurónido en el Modelo de Hígado Aislado y Perfundido de ratas.
- Dilucidar la relación del RE $\alpha$  con otras vías de señalización que participan en la colestasis por estradiol-17-D- $\beta$ -glucurónido.

## **3-METODOLOGÍA**

### 3.1 Reactivos.

El compuesto Colil-glicil-amido-fluoresceína (CGamF) fue donado por el Prof. Alan Hofmann (Universidad de California, San Diego, EE.UU.). Los reactivos estradiol-17 $\beta$ -D-glucurónido (E17G), ICI 182,780 (Fulvestrant), colagenasa tipo A (de *Clostridium histolyticum*), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), albumina sérica bovina (BSA), azul tripán, medio de cultivo Leibovitz-15 (L-15), dimetilsulfóxido (DMSO), detergente Tritón X-100, dodecil sulfato de sodio, tetrametil-etilen-diamina, ditioneitol, persulfato de amonio, Percoll, dexametasona, gentamicina, solución de antibiótico 100X (penicilina, estreptomicina, anfotericina), uretano,  $\beta$ -NAD, 3- $\alpha$  hidroxisteroide deshidrogenasa y el cóctel de inhibidores generales de proteasas fueron adquiridos de la empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). El compuesto 5-cloro-metil-fluoresceína diacetato (CMFDA) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.). Los medios de cultivo “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM) y Williams E fueron obtenidas de Life Technologies (Grand Island, NY, EE.UU.). El inhibidor de PKC $\epsilon$  5,6,7,13-tetrahydro-13-metil-5-oxo-12H-indolo[2,3-a]pirrolo[3,4-c]carbazol-12-propanenitrilo (Gö6976) fue obtenido de Calbiochem (San Diego, CA, EE.UU.). El compuesto Wortmanina (WM) fue adquirido de la empresa Fluka (St. Louis, MO, EE.UU.). Los compuestos G-15 y didesoxiadenosina (DDA) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Todos los demás reactivos químicos utilizados en esta Tesis fueron de la más alta calidad disponible comercialmente.

### **3.2 Animales.**

A lo largo de todos los estudios, se utilizaron ratas hembra adultas Wistar con un peso entre 250-300 g que fueron criadas en nuestro bioterio (Instituto de Fisiología Experimental, IFISE-CONICET) (81). Los tratamientos se llevaron a cabo bajo anestesia con uretano (1 g/kg por vía intraperitoneal), y se mantuvieron así en todo el experimento. Cuando fue necesario, la temperatura corporal fue medida y se mantuvo a 37°C. Todos los animales recibieron cuidado según los criterios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio "Octava Edición" (Academia Nacional de Ciencias de EE.UU., 2011). Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la guía local para el Uso de Animales de Laboratorio (Resolución N° 6109/012), establecido por el Comité de Ética para el Manejo de Animales (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR) y fueron aprobados por la Res. 342/2012.

### **3.3 Modelos experimentales *in vitro*.**

Los modelos *in vitro* constituyen una herramienta de la biología celular importante para el estudio de enfermedades hepáticas y han sido ampliamente utilizados en investigaciones básicas de la fisiología, fisiopatología, farmacología y otras disciplinas afines (146). En este trabajo de Tesis se han utilizado modelos *in vitro* para el estudio de vías de señalización implicadas en la función y localización de transportadores canaliculares implicados en la secreción biliar.

El cultivo primario de hepatocitos de rata, es un modelo *in vitro* útil para el estudio del metabolismo hepático, en general, y de la expresión de proteínas, en particular, pero tiene la desventaja que la polaridad del hepatocito no se conserva, es decir, que las



## Metodología

---

membranas plasmáticas no logran adoptar la diferenciación de basolateral y canalicular tal como ocurre en el hígado entero. Los cultivos primarios de hepatocitos de rata sobre una capa de colágeno son considerados un buen modelo, aunque de duración limitada debido a que luego de un plazo de tiempo mayor a 48 hs pierden la mayoría de las funciones metabólicas específicas, incluyendo la expresión de muchas proteínas transportadores de membrana (146).

Dentro del cultivo primario de hepatocitos de rata se han desarrollado variantes que han acarreado avances importantes para este tipo de modelos, como es el caso del modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR), un modelo útil para el estudio de cambios agudos de la función secretora biliar con polaridad morfológica y funcional conservada (147). Este modelo presenta una localización polarizada de estructuras basolaterales y apicales, incluyendo transportadores, citoesqueleto de actina y tubulina, etc. y es capaz de transportar y secretar al polo apical compuestos colefilicos, permitiendo una fácil y rápida visualización/cuantificación por microscopía de fluorescencia. Su limitación radica en que se pueden utilizar por tiempos cortos (4-6 hs) y que la cantidad de células que se obtiene es suficiente para estudios funcionales pero no es suficiente para estudios que requieren mayores cantidades de proteínas como por ejemplo la evaluación de la expresión proteica mediante western blot.

Otro tipo de cultivo de hepatocitos es el cultivo en configuración sándwich de colágeno (HRCS). Éste, es un cultivo primario de hepatocitos de rata entre dos capas de colágeno gelificado, que permite que los hepatocitos desarrollen polaridad funcional, formando una red de pseudocanalículos biliares con el lumen sellado (148) y representa una aproximación exitosa para el mantenimiento de funciones hepáticas específicas,

incluyendo la secreción de la albúmina, inducción de la enzima citocromo P-450, y la absorción de ácidos biliares (149). Este modelo permite la diferenciación entre los procesos de transporte sinusoidal y canalicular y por lo tanto puede representar una herramienta útil para investigar la disposición hepatobiliar de sustratos (150). Por su larga vida útil, además son adecuados para hacer estudios de *knock-down* (silenciamiento) de proteínas.

### ***3.3.1 Obtención de Colágeno tipo I a partir de cola de rata.***

A partir de cinco colas de ratas hembras de aproximadamente 50 días, se extrajeron los tendones, limpiando el tejido muscular con ayuda de bisturí. Se lavaron con agitación vigorosa en 250 ml de solución lavadora (NaCl 4,5 M; Tris 0,05 mM pH 7,5; EDTA 20 mM). Luego de lavar tres veces con agua destilada los tendones fueron disueltos durante 12-24 hs a 4°C en 250 mL de solución de ácido acético (0,5 M, pH 2,5) con agitación moderada. La solución resultante se filtro a través de una gasa y se centrifugó 90 min a 37000 x g en tubos de 50 ml en una centrifuga Beckman Coulter Avant-J25 (Beckman Ltd, High Wycombe, Inglaterra), recuperándose el sobrenadante. Posteriormente se agregó lentamente NaCl sólido, con agitación continua y moderada, hasta alcanzar una concentración de 0,7 M, dejando en reposo a 4°C durante 12-24 hs. Luego de este período se centrifugó la solución 45 min a 37000 x g. El pellet se disolvió durante 12-24 hs a 4°C en 60 ml de ácido acético (0,5 M, pH 2,5) con agitación moderada. En un paso posterior se centrifugó 90 min a 37000 x g y el sobrenadante resultante se dializó (membrana de Diálisis de tamaño de poro de 12kDa) contra ácido acético 0,5 M (pH 2,5) durante 12-24 hs a 4 °C (151). Finalmente la solución de colágeno obtenida se liofilizó utilizando un liofilizador de mesa Labconco, (Kansas City, EE.UU.)

## Metodología

---

El colágeno obtenido se disolvió en ácido acético 5 mM con agitación moderada toda la noche a 4°C y se llevó a pH 7,4 con buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM; NaCl 100 mM) quedando una concentración de 2,4 mg/ml. para preparar las placas con las que se realizaron los cultivos primarios de hepatocitos (cultivos de hepatocitos y DAHR) cada vez que fue necesario. La preparación de las placas consistió en cubrir uniformemente los pocillos con la solución de colágeno utilizando una espátula estéril, incubarlas a 37 °C durante 2 hs y luego exponerlas 1 h a luz UV para su esterilización.

### ***3.3.2 Obtención de hepatocitos aislados.***

Los hepatocitos fueron aislados a partir de hígados de rata mediante la técnica de perfusión con colagenasa (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EE.UU.), utilizando una modificación del método de Berry y Friend (152). Describiendo en forma breve, bajo anestesia con uretano se administró heparina en la vena cava inferior (1500 U/kg de peso corporal) y se introdujo un catéter 14G (Abbocath-T, Venisystem, Abbocath Ireland Ltd., Sligo, Irlanda) en la vena porta. El hígado fue perfundido por vía porta durante 10 min en un modelo no recirculante, con una solución Hanks' oxigenada (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) libre de Ca<sup>2+</sup>, pH = 7,47-7,50, suplementada con HEPES (3 g/l) y EGTA (0,24 g/l), cambiándose luego el medio de perfusión a un medio que contenía la misma solución sin EGTA, suplementada con MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y colagenasa tipo A (4300 U/l), durante 9 min a un flujo de 20 ml/min. Finalmente, se removió el hígado, y las células se aislaron por disociación mecánica mediante agitación suave con una varilla de vidrio durante 3-4 min. Los hepatocitos fueron posteriormente purificados de células no-parenquimatosas por centrifugación a baja velocidad (30 x g, 2 min), seguida de 3 lavados consecutivos con solución Hanks' oxigenada conteniendo CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y Tris 5 mM. La preparación

resultante consistió de  $\sim 400-600 \times 10^6$  hepatocitos por hígado de elevada viabilidad ( $> 90\%$ ), según arrojó el ensayo de exclusión de azul tripán (153).

Posteriormente, los hepatocitos fueron sembrados a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en placas de 3 cm cubiertas con colágeno y cultivados durante 24 hs con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % en condiciones controladas de temperatura y humedad ( $37^\circ\text{C}$ ,  $95\% \text{O}_2-5\% \text{CO}_2$ ) en un incubador Forma Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EE.UU).

### ***3.3.3 Obtención de las duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR).***

Numerosos estudios de tráfico y reciclado de transportadores canaliculares se llevaron a cabo utilizando el modelo de DAHR. En este modelo, las duplas son aisladas por perfusión hepática con colagenasa y enriquecidas por un proceso de elutriación (154). Luego de su aislamiento, las DAHR sufren una rápida endocitosis de los transportadores canaliculares hacia vesículas intracelulares; una vez puestas en cultivo, esto es seguido por un redireccionamiento progresivo de estas vesículas hacia el polo apical, con total restablecimiento de la polaridad celular y la función de transporte luego de un corto período de cultivo de entre cuatro y cinco hs, lo cual permite obtener un modelo *in vitro* polarizado apto para estudios de transporte canalicular (54;55;155).

Las DAHR se obtuvieron a partir de la perfusión *in situ* de hígados de rata, de acuerdo al método de doble perfusión con colagenasa, previamente descrito por Wilton y *col.* (154). Este método consiste en digerir, de manera incompleta, el hígado de rata, primero perfundiéndolo durante 15 min con una solución amortiguadora libre de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , para debilitar las uniones celulares, y luego limitando perfundiendo *in situ* con

## Metodología

---

colagenasa sólo 5 min y con una concentración de la misma de 1300 U/l (un 30 % de la usada para obtener hepatocitos, permitiendo esta perfusión la liberación de las células de la matriz extracelular). Estas dos soluciones se perfunden a 20 ml/min. La cantidad de células obtenidas se incrementa al incubar el resto del tejido hepático durante dos disgregaciones mecánicas de 7 min con 30 ml de la solución de colagenasa descrita anteriormente, en un baño de agua a 37 °C. Luego de filtrar la suspensión celular obtenida a través de una malla de nylon, se dejaron decantar las células durante 15 min a 0 °C. Luego se retiró el sobrenadante, se resuspendieron las células con medio L-15 fresco y se dejaron decantar nuevamente por 15 min a 0 °C. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en un volumen mínimo de L-15 fresco.

La suspensión celular obtenida contuvo ~25% de duplas de hepatocitos con una alta viabilidad (> 90%), determinada mediante exclusión del colorante azul tripán. Esta preparación inicial, conteniendo poblaciones variables de agregados hepatocitarios, fue luego enriquecida en duplas mediante elutriación, según la técnica descrita por Wilton y *col.* (154). Esta técnica se basa en la acción de dos fuerzas opuestas: la fuerza centrífuga que trata de llevar a las células a la parte externa de la cámara de elutriación y el arrastre que provoca un flujo continuo de medio impulsado por una bomba peristáltica que ingresa desde la parte externa de la cámara y sale por la parte interna de la misma y que por lo tanto trata de llevar a las células hacia el centro. La técnica permite separar células en función de su velocidad de sedimentación cambiando solamente la velocidad de flujo del medio, mientras que la velocidad del rotor se mantiene constante (156). A bajo flujo se recuperan células muertas y luego células con menor velocidad de sedimentación y a altos valores de flujo aquellas con alta velocidad de sedimentación, particularmente grupos celulares. Las duplas de hepatocitos se recuperan en fracciones correspondientes a flujos

## Metodología

---

intermedios. La cámara debe mantenerse a temperatura ambiente (21 °C) durante todo el estudio y el medio se utiliza frío (<8°C). Esto ayuda a conservar la integridad de las células, manteniendo su fluidez de membrana. Las muestras obtenidas son preservadas en hielo.

Para la centrifugación elutriacional, se utilizó una cámara estándar de elutriación montada sobre un rotor JE-6B (Beckman Ltd, High Wycombe, Inglaterra) en una centrífuga Beckman-Coulter Avanti J2-S. Las células se separaron manteniendo la velocidad del rotor a 1100 rpm e incrementando secuencialmente el flujo del medio de elutriación (solución amortiguadora de fosfato con una concentración de albúmina de 1 g/l) en la cámara utilizando una bomba peristáltica.

La suspensión de células se cargó en la cámara de separación a una velocidad de 8 ml/min. Se recogen fracciones de aproximadamente 100 ml con la siguiente secuencia de flujos: 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 80 (ml/min). Las fracciones se enumeraron desde 1 hasta 8, Las fracciones 4, 5 y 6, son las fracciones enriquecidas en duplas. Las células elutriadas se sedimentaron por centrifugación a 80 g durante 5 min, resuspendiéndose finalmente en 4 ml de medio L-15. La preparación resultante tuvo ~75% de duplas con igual o mayor viabilidad que la preparación inicial.

Estas duplas de hepatocitos fueron cultivadas a 37° C ( $5 \times 10^4$  células/ml o  $2 \times 10^4$  células/ml, dependiendo del ensayo) 4,5 a 5 hs en las placas de 24 pocillos cubiertas con colágeno, conteniendo 0,8 ml de medio de cultivo DMEM por pocillo. Se demostró que este tiempo es necesario y suficiente para que las duplas restablezcan la polaridad de sus membranas celulares y adquieran una capacidad máxima de transportar y acumular en sus vacuolas canaliculares sustratos fluorescentes de Abcb11 (157).

### ***3.3.4 Preparación de cultivo primario de hepatocitos de rata en configuración “sándwich” (HRCS).***

Como se mencionó anteriormente, los cultivos primarios de HRCS mantienen durante varias semanas el metabolismo de drogas, la función biosintética y la morfología celular; estos hepatocitos cultivados en sándwich de colágeno forman una red canalicular intacta y restablecen la excreción polarizada de sales biliares y aniones orgánicos. Cada vez que fue necesario preparar este tipo de cultivo primario se ha procedido de la forma que se detalla en los ítems a continuación.

#### **3.3.4.1 Preparación del colágeno y de la primera capa de colágeno en las placas de cultivo.**

Se preparó una solución 10 mg/ml de colágeno (obtenido como se detalló en el ítem 3.3.1) utilizando ácido acético 20 mM como solvente dejándolo en agitación moderada a 4 °C por 12-24 hs. En un tubo tipo Eppendorf estéril se preparó una solución con las siguientes proporciones: 1 parte de medio DMEM 10X, 8 partes de colágeno 10 mg/ml y 1 parte de NaOH 0,1 M; rápidamente, para evitar la gelificación del colágeno, se recubrieron las placas de 6 pocillos con 100 µl de esta solución por pocillo utilizando una espátula estéril, se dejaron las placas 1 h a 37 °C en una cámara húmeda, luego se dejaron una 1 h bajo lámpara UV para esterilización y por último se les colocó medio de cultivo (DMEM) hasta la preparación de los hepatocitos. Esto último se realizó para mantener la hidratación del colágeno gelificado.

#### **3.3.4.2 Obtención y sembrado de hepatocitos. Día “0” de cultivo.**

Los hepatocitos se aislaron de los hígados de rata como fue descrito previamente en el punto 3.3.2. Para garantizar una viabilidad mayor a un 90 % (según el método de

azul tripán) se realizó una centrifugación con una solución de Percoll a 80 x g por 5 min. Una vez obtenidos los hepatocitos se sembraron 3 ml por pocillo a una concentración de  $3 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo Williams E suplementado con 5 % suero fetal bovino, solución de antibióticos (gentamicina, estreptomicina, penicilina y anfotericina D), dexametasona 0.8 mg/l e insulina 4 mg/l; y glucosa hasta alcanzar una concentración de 3 g/l y se incubaron a 37 °C por 2 hs en una atmósfera de 95 % O<sub>2</sub> 5 % CO<sub>2</sub> para lograr adherencia de los mismos. Luego se cambió el medio y se cultivaron por 24 hs a 37 °C en una atmósfera de 95 % O<sub>2</sub> 5 % CO<sub>2</sub> en un incubador Forma Scientific para luego agregar la segunda capa de colágeno.

### **3.3.4.3 Agregado de la segunda capa de colágeno. Día “1” de cultivo.**

Inicialmente se preparó la solución de colágeno como se describió en el inciso 3.3.4.1, y se colocó en hielo para que el colágeno no gelifique. Se aspiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con L15 y se agregó gota a gota el colágeno hasta completar el pocillo (150 µl aproximadamente) y se incubó 1 h en estufa a 37 °C para que la solución de colágeno gelifique.

Luego se agregó 2 ml por pocillo de Williams E suplementado con lo descrito anteriormente sin el agregado de glucosa y se incubó nuevamente a 37 °C en una atmósfera de 95 % O<sub>2</sub>/ 5 % CO<sub>2</sub> en incubador Forma Scientific, renovándose el medio todos los días hasta el quinto día de cultivo, momento en el que la polarización de las células es finalizada.



### **3.4 Obtención de fracciones celulares.**

#### ***3.4.1 Preparación de homogenados celulares.***

Después de los tratamientos los hepatocitos fueron lavados con solución de sacarosa 0,3M fría y luego resuspendidas en la misma con el agregado de inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidores de Sigma, NaF 1 mM, y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM). Estas suspensiones fueron sonicadas y se les realizó una centrifugación a 500 x g en una centrífuga preparativa Sigma 3K30 (Shrewsbury, Inglaterra) por 10 min para la eliminación de los fragmentos celulares y de la fracción nuclear y así obtener un homogenado celular.

#### ***3.4.2 Preparación de fracciones subcelulares (citosol y membrana total).***

Cuando fue requerido, las fracciones citosólicas (sobrenadante) y de membrana total (pellet) fueron obtenidas por medio de una ultracentrifugación a 100.000 x g (Ultracentrífuga Sorvall Combi Plus, Newtown, Connecticut, EE.UU.) por 1 h de un homogenado celular como el obtenido en el punto anterior (158).

### **3.5 Técnicas aplicadas en el modelo de cultivo primario de hepatocitos.**

La evaluación de la activación del RE $\alpha$  y PKC $\alpha$ , así como la evaluación de los niveles de sustratos fosforilados de PKA requiere utilizar técnicas de western blot. El modelo más adecuado para esta técnica es el de cultivo primario de hepatocitos aislados y cultivados 24 hs sobre una capa de colágeno, ya que tiene un altísimo rendimiento en términos de número de células y el período de cultivo permite que los hepatocitos se recuperen del estrés post-aislamiento.

### ***3.5.1 Medición de la activación del RE $\alpha$ .***

La activación del RE $\alpha$  fue confirmada evaluando la fosforilación en el aminoácido Ser-118 (138), realizando WB de la forma fosforilada y la forma no fosforilada de la proteína en preparados de membrana totales provenientes de 3.4.2 de cultivos primarios de hepatocitos. Para ello, alícuotas que contenían la misma cantidad de proteínas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (con dodecil sulfato de sodio) y sometido a electroforesis (159). En los WB de las fracciones de membranas se sembró una cantidad de proteína que diera una señal densitométrica en el rango lineal para los anticuerpos utilizados. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P (Sigma Chemical Co., St Louis, EE.UU.) e incubadas con un anticuerpo anti-pSer118 RE $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology inc, Santa Cruz, EE.UU.) (dilución 1/1000) toda la noche, después se utilizó un anticuerpo secundario de mono anti-IgG de cabra (dilución 1/3000); finalmente las membranas fueron expuestas a un reactivo quimio-luminiscente (Pierce ECL), y reveladas con Hyperfilm ECL. Luego, los anticuerpos contra la forma fosforilada fueron removidos con NaOH 0,2 N (stripping) y las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-RE $\alpha$  total (Santa Cruz Biotechnology inc, Santa Cruz, EE.UU.) (dilución 1/1000) toda la noche y luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente. Las bandas de pSer-118 RE $\alpha$  y RE $\alpha$  total fueron cuantificadas por densitometría utilizando el programa ImageJ 1.44p (NIH, EE.UU.). Todas las densitometrías de las bandas de RE $\alpha$  fosforilado fueron relativizadas con respecto a las densitometrías de las bandas de RE $\alpha$  total y a su vez esta relación fue relativizada tomando como 100% el valor obtenido para el grupo control.

### ***3.5.2 Medición de la activación de PKC $\alpha$ por translocación a membrana.***

Las proteínas obtenidas de las fracciones citosólica y enriquecida en membrana total del mismo experimento se sembraron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (con dodecil sulfato de sodio) y sometidas a electroforesis (159). Después de que las proteínas fueran separadas se transfirieron a una membrana Immobilon-P y fueron incubadas toda la noche con un anticuerpo primario, anti-PKC $\alpha$  (human PKC $\alpha$ , BD Biosciences Pharmingen, San José, CA, EE.UU.) (dilución 1/1000), una de las PKC $\alpha$  presente en el hígado, seguido por incubación con un anticuerpo secundario de mono anti-IgG de ratón (dilución 1/3000); finalmente las membranas fueron expuestas a un reactivo quimio-luminiscente, y reveladas con Hyperfilm ECL. Las densitometrías correspondiente se realizaron con ImageJ 1.44p. Para estimar la cantidad de PKC $\alpha$  asociada tanto con las fracciones citosólicas como con las fracciones de membranas (llamaremos A), la intensidad relativa de cada banda fue dividida por la cantidad de microgramos de proteínas cargado en cada calle y entonces multiplicado por la cantidad total de proteína obtenida en cada fracción. La proporción de la isoforma PKC $\alpha$  unida a membrana fue expresada acorde a la siguiente fórmula:  $A_{\text{membrana}} / (A_{\text{membrana}} + A_{\text{citosol}})$ .

### ***3.5.3 Medición de la activación de PKA.***

Las alícuotas de homogenado celular conteniendo una cantidad proteica total equivalente fueron sometidas a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas Immobilon-P e incubadas toda la noche con un anticuerpo de conejo anti-fosfo (Ser/Thr) sustrato de PKA (Cell Signaling Technology, Danvers MA, EE.UU.) (dilución 1/1000). Después de 1 h de incubación con

un anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo (dilución 1/5000), las membranas fueron reveladas usando protocolos estándares de quimioluminiscencia. Las bandas resultantes se cuantificaron por densitometría con el software ImageJ 1.44p. Con el fin de controlar la cantidad de proteínas sembradas en el gel, los anticuerpos adheridos a las membranas fueron luego removidos (stripping) y las mismas fueron re-incubadas con un anticuerpo de ratón anti-actina (Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU.) (dilución 1/5000).

### **3.6 Técnicas aplicadas en el modelo de DAHR.**

El modelo de DAHR fue utilizado para evaluar la funcionalidad y la localización de los transportadores canaliculares Abcc2 y Abcb11.

#### ***3.6.1 Evaluación de la función secretora de Abcb11 y Abcc2 en DAHR.***

La funcionalidad de los transportadores Abcb11 y Abcc2 en las DAHR fueron evaluados analizando la capacidad de acumulación vacuolar canalicular (AVc) de los sustratos fluorescentes CGamF y glutatión metil-fluoresceína (GS-MF), respectivamente (55;154;). El compuesto CGamF es un análogo de sal biliar selectivamente transportado por el transportador Abcb11 (160), mientras que el CMFDA es un compuesto lipofílico transportado por difusión pasiva a través de la membrana basolateral y convertido intracelularmente en GS-MF por una acción secuencial de esterase y glutatión-S-transferasas. El compuesto GS-MF es un sustrato específico del transportador Abcc2. Para evaluar la AVc de estos sustratos fluorescentes, las células fueron lavadas dos veces con medio L-15 y expuestas a 0,3  $\mu$ M CGamF (160) o 2,5  $\mu$ M CMFDA (55;154;161) por 15 min. Luego de esta incubación, se removió la CGamF o el CMFDA del medio realizando

## Metodología

dos lavados con medio L-15 a 4° C y se examinó el porcentaje de duplas que exhibían fluorescencia canalicular utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 25). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Q-color5, Olympus America Inc, Center Valley, EE.UU). Finalmente, se determinó en 3 campos de microscopio (10 X) el porcentaje de duplas presentes que mostraban fluorescencia verde visible en sus vacuolas canaliculares (AVc), analizando un total de al menos 200 duplas por preparación (Figura 3.1).

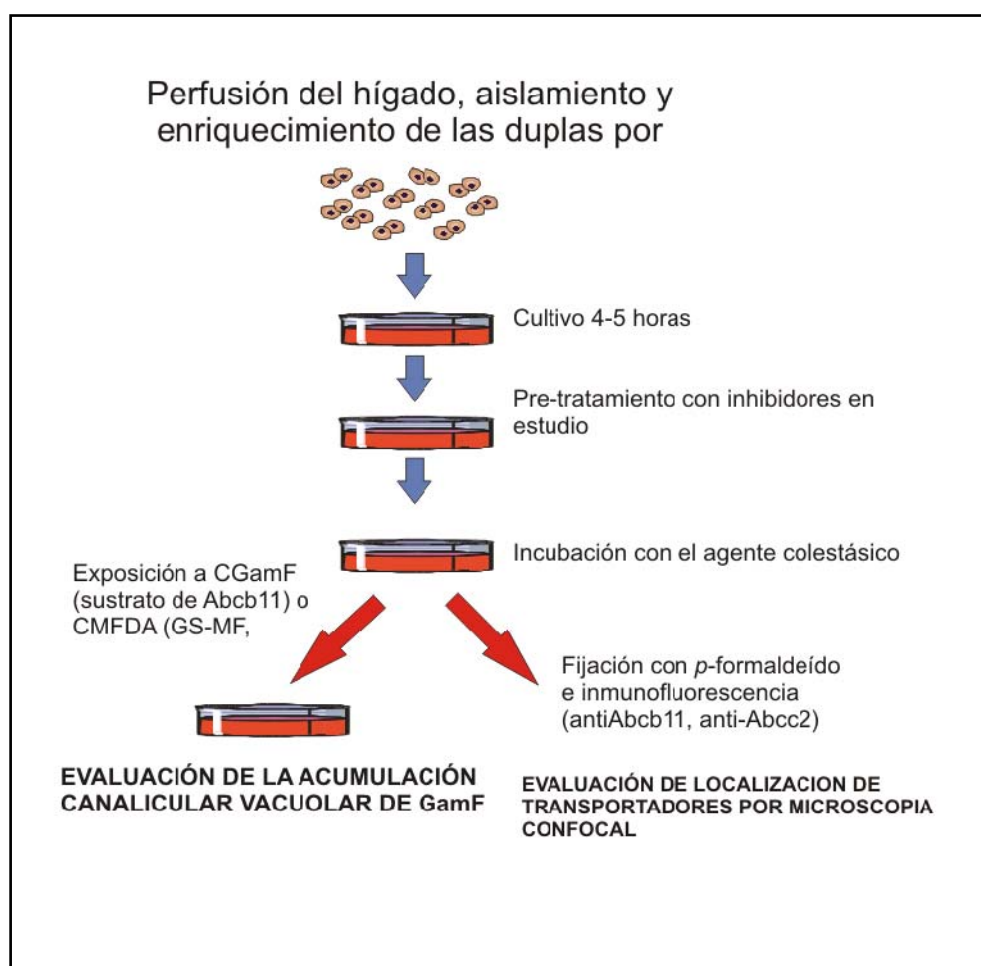


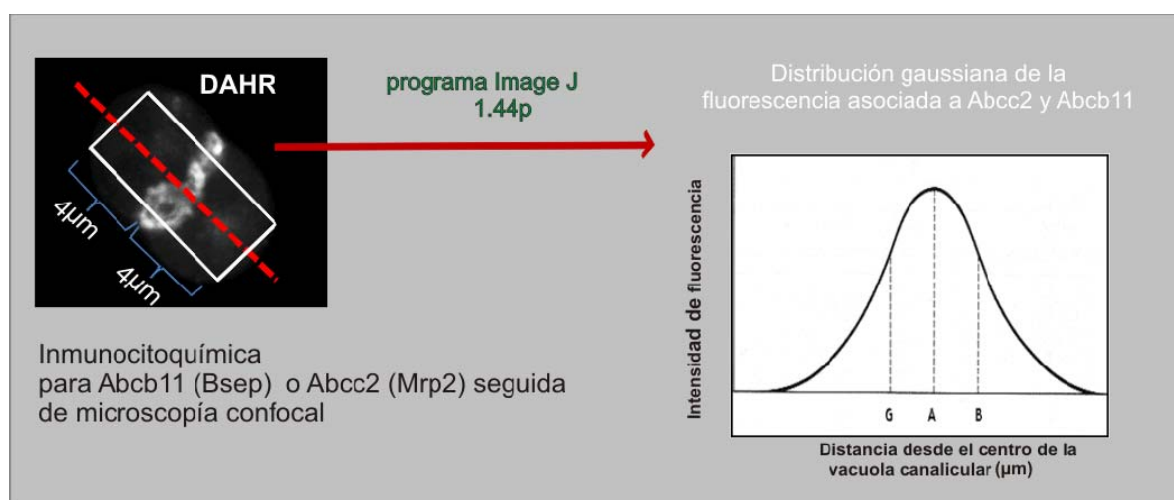
Figura 3.1. Diagrama de la obtención y estudios realizados en las DAHR

### ***3.6.2 Estudios de localización intracelular de Abcb11 y Abcc2 en DAHR.***

Para efectuar la inmunotinción para Abcb11 y Abcc2 en DAHR, las mismas fueron cultivadas sobre cubreobjetos colocados dentro de las placas de cultivo. Luego de los tratamientos, las células pegadas a los cubreobjetos fueron fijadas durante 15 min con paraformaldehído 4 % en buffer fosfato salino (PBS) (55) a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. A continuación, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2 % en PBS conteniendo 3 % de albúmina sérica bovina (BSA) durante 20 min. Luego, las células fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Bsep (1/100 2 h) (Kamiya Biomedical, Seattle, EE.UU.) o un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MRP2 humano (1/100, 2 h, M2III-6 Alexis Biochemicals, San Diego, EE.UU.) seguido de una incubación de 1 h con un anticuerpo secundario de burro, anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) de conejo conjugado con Cy2 (1/200, Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) o con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (1/200, Zymed, San Francisco, EE.UU.). Finalmente, las células se montaron y se examinaron con el sistema de láseres confocales Nikon C1 Plus, acoplado a un microscopio confocal invertido Nikon TE-2000 (Nikon, Tokio, Japón), tomándose entre 6 y 8 imágenes por cada preparación de un total de 3 preparaciones por grupo experimental.

El análisis densitométrico de imágenes se realizó a lo largo de una línea perpendicular de la vacuola canalicular de 8  $\mu\text{m}$  de longitud (4  $\mu\text{m}$  hacia cada lado del centro de la vacuola canalicular) usando el software ImageJ 1.44p, como previamente fue descrito para inmunofluorescencias de cortes de tejido hepático en Mottino *y col* (78). Se analizaron solamente los canalículos que medían entre 1 y 2,5  $\mu\text{m}$ . El espacio canalicular se identificó en las DAHR inmunoteñidas con Abcb11/Abcc2 por superposición de cada

imagen fluorescente con su imagen DIC correspondiente (71). Cada medición fue normalizada (la sumatoria de intensidades de fluorescencia de cada línea de 8  $\mu\text{m}$  fue igual a 100 unidades arbitrarias). Las variancias de diferentes condiciones se compararon con el test de Mann-Whitney. (Figura 3.2)



**Figura 3.2** Esquematización de cómo se realiza el análisis densitométrico. Luego de realizada la inmunocitoquímica para Abcc2 y Abcb11, a partir de las imágenes confocales y mediante el programa ImageJ 1.44p, se obtienen los perfiles de fluorescencia asociados a los transportadores. La intensidad de fluorescencia se cuantificó a lo largo de un eje perpendicular al centro de la vacuola canalicular, en una distancia de 8  $\mu\text{m}$  (4  $\mu\text{m}$  hacia cada lado desde el centro de la vacuola canalicular).

### 3.7 Estudios preliminares en el cultivo primario de HRCS.

#### 3.7.1 Expresión de Abcc2 y Abcb11 en cultivo primario de HRCS.

Al quinto día de cultivo, alícuotas de la fracción de membrana que contenían la misma cantidad de proteínas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (con dodecil sulfato de sodio) y sometido a electroforesis (159). En los WB de la fracción de membrana se usó una cantidad de proteína que dio una señal

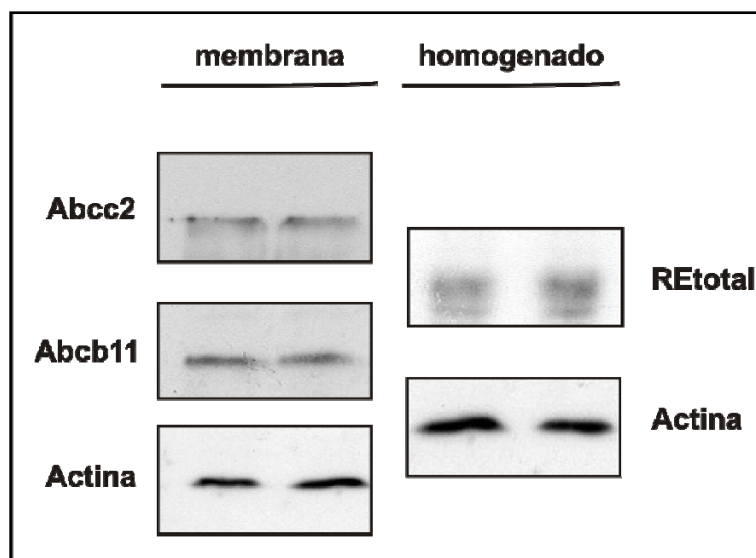
densitométrica en el rango lineal para los anticuerpos utilizados. Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P e incubadas con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Bsep ( dilución 1/1000, Kamiya Biomedical, Seattle, EE.UU.) o un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MRP2 humano (dilución 1/1000, M2-III-6 Alexis Biochemicals, San Diego, EE.UU.) toda la noche en agitación lenta a 4 °C; luego se incubo 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes, siendo finalmente las membranas reveladas usando protocolos estándares de quimioluminiscencia tal como fue descrito anteriormente. (Figura 3.3).

### ***3.7.2 Expresión de RE $\alpha$ en cultivo primario de HRCS.***

Una vez evaluada la expresión de los transportadores canaliculares Abcc2 y Abcb11 en el cultivo primario de HRCS, se evaluó la expresión del RE $\alpha$  que es la principal vía de señalización estudiada en este trabajo de Tesis. Luego de obtener el cultivo de hepatocitos en configuración sándwich (5 días), se obtuvo una fracción de homogenado celular (Ver 3.4.1).

Alícuotas de esta fracción que contenían la misma cantidad de proteínas fueron sembradas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (con dodecil sulfato de sodio) y sometidas a electroforesis (159). Las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P e incubadas con un anticuerpo anti-RE $\alpha$  total (Santa Cruz Biotechnology inc, EE.UU) (1/1000), incubándose 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente y finalmente exponiendo las membranas a un reactivo quimioluminiscente (Figura 3.3).

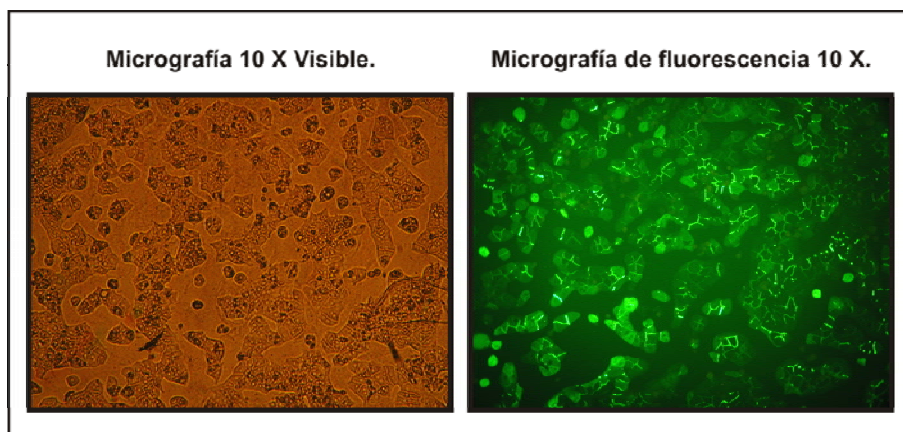




**Figura 3.3.** Expresión de Abcb11, Abcc2 y RE $\alpha$  en el cultivo primario de HRCS. Como se puede observar en las imágenes representativas de los WB, la expresión de los transportadores canaliculares Abcb11 y Abcc2 en la fracción de la membrana plasmática fue satisfactoria. Por otro lado, también mediante WB se observó la expresión del RE $\alpha$  en homogenado total de células.

### ***3.7.3 Funcionalidad del transportador canalicular Abcc2 en cultivo primario de HRCS.***

Al quinto día de cultivo las células se incubaron con CMFDA (5  $\mu$ M) por 15 min y luego se lavaron dos veces con medio de cultivo L-15 y se realizó un examen cualitativo del transporte de GS-MF (Figura 3.4) observando la fluorescencia canalicular que exhibían las células utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 25). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Q-color5 Olympus America Inc, Center Valley, EE.UU.).



**Figura 3.4. Funcionalidad de Abcc2 en el cultivo primario de HRCS.** El cultivo celular fue expuesto a CMFDA (10 $\mu$ M) por 15 min y se evaluó cualitativamente el transporte de GS-MF. Se confirmó así la funcionalidad del transportador Abcc2.

### 3.8 Técnicas aplicadas en el cultivo primario de HRCS.

El modelo de cultivo primario de HRCS fue utilizado para silenciar la expresión del RE $\alpha$  y luego evaluar la localización de los transportadores canaliculares Abcc2 y Abcb11.

#### 3.8.1 *Knock-down del RE $\alpha$ en cultivo primario de HRCS.*

##### 3.8.1.1 Diseño y síntesis de ARN de interferencia para RE $\alpha$ de rata.

Cuatro dúplex de ARN de 21 nucleótidos (ARNi) dirigidos al ARNm del RE $\alpha$  de rata fueron diseñados utilizando el programa de selección WisiRNA (162). El ARNi “scrambled” (SC) fue diseñado aleatoriamente a partir de una de las secuencias de nucleótidos de uno de los ARNi en este caso la del siRNA4. Los ANRi fueron sintetizados utilizando el Kit Ambion’s Silencer<sup>TM</sup> siRNA. Las secuencias de los ARNi utilizados fueron las siguientes:

siRNA1: CCAAUGCACCAUCGAUAAG

siRNA2: GUCGAUUCCGCAUGAUGAA

siRNA3: GAGUUUGUGUGCCUCAAAU

siRNA4: GGCAUGGAGCAUCUCUACA

### **3.8.1.2 Protocolo de transfección en el cultivo primario de HRCS.**

El cultivo primario de hepatocitos se obtuvo como se describió en el punto 3.3.4 pero con algunas modificaciones para desarrollar el *knock-down* del RE $\alpha$  que serán descritas a continuación. Antes del agregado de la segunda capa de colágeno se realizó la transfección de hepatocitos primarios mediante la adición de 5  $\mu$ l de lipofectamina (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.) con una concentración de ARNi de 70 nM por pocillo, seguido de una incubación de 4 hs a 37 °C con medio de cultivo con el agregado de antibióticos (ampicilina+estreptomicina).

Después de la transfección, los hepatocitos se lavaron con medio L-15 y se recubrieron con colágeno gelificado como fue descrito en el apartado 3.3.4.3 para obtener la polarización de los hepatocitos. La expresión del RE $\alpha$  fue evaluada por WB en homogenado total a las 48 hs y a las 72 hs de la transfección con los 4 ARNi sintetizados.

### **3.8.1.3 Viabilidad celular en la transfección.**

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue usada como una medida de viabilidad celular (163). La liberación de LDH en el medio de cultivo fue medido después de 24 hs de la transfección con los ARNi utilizando un kit comercial

(Wiener Lab, Rosario, Argentina). Cabe aclarar que las primeras 24 hs de la transfección es el período de tiempo crítico debido que la incubación con lipofectamina se hace conjuntamente con medio de cultivo con antibiótico, pudiendo éste ingresar a la célula y provocar daño celular.

### ***3.8.2 Evaluación de la localización de Abcb11 y Abcc2 en cultivo primario de HRCS.***

Para evaluar la distribución intracelular de los transportadores Abcb11 y Abcc2 en el cultivo primario de HRCS se modificó ligeramente la forma de cultivar los hepatocitos. Los hepatocitos se cultivaron sobre cubreobjetos colocados en las placas de 6 pocillos, quedando el mismo debajo de ambas capas de colágeno.

Luego de los tratamientos las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min, se bloquearon y permeabilizaron con 3% de BSA y 0,5% Tritón X-100 en PBS durante 30 min. Se incubaron con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Bsep (dilución 1/100, Kamiya Biomedical, Seattle, EE.UU.) o un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MRP2 humano (dilución 1:100, M2III-6 Alexis Biochemicals, San Diego, EE.UU.) toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda. Luego de una incubación de 1 h con un anticuerpo secundario de burro, anti-inmunoglobulina G (anti-IgG) de conejo conjugado con Cy2 (dilución 1/200) o con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (dilución 1/200). Para delimitar los canalículos, los filamentos de actina se tiñeron con faloidina Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU, dilución 1/100, 2 hs). Los núcleos celulares de los hepatocitos también fueron teñidos con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad CA, EE.UU.) 1,5 mM durante 10 min. Finalmente, las células fueron montadas y examinadas con el sistema de láseres confocales Nikon C1 Plus, acoplado a un microscopio confocal invertido Nikon TE-2000

(Nikon, Tokio Japón). Todas las muestras fueron validadas y calificadas de acuerdo a un criterio morfológico (presencia de pseudocanalículo y longitud canalicular por célula). Al menos tres áreas de las imágenes obtenidas con células confluentes fueron seleccionadas al azar de cada placa de cultivo.

### **3.9 Rol de RE $\alpha$ en la colestasis por E17G.**

Para corroborar la hipótesis de la participación del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G se evaluó la activación del RE $\alpha$ , la protección de la función y localización de los transportadores en presencia de un inhibidor del RE $\alpha$  y se evaluó el efecto del knock-down del RE $\alpha$ .

#### ***3.9.1 Activación del RE $\alpha$ por E17G en cultivo primario de hepatocitos.***

Las células del cultivo primario de hepatocitos fueron expuestas a E17G (100  $\mu$ M) por 5, 10, 15 o 20 min, se prepararon fracciones de membrana total como se describió en el punto 3.4.2 y se evaluó la activación del RE $\alpha$  por western blot como se describió en la sección punto 3.5.1.

#### ***3.9.2 Determinación de los efectos protectores de ICI182,780 (ICI).***

##### **3.9.2.1 Determinación de la concentración de trabajo de ICI.**

Para determinar la concentración del inhibidor bajo estudio que producía el máximo efecto protector, se realizaron estudios de concentración-respuesta en donde las DAHR fueron incubadas por 15 min con concentraciones variables de ICI (0.01-10  $\mu$ M) y luego las células fueron expuestas a E17G (100  $\mu$ M, 20 min). Finalmente, se realizaron

## Metodología

estudios funcionales de los transportadores canaliculares en las DAHR como se describe en el ítem 3.5.1. A partir de estas evidencias iniciales, se realizaron los estudios siguientes utilizando la concentración de ICI más óptima. En todos los estudios de funcionalidad de las DAHR los tratamientos se realizaron con el medio de cultivo L-15.

### 3.9.2.2 Estudios concentración-respuesta de ICI sobre alteraciones colestásicas producidas por E17G.

Al finalizar el período de cultivo necesario para el restablecimiento de su polaridad funcional, las DAHR fueron expuestas al vehículo (DMSO; grupo control) o E17G a concentraciones variables (25-800  $\mu\text{M}$ ) por 20 min. Para evaluar el rol del RE $\alpha$  en el efecto producido por E17G, DAHR fueron pre-incubadas con el inhibidor del RE $\alpha$  ICI (ICI, 1  $\mu\text{M}$ ) por 15 min, y esto fue seguido por la incubación con E17G por otro período de 20 min, para luego evaluar la funcionalidad de los transportadores canaliculares.

### 3.9.2.3 Protección de la deslocalización de Abcb11 y Abcc2 en DAHR.

Para efectuar la inmuno-tinción para Abcb11 y Abcc2 en DAHR (ver 3.5.2), las mismas fueron cultivadas sobre cubreobjetos colocados dentro de las placas de cultivo y se les realizaron los siguientes tratamientos detallados en la Tabla 2.1.

	Pre-tratamiento	Tratamiento
Tiempo	15 min	20 min
Control	DMSO (0,2 v/v)	DMSO (0,2 v/v)
Control ICI	ICI (1 $\mu\text{M}$ )	ICI (1 $\mu\text{M}$ )
E17G	DMSO (0,2 v/v)	E17G (200 $\mu\text{M}$ )
E17G+ICI	ICI (1 $\mu\text{M}$ )	E17G (200 $\mu\text{M}$ )+ICI (1 $\mu\text{M}$ )

Tabla 2.1. Pre-tratamientos y tratamientos realizados en los estudios de deslocalización de Abcc2 y Abcb11 en el modelo de DAHR.

### ***3.9.3 Evaluación de la localización de Abcb11 y Abcc2 en cultivo primario de HRCS con knock-down de RE $\alpha$ .***

Luego de 48 hs del *knock-down* de RE $\alpha$ , los hepatocitos fueron tratados con E17G (200  $\mu$ M, 20 min) o vehículo (DMSO, control) y se realizó el protocolo de inmunotinción (ver punto 3.7.2).

### **3.10 Caracterización de la participación del RE $\alpha$ en la colestasis por E17G.**

En esta segunda parte del trabajo de Tesis, para caracterizar la participación del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G se llevaron a cabo estudios de complementariedad funcional de vías de señalización en el modelo de DAHR y estudios de inhibición conjunta de las vías implicadas en el modelo de cultivo primario de hepatocitos de rata.

#### ***3.10.1 Vías de señalización de PI3K y RE $\alpha$ .***

##### **3.10.1.1 Estudios de co-inhibición de PI3K y RE $\alpha$ .**

Los estudios de co-inhibición de RE $\alpha$  y PI3K se llevaron a cabo preincubando las DAHR con el inhibidor de PI3K Wortmanina (100 nM), concentración a la cual se produce el efecto máximo de protección, junto con el inhibidor ICI (1  $\mu$ M) por 15 min antes de exponer a las DAHR a E17G (100  $\mu$ M) por un período de 20 min. Luego se evaluó la funcionalidad de tanto Abcc2 como Abcb11.

### **3.10.2 Vías de señalización de PKC $\epsilon$ y RE $\alpha$ .**

#### **3.10.2.1 Estudios de co-inhibición de RE $\alpha$ y PKC $\epsilon$ .**

Los estudios de co-inhibición de RE $\alpha$  y PKC $\epsilon$  se llevaron a cabo preincubando las DAHR con el inhibidor de PKC $\epsilon$  Gö6976 (1  $\mu$ M) junto con el inhibidor ICI (1  $\mu$ M) por 15 min antes de exponer a las DAHR a E17G (100  $\mu$ M) por un período de 20 min y evaluando la función de transporte de Abcc2 y Abcb11.

#### **3.10.2.2 Análisis de la activación de PKC $\alpha$ por WB en condiciones de inhibición de RE $\alpha$ .**

Los hepatocitos fueron expuestos a E17G 100  $\mu$ M por 5, 10, o 15 min. En experimentos separados, se testeó el efecto producido por ICI (1  $\mu$ M) exponiendo a las células por 15 min al inhibidor, antes de agregar E17G 100  $\mu$ M (5, 10 o 15 min) o su solvente. Se han realizado experimentos a diferentes tiempos de incubación para poder obtener el pico de activación de la quinasa. La incubación con ICI se mantuvo a través de todo el período de exposición a E17G. Finalmente, se evaluó la activación de PKC $\alpha$  por medio de la translocación a membrana como se describió previamente.

#### **3.10.2.3 Análisis de la activación de RE $\alpha$ por WB en condiciones de inhibición de PKC $\alpha$ .**

Se testeó el efecto de Gö6976 (inhibidor selectivo de PKC $\epsilon$ , 1  $\mu$ M) sobre el estado de fosforilación de RE $\alpha$  por exposición de las células por 15 min al inhibidor, antes de la exposición a E17G (100  $\mu$ M, 15 min) o su solvente y posteriormente se evaluó la activación del RE $\alpha$ .



### **3.10.3 Vías de señalización de GPR30/AC/PKA y RE $\alpha$ .**

Las estrategias experimentales utilizadas para realizar este tipo de estudio fueron utilizar inhibidores de las vías GPR30/AC/PKA y observar los efectos sobre la activación del RE $\alpha$  y la activación de PKC $\epsilon$  (PKC $\alpha$ ). Como inhibidores de estas vías se utilizaron el antagonista de GPR30, G15 y el inhibidor de la adenilato ciclasa, didexoadenosina (DDA). Por otro lado, también se realizaron experimentos en los que se inhibió el RE $\alpha$  utilizando ICI y se observó el estado de fosforilación de sustratos específicos de PKA.

#### **3.10.3.1 Evaluación de la activación de RE $\alpha$ y de la activación de PKC $\alpha$ .**

Los hepatocitos obtenidos como se describió en el punto 3.3.2 fueron tratados durante 15 min con G15, (10 nM) o con DDA (1  $\mu$ M). Luego, las células fueron tratadas con E17G (100  $\mu$ M) o con su solvente (DMSO) por un período de 20 min. La incubación con los inhibidores fue sostenida a través de todo el período de exposición a E17G. Se obtuvieron fracciones de membrana y de citosol y luego se evaluó la activación de RE $\alpha$  y la translocación a membrana de PKC $\alpha$ .

#### **3.10.3.2 Evaluación del estado de fosforilación de los sustratos de PKA.**

Se obtuvieron nuevamente hepatocitos como se describió en el punto 3.3.2 y fueron sometidos a los siguientes tratamientos: con ICI (1  $\mu$ M) por 15 min, antes de agregar E17G (100  $\mu$ M, 15 min) o su solvente. La incubación con ICI fue sostenida a través de todo el período de exposición a E17G. Como controles positivo y negativo de la activación de PKA se utilizaron el análogo no hidrolizable de AMPc DB-AMPc (10  $\mu$ M) y DB-AMPc (10  $\mu$ M) + H89 (1  $\mu$ M) durante 15 min, respectivamente. Después de los tratamientos se obtuvieron los homogenados celulares y evaluó la activación de PKA.

### **3.11 Experimentos *in vivo*.**

Para evaluar el rol fisiopatológico de la participación del RE $\alpha$  en la colestasis inducida por E17G se realizaron dos estudios en diferentes modelos *in vivo* de mayor complejidad anatómica; por un lado se evaluó la activación del RE $\alpha$  en un modelo de animal entero y por otro lado se estudió el efecto de la inhibición de RE $\alpha$  en un modelo de hígado aislado y perfundido de rata (HAPR).

#### **3.11.1 Estudios en animal entero.**

La vena femoral de ratas Wistar hembra fue cateterizada utilizando catéteres de polietileno PC-50 (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ, EE.UU.). Los animales recibieron E17G (15  $\mu$ mol/kg) o solvente a través de esta vía. Inmediatamente después, se realizaron hepatectomías parciales a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20 min), conservando los tejidos a -70 °C.

##### **3.11.1.1 Análisis de la fosforilación de RE $\alpha$ *in vivo* por WB.**

Las muestras de hígado se homogeneizaron en sacarosa 0,3M que contenía inhibidores de proteasas (coctel de inhibidor de proteasa Sigma, 1 mM NaF, y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), y fueron centrifugados a 500 x g. en una centrifuga preparativa Sigma 3K30 (Shrewsbury, Inglaterra) por 10 min para la eliminación de los fragmentos celulares y de la fracción nuclear. La activación del RE $\alpha$  fue confirmada evaluando el estado de fosforilación de la Ser118 del RE $\alpha$ , a través de WB.

### **3.11.2 Modelo de Hígado Aislado y Perfundido de rata (HAPR).**

Los hígados de ratas hembra con el conducto biliar cateterizado con cánula PE-10 (Intramedic, Clay Adams) fueron perfundidos *in situ* vía la vena porta con un catéter 14G en un modelo no recirculante de un solo paso, con solución amortiguadora Krebs-Ringer bicarbonato a 37 ° C, pH: 7,4, equilibrada con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>. Inicialmente, antes de cateterizar la vena porta, el flujo se mantuvo a 10 ml/min y una vez que se logró introducir el catéter en la misma, el flujo se elevó a una velocidad constante de 30 ml/min utilizando una bomba peristáltica (MasterFlex, Chicago, EE.UU.), según describieron previamente Crocenzi *y col.* (84). La solución de perfusión fue suplementada con taurocolato de sodio (2,5 μM) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 0,5 μM) para luego realizar estudios de secreción de SB y dinitro-fenil-glutación (DNF-G). Después de un período de 20 min, el cual permite obtener valores estables de flujo biliar basal, se realizaron diferentes tratamientos que se describirán a continuación.

#### **3.11.2.1 Tratamientos en HAPR.**

Para evaluar la capacidad protectora de ICI, se agregó este compuesto al reservorio de perfusión a una concentración de 0,5 μM o su solvente (DMSO, 370 μl/L). Cinco minutos más tarde, se recolectó una muestra de bilis por un período de 15 min (basal). A continuación, se administró el agente colestásico E17G mediante una inyección única intraportal (3 μmol/hígado, durante 1 minuto) o su solvente (DMSO/10% BSA en solución salina). La bilis fue luego recolectada a intervalos de 5 min durante un período de 60 min.

Los experimentos fueron considerados válidos solamente cuando el flujo biliar basal fue mayor a 30  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{kg}$  p.c (aproximadamente 1  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  hígado). El flujo biliar fue determinado gravimétricamente asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/ml. La viabilidad hepática fue monitoreada mediante la determinación de LDH en el perfusato saliente. Los experimentos que exhibieron una actividad mayor a 20 U/l fueron descartados.

### **3.11.2.2 Estudio funcional de Abcb11 y Abcc2 en HAPR.**

El estado funcional de los transportadores Abcb11 y Abcc2 fue evaluado mediante la determinación de la excreción biliar de SB y DNF-G, (metabolito intrahepático de CDNB), respectivamente.

#### **3.11.2.2.1 Determinación de SB.**

Las SB fueron determinadas por el método de Talalay modificado por Berthelot (164), técnica que consiste en la reducción de las sales biliares por medio de la enzima 3- $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa oxidando NAD a NADH y determinando el NADH producido espectrofotométricamente.

Para cada muestra de bilis recolectada se preparó en un tubo tipo “Khan” 2  $\mu\text{l}$  de bilis, 100  $\mu\text{l}$  de hidrato de hidracina 1 M, 50  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -NAD 5 mM, 100  $\mu\text{l}$  de preparación enzimática (3- $\alpha$  hidroxiesteroide deshidrogenasa) 0,4 U/ml y 700  $\mu\text{l}$  de solución de pirofosfato de sodio 0,1 M, dejando en agitación por 50 min a temperatura ambiente y luego se leyó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Pelkin Elmer Lambda2S (Waltam, Massachusetts, EE.UU); el resultado fue asumido como concentración de TC. La

excreción de TC fue calculada como el producto entre el flujo biliar y la concentración biliar del sustrato.

### **3.11.2.2 Determinación de DNF-G.**

El contenido total de DNF-G fue medido en bilis mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando un equipo Waters 600 HPLC Pump (Milford, EE.UU.) (165). Para cada muestra de bilis recolectada, luego de haber sido desproteinizada por precipitación con ácido perclórico al 70 % v/v, la muestra se corrió con fase móvil de acetonitrilo al 25% P/V con ácido fosfórico al 0,1 % P/V a un flujo de 1 ml/min con una columna de tamaño 250x4,6 mm Phenomenex (CosmoBio, Bs. As., Argentina), detectándose el pico de DNF-G a 365 nm. La excreción de DNF-G fue calculada como el producto entre el flujo biliar y la concentración biliar del sustrato.

### **3.11.2.3 Estudios de localización de transportadores en HAPR.**

En un nuevo grupo de experimentos, un lóbulo del hígado fue extraído después de los 10 min de haber inyectado el E17G (pico máximo de colestasis), inmediatamente fue congelado con isopentano (MERK, Darmstadt, Alemania) pre-enfriado con nitrógeno líquido y fue almacenado a -70 C° para luego realizarle una tinción inmunofluorescente y un análisis de microscopía confocal correspondiente. Las microsecciones del tejido hepático fueron obtenidas con un micrótopo criostático Zeiss Microm HM500 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), secadas al aire y fijadas con paraformaldehído al 3% en PBS, pH: 7,4 para estudios de localización. Después de la fijación, los portaobjetos con el tejido hepático fueron incubados toda la noche con anticuerpos específicos contra epitopes de Abcb11 (dilución 1/100), Abcc2 (dilución 1/100) y ocludina (dilución 1/100) (Zymed

Laboratories Inc., San Francisco, EE.UU), siendo esto seguido por una incubación de 1 h con el anticuerpo secundario de burro anti-IgG conjugado a Cy2 (dilución 1/200) o conjugado a Cy3 (dilución 1/200) correspondiente para cada transportador. La tinción de ocludina fue llevada a cabo para delimitar el canalículo (81;166) ya que debido al arreglo tridimensional del hígado es un marcador más apropiado que la actina. Finalmente, todas las imágenes fueron tomadas con el sistema de láseres confocales Nikon C1 Plus, acoplado a un microscopio confocal invertido (Nikon, Tokio Japón). Para garantizar que las tinciones y las capturas de imágenes de los diferentes grupos sean comparables, para todos los grupos pertenecientes al mismo protocolo experimental, los cortes de hígado fueron preparados en el mismo día, montados en el mismo portaobjetos de vidrio, y sometidos al mismo procedimiento de detención y análisis de microscopía confocal simultáneamente. El análisis del grado de internalización de los transportadores Abcb11 y Abcc2 fue realizado sobre las imágenes obtenidas del microscopio confocal con el programa ImageJ 1.44p, como se describió en forma similar al inciso 3.6.2 (81).

### **3.12 Análisis estadístico.**

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las comparaciones múltiples se realizaron con ANOVA de una vía, seguida por el test de Newman-Keuls'. Las variancias de los perfiles densitométricos de la localización de Abcb11 y Abcc2 fueron comparados con el test Mann-Whitney U. Los cuatro parámetros de las curvas dosis-respuesta fueron comparados usando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU). Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

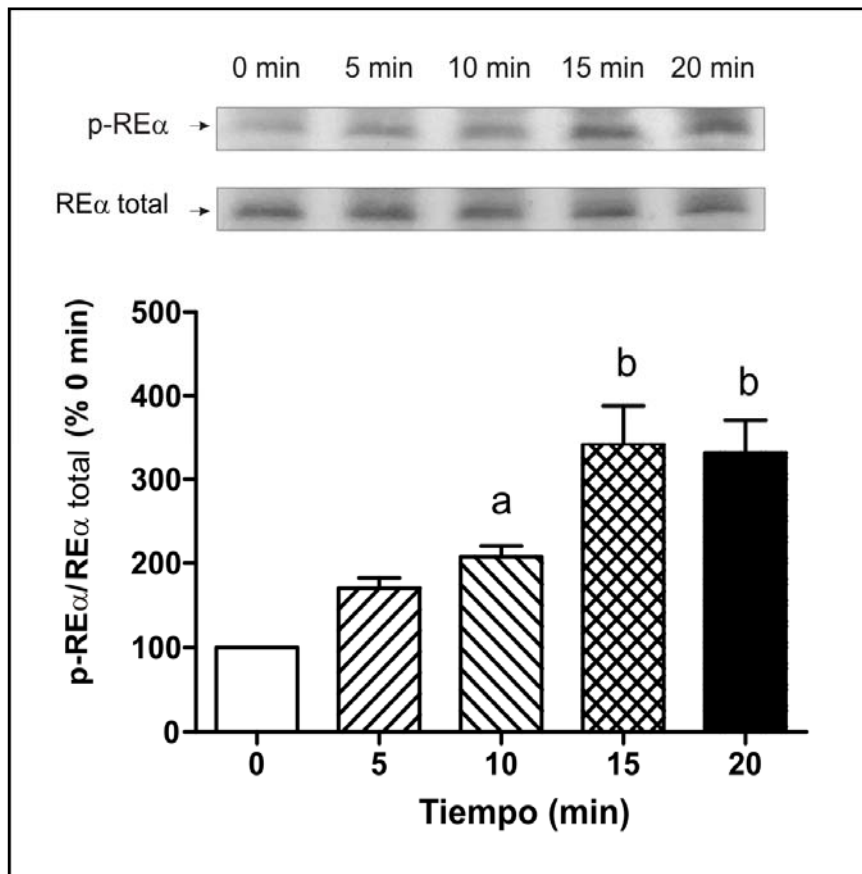
## **5-RESULTADOS**

## 4.1 Estudios *in vitro*.

### 4.1.1 Estudio de la participación del RE $\alpha$ en la colestasis.

#### 4.1.1.1 Evaluación de la activación del RE $\alpha$ por el E17G en cultivo primario de hepatocitos.

El WB de p-RE $\alpha$  (Ser118), un indicador de la activación de RE $\alpha$ , muestra que E17G aumentó la cantidad de p-RE $\alpha$  en una manera dependiente del tiempo en la fracción de membrana total (Figura 4.1). Esta activación alcanza un máximo a los 15 min de incubación con el estrógeno.



**Figura 4.1. Estimación de la activación de RE $\alpha$  por E17G.** La actividad de RE $\alpha$  fue determinada por WB usando anticuerpos contra RE fosforilado (p-RE $\alpha$ Ser118) y RE $\alpha$ . La relación de la densidad de cada banda p-RE $\alpha$ /RE $\alpha$  fue comparada con la relación de las bandas control (100%). Los datos fueron expresados como media  $\pm$  SEM (n = 3). <sup>a</sup> Significativamente diferente de 0 min (p<0,05). <sup>b</sup> Significativamente diferente de 0 min. y 10 min.



## Resultados

### 4.1.1.2 La inhibición del RE $\alpha$ protege parcialmente las alteraciones colestásicas producidas por E17G en DAHR.

#### 4.1.1.2.1 Análisis del efecto de ICI a diferentes concentraciones.

El tratamiento con ICI protegió parcialmente del efecto provocado por E17G sobre la acumulación vacuolar canalicular de CGamF y GS-MF para el rango de concentración de ICI examinado excepto para la concentración 10  $\mu$ M (Figura 4.2). El efecto máximo de ICI se observó para una concentración dentro del rango de (0,1-1)  $\mu$ M; así el resto de los experimentos en los diferentes modelos *in vitro* se realizaron utilizando la concentración de 1  $\mu$ M.

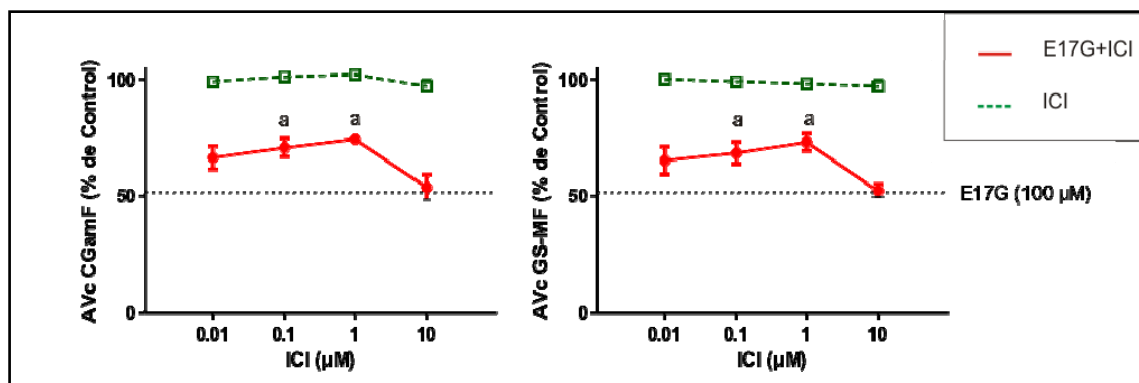


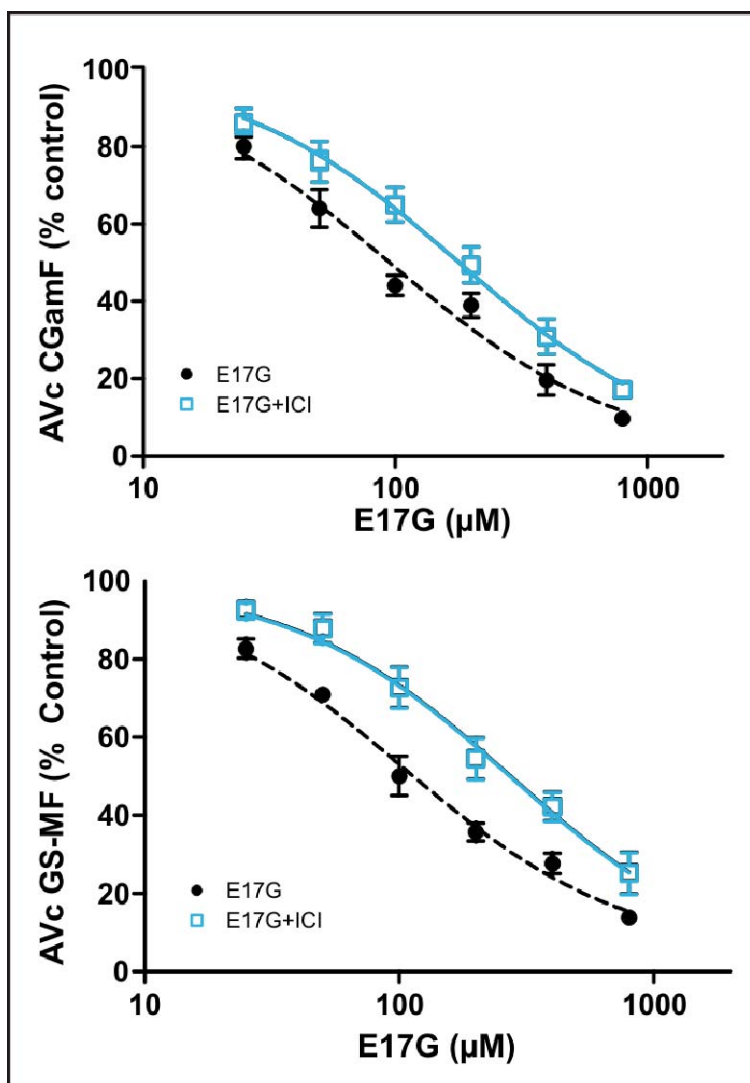
Figura 4.2. Determinación de la protección máxima de ICI vs la injuria producida por E17G en la AVc de CGamF (izquierda) y GS-MF (derecha). AVc de CGamF y GS-MF fueron calculados como el porcentaje de duplas mostrando fluorescencia visible en su pseudocanalículo de un total de al menos 200 duplas por preparación, referido al valor control de AVc. La línea de puntos indica la AVc de las DAHR expuestas sólo a E17G (100  $\mu$ M). Los datos son expresados como promedio  $\pm$  SEM (n = 3). <sup>a</sup> Significativamente diferente de E17G (100  $\mu$ M)

#### 4.1.1.2.2 Efecto de ICI en la alteración de la actividad de *Abcb11* y *Abcc2* inducida por E17G.

Para caracterizar el efecto preventivo de ICI, se llevaron a cabo diferentes estudios concentración-respuesta utilizando concentraciones variables de E17G y una concentración fija del inhibidor (1  $\mu$ M). Las curvas se ajustaron asumiendo que el parámetro del efecto

## Resultados

mínimo fue igual a 100% (similar al control), y que el coeficiente de la pendiente de Hill fue igual a 1. El inhibidor ICI protegió de manera significativa la disminución inducida por E17G en la AVc de CGamF y GS-MF en todo el rango de concentraciones de E17G estudiado (Figura 4.3). Las concentraciones inhibitorias 50 (CI50) de la acumulación de CGamF y GS-MF inducida por E17G fueron de  $91 \pm 1 \mu\text{M}$  y  $104 \pm 1 \mu\text{M}$ , respectivamente, y resultaron significativamente aumentadas en la presencia del inhibidor del  $\text{RE}\alpha$  en 102 % y 164 %, respectivamente. El efecto máximo de E17G no fue modificado por la preincubación con ICI (Ver Tabla 4.1).



**Figura 4.3. Prevención del daño producido por E17G en la Acumulación Vacuolar canalicular (AVc) de CGamF y GS-MF.** Las AVc de CGamF y GS-MF fueron calculadas como el porcentaje de duplas mostrando fluorescencia visible en su pseudocanalículo de un total de al menos 200 duplas por preparación, referido al valor control de AVc. Los valores de AVc control fueron:  $66 \pm 3\%$  para CGamF y  $76 \pm 3\%$  para GS-MF. Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

## Resultados

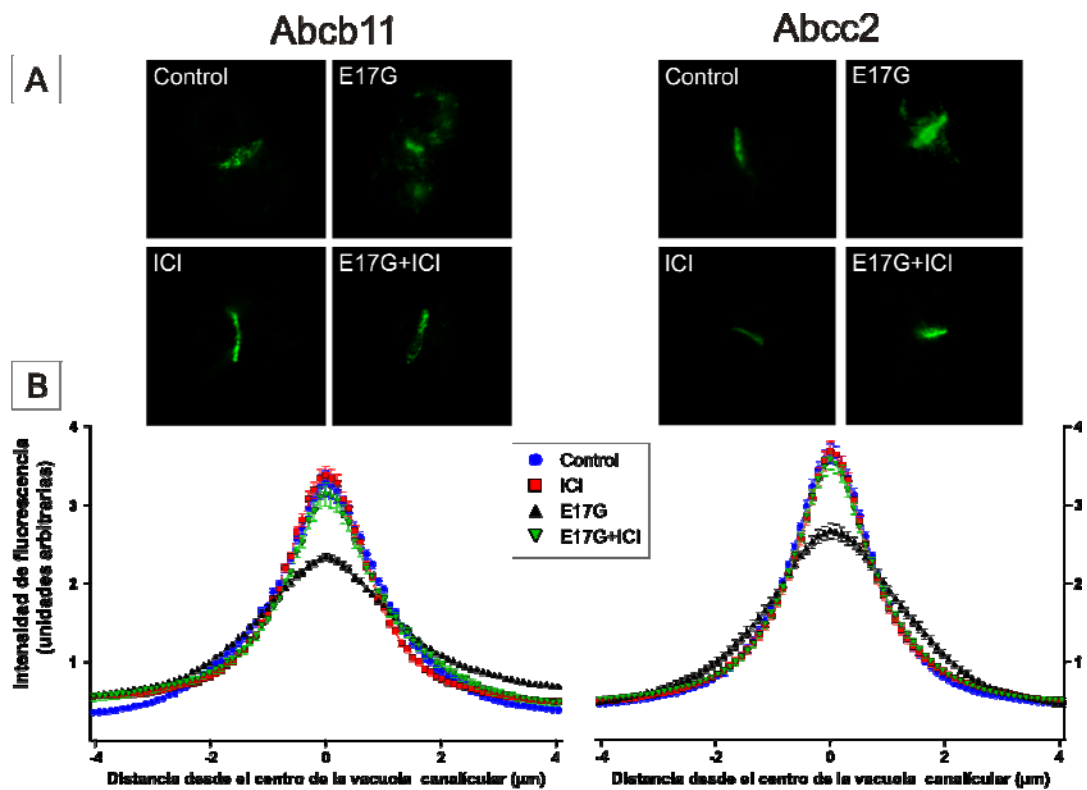
	GCamF		GS-MF	
	E17G	E17G+ICI	E17G	E17G+ICI
Efecto máximo (%)	-3±4	-12±7	4±3	-6±13
CI50 (μM)	91±1	102±1 <sup>a</sup>	104±1	164±2 <sup>a</sup>

**Tabla 4.1. Estimación de los parámetros de la curva dosis-respuesta de la falla secretoria canalicular inducida por E17G en presencia de ICI (1 μM) representada en la Figura 4.3. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism asumiendo el efecto mínimo de E17G (valor 100%) siendo la AVc control en DAHR. <sup>a</sup> Significativamente diferente de la curva de E17G (p <0,05).**

### **4.1.1.2.3 El tratamiento con ICI previene la internalización de los transportadores *Abcb11* y *Abcc2* provocada por E17G.**

El E17G produjo una redistribución significativa de los transportadores *Abcb11* y *Abcc2* desde la membrana canalicular hacia el interior celular (vesículas intracelulares) (Fig 4.4 A). El pretratamiento de las DAHR con ICI previno marcadamente esta deslocalización. El análisis densitométrico, demostró una redistribución tanto de *Abcb11* como de *Abcc2* inducida por E17G sobre una mayor distancia desde la vacuola canalicular que fue prevenida completamente cuando se bloqueó el REα (Fig. 4.4 B).

## Resultados



**Figura 4.4.** El inhibidor del receptor de estrógeno ICI previene la deslocalización de Abcb11 y Abcc2 inducida por E17G en DAHR. **A:** Las imágenes confocales representativas muestran la distribución de los transportadores canaliculares bajo estudio con los diferentes tratamientos. Nótese que bajo las condiciones controles (DMSO o ICI) la fluorescencia asociada a los transportadores está principalmente localizada en la membrana canalicular. El tratamiento con E17G (200 $\mu$ M) induce una clara internalización de vesículas que contienen transportadores más allá de los límites de la vacuola canalicular, fenómeno que se previene significativamente con el pre-tratamiento con ICI (1  $\mu$ M, 15 min). **B:** Análisis densitométricos de la distribución de la intensidad de la fluorescencia de Abcb11 como Abcc2, usando el programa ImageJ 1.44p. La vacuola canalicular fue identificado basado en su correspondiente imagen DIC. La distribución de la fluorescencia de Abcb11 y Abcc2 fue normalizada y comparada estadísticamente usando el test Mann-Whitney. El análisis estadístico de los perfiles reveló una internalización significativa de los transportadores Abcb11 y Abcc2 bajo tratamiento de E17G ( $p < 0,05$  vs control), la cual fue completamente abolida por ICI ( $p < 0,05$  vs E17G). Los resultados son expresados como media  $\pm$  SEM.  $n = 6-8$  vacuolas canaliculares por preparación, a partir de tres preparaciones independientes.

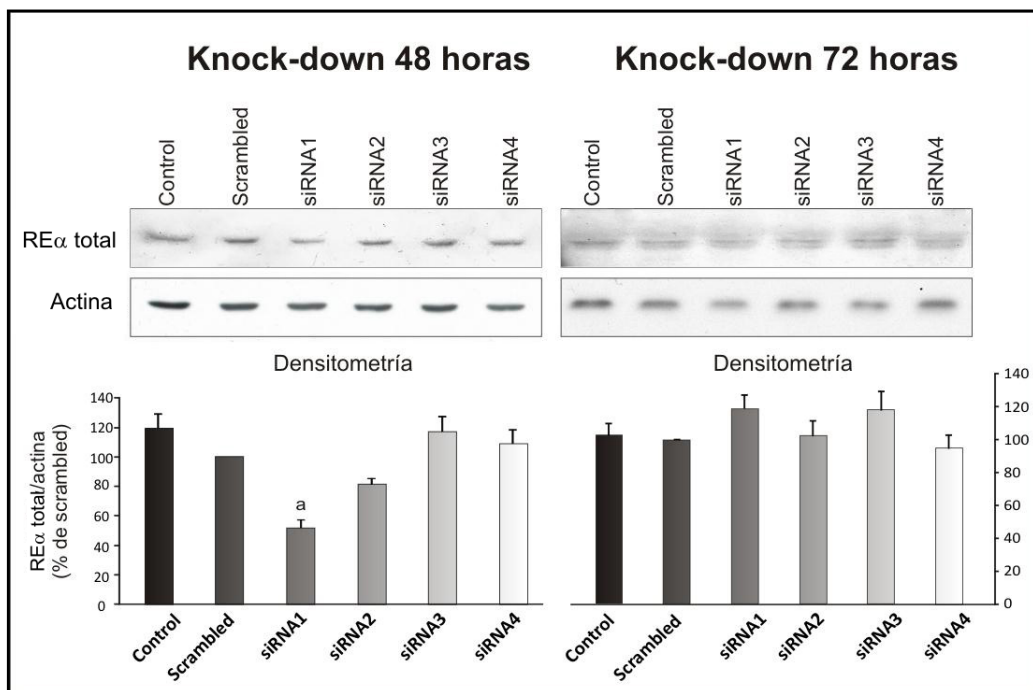
### 4.1.1.3 Knock-down del RE $\alpha$ en cultivo primario de HRCS.

#### 4.1.1.3.1 Validación de la transfección.

Luego de sintetizar los diferentes ARN de interferencia, se realizó el protocolo de *knock-down* del RE $\alpha$  en el cultivo primario de HRCS y a las 48 hs y a las 72 hs de la transfección se realizaron los WB correspondientes. El ARN de interferencia que

## Resultados

denominamos siRNA1, dirigido contra la secuencia de nucleótidos 898-916 (CCAATGCACCATCGATAAG) del ARNm del RE $\alpha$  produjo una disminución significativa en la expresión del RE $\alpha$ , por lo cual este siRNA1 fue el elegido para los estudios de localización del transportadores Abcc2 y Abcb11. En la Figura 4.5 se puede observar que el siRNA1 a las 48 hs disminuyó aproximadamente un 50 % la expresión de RE $\alpha$ .



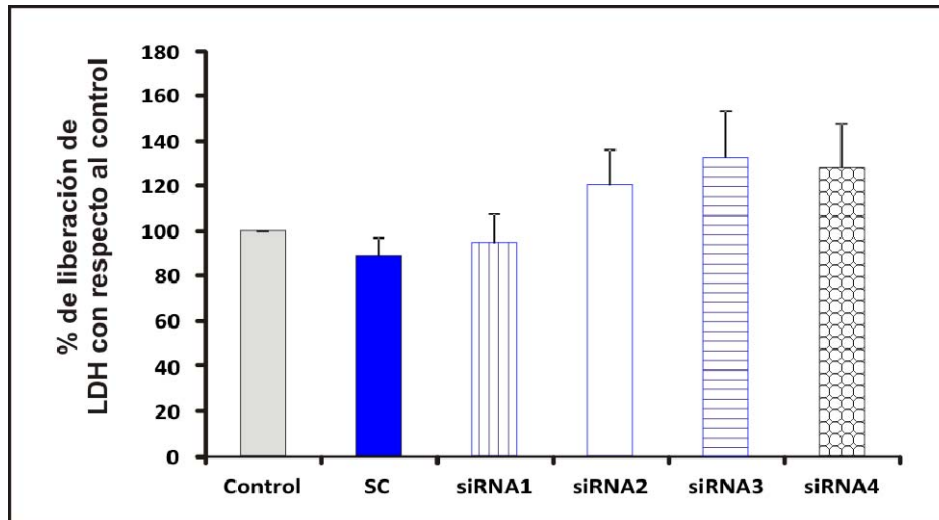
**Figura 4.5. Knock-down de RE $\alpha$ .** WB representativos de RE $\alpha$  en homogenado de cultivo primario de HRCS transfectados con 4 RNAi (48 hs y 72 hs). El siRNA1 a las 48 hs de la transfección produjo una disminución significativa de la expresión de RE $\alpha$  (51 $\pm$ 3% del SC, p<0,05). <sup>a</sup> significativamente diferente del Scrambled.

### 4.1.1.3.2 Viabilidad celular en la transfección.

En la Figura 4.6 se observa que las transfecciones con los diferentes ARNi no produjeron aumentos estadísticamente significativos de la liberación de LDH al medio de cultivo medido luego de las 24 hs de las transfecciones indicando que no se afectó la viabilidad celular.



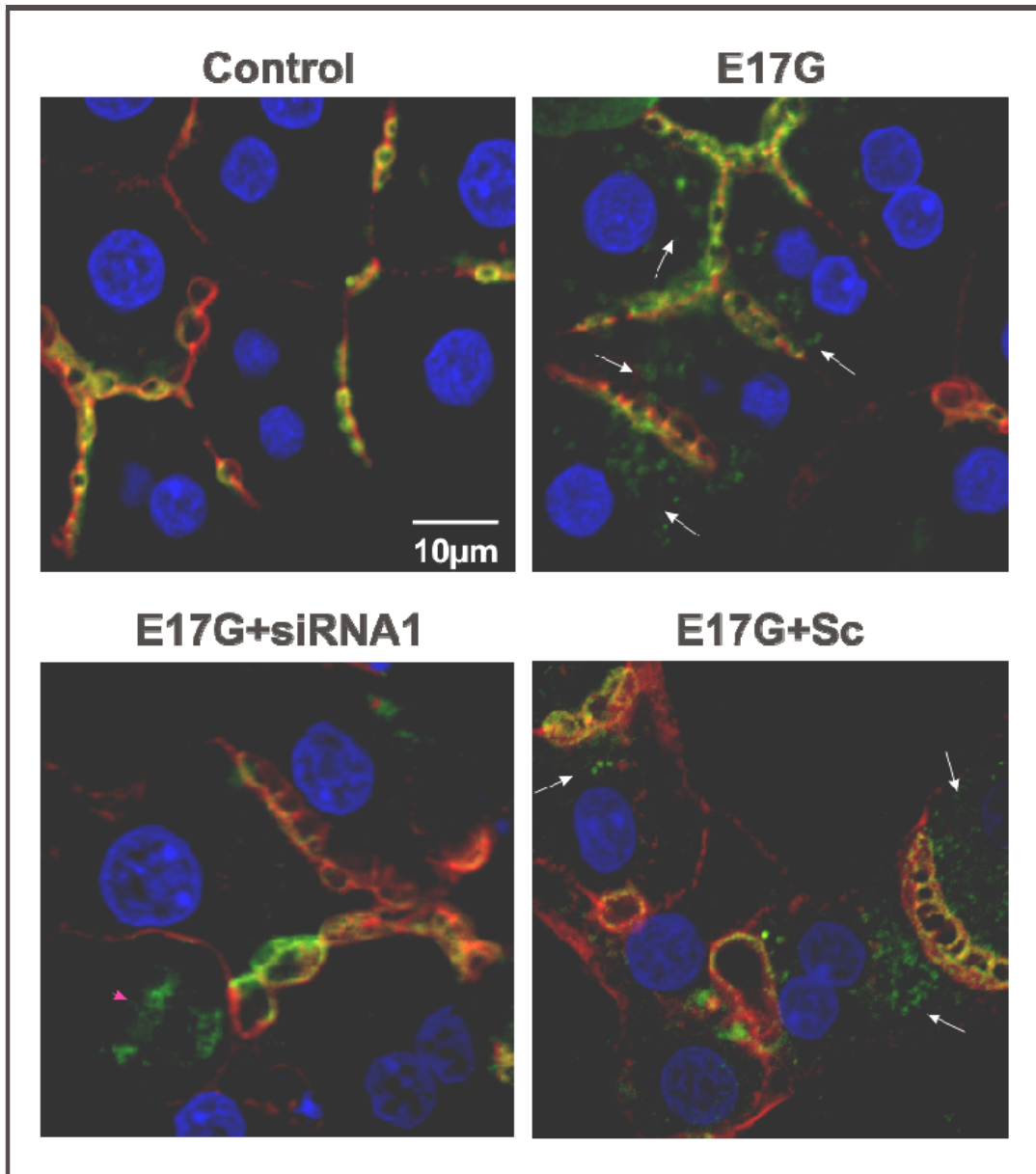
## Resultados



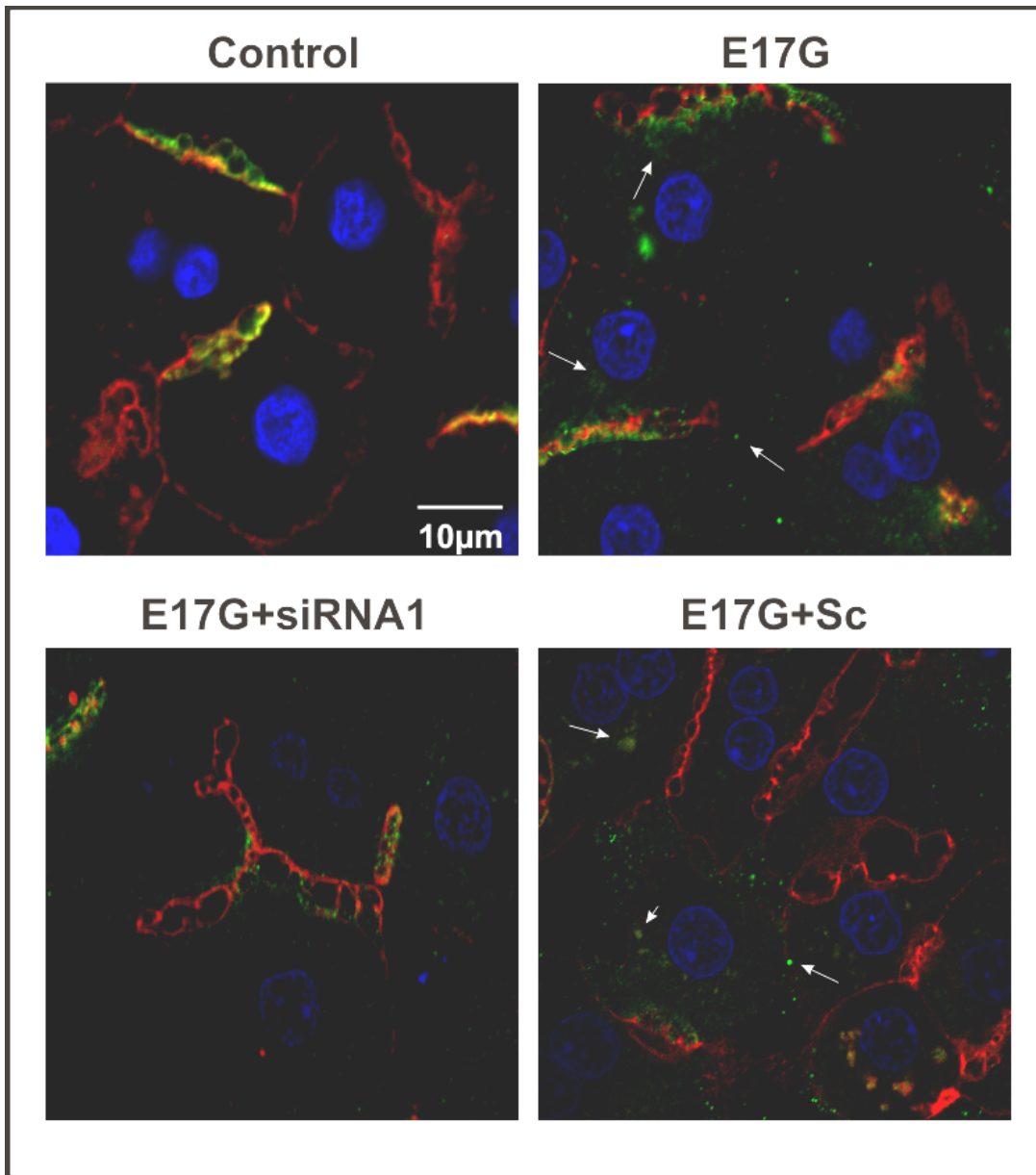
**Figura 4.6. Liberación de LDH en cultivos de células transfectadas.** La transfección con los diferentes ARNi no produjo un aumento significativo de la liberación de LDH en el medio con respecto al Control.

### 4.1.1.3.3 Evaluación de la localización Abcc2 y Abcb11 en cultivo primario de HRCS.

Para confirmar la participación de RE $\alpha$  en la alteración colestásica provocada por E17G, se evaluó el estado de localización de los transportadores Abcc2 y Abcb11 en el cultivo primario de HRCS transfectadas con el ARN de interferencia siRNA1. La Figura 4.7 y la Figura 4.8 muestran las imágenes confocales representativas de los transportadores Abcb11 y Abcc2, respectivamente, donde se puede apreciar que E17G induce una redistribución de los mismos hacia el interior, es decir, una deslocalización de la membrana canalicular. El *knock-down* de RE $\alpha$  previno este efecto provocado por E17G sobre ambos transportadores proporcionando un soporte adicional al rol de RE $\alpha$  en las vías de señalización que participan la internalización inducida por E17G de los transportadores canaliculares que conducen a una falla secretora biliar. Las células tratadas con el SC mostraron el mismo patrón de deslocalización que el E17G.



**Figura 4.7. Imágenes confocales representativas que muestran la distribución celular de Abcc2 (verde) en cultivo primario de HRCS.** También se muestra la red de actina (rojo) y los núcleos (azul). El E17G indujo una clara internalización de Abcc2, visualizado como vesículas que contienen transportador más allá de la región canalicular, alcanzando la zona perinuclear (flechas blancas). En las células transfectadas con siRNA1 este fenómeno se previno significativamente, siendo observado sólo en las células que fueron transfectadas efectivamente. Las células que no fueron transfectadas mostraron un típico patrón de deslocalización de Abcc2 (flecha roja). Las células transfectadas con el SC mostraron un patrón típico de deslocalización del transportador luego del tratamiento con E17G.



**Figura 4.8.** Imágenes confocales representativas que muestran la distribución celular de Abcb11 (verde) en cultivo primario de HRCS. También se muestra la red de actina (rojo) y los núcleos (azul). El E17G indujo una clara internalización de Abcb11, visualizado como vesículas que contienen transportador más allá de la región canalicular., alcanzando la zona perinuclear (flechas blancas). En las células transfectadas con siRNA1 este fenómeno se previno significativamente sólo en las células que fueron transfectadas efectivamente. Las células transfectadas con el SC mostraron un típico patrón de deslocalización del transportador luego del tratamiento de E17G.



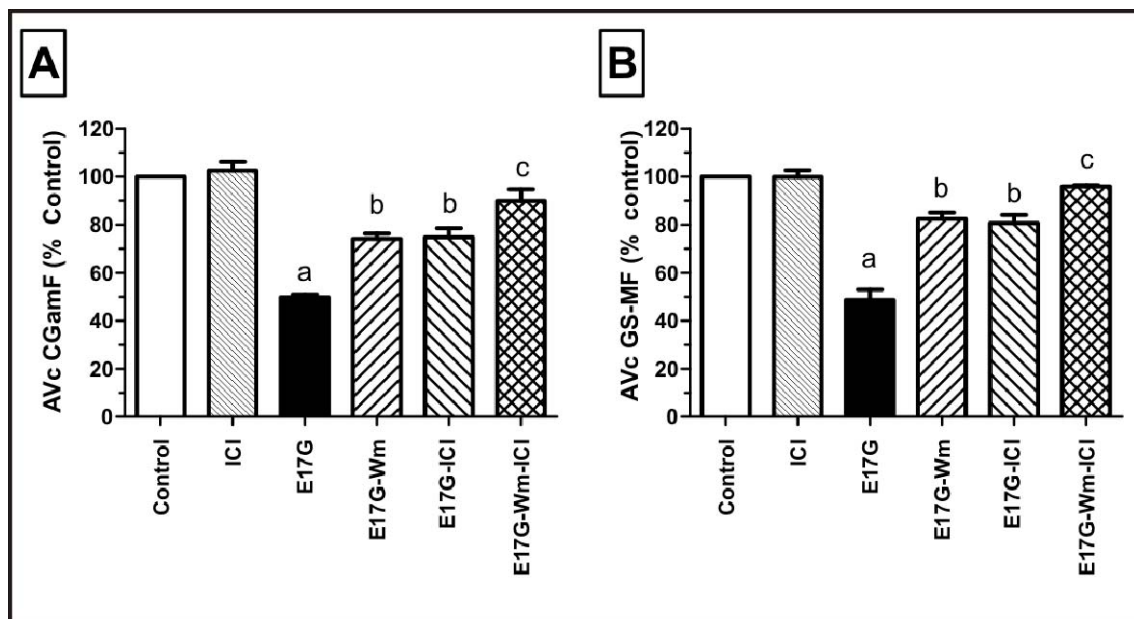
## Resultados

### 4.1.2. Relación del RE $\alpha$ con otras vías de señalización implicadas en la colestasis por E17G.

#### 4.1.2.1 Evaluación de la relación de la vía de PI3K con RE $\alpha$ .

##### 4.1.2.1.1 RE $\alpha$ participa de manera complementaria con PI3K en la falla secretora canalicular inducida por E17G.

Los efectos protectores de ICI (1  $\mu$ M) y Wm (100 nM) sobre la disminución en la AVc de CGamF y GS-MF inducida por E17G fueron aditivos (Fig 4.9, A y B), sugiriendo este resultado que RE $\alpha$  y PI3K actuarían en vías de señalización independientes. Vale la pena señalar que la concentración empleada de los inhibidores utilizados produce efectos máximos de protección llevándonos esta situación a especular acerca de los efectos sumatorios.



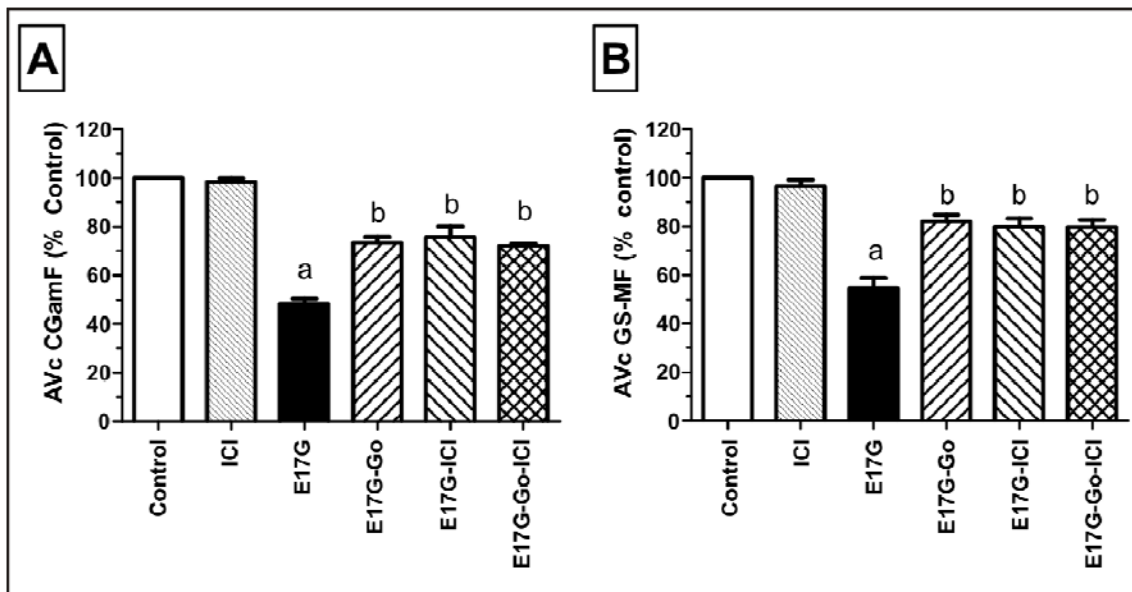
**Figura 4.9.** Efecto de la co-incubación de ICI y Wm sobre la alteración en la AVc de CGamF (A) y GS-MF (B) inducida por E17G. DAHR fueron incubadas con wortmanina (Wm, inhibidor PI3K, 100 nM) e ICI (1  $\mu$ M), tanto solos como conjuntamente, por 15 min. Luego, las DAHR fueron expuestas a E17G (100  $\mu$ M) por un período adicional de 20 min. Finalmente, las AVc de CGamF y GS-MF fueron calculadas como el porcentaje de duplas que mostraron fluorescencia visible en su pseudocanalículo de un total de al menos 200 duplas por preparación y referidas al valor de AVc control. Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM (n = 3). <sup>a</sup> Significativamente diferente del control (p < 0,05). <sup>b</sup> Significativamente diferente de E17G y control (p < 0,05)

## Resultados

### 4.1.2.2 Relación de la vía de PKC $\epsilon$ con RE $\alpha$ .

#### 4.1.2.2.1 RE $\alpha$ no actúa de manera complementaria con PKC $\epsilon$ en la falla secretora canalicular inducida por E17G.

Contrariamente, a lo observado para la vía de PI3K, no se observó un efecto preventivo aditivo cuando se utilizaron los inhibidores ICI (1  $\mu$ M) y Gö6976 (1  $\mu$ M) (Fig 4.10, A y B), por lo tanto, es posible que RE $\alpha$  y PKC $\epsilon$  compartieran una misma vía de señalización, mereciendo estos hallazgos estudios adicionales para analizar la secuencia de activación de ambas proteínas. Nuevamente, se emplearon concentraciones de los inhibidores que producen efectos máximos de protección llevándonos esta situación a especular acerca de los efectos sumatorios.

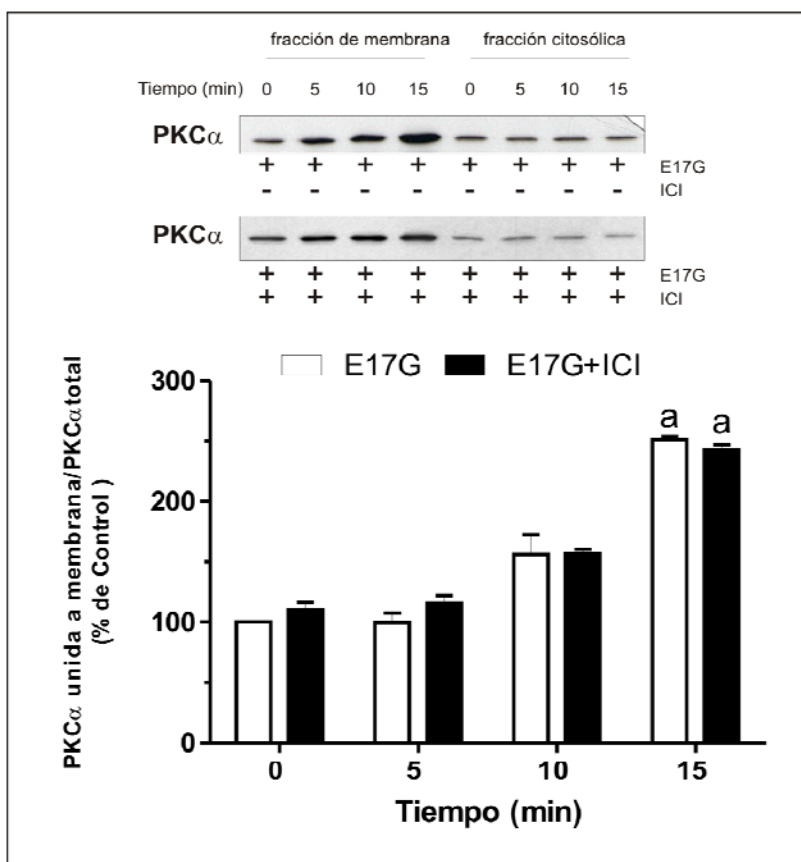


**Figura 4.10.** Efecto de la co-incubación de ICI y Gö6976 sobre la alteración en la AVc de CGamF (A) y GS-MF (B) inducida por E17G. DAHR fueron incubadas con Gö6976 (Go, 1  $\mu$ M) e ICI (1  $\mu$ M), tanto sólo como conjuntamente por 15 min. Luego, las DAHR fueron expuestas a E17G (100  $\mu$ M) por un período adicional de 20 min. La AVc de CGamF y GS-MF fueron calculados como el porcentaje de duplas que mostraron fluorescencia visible en su pseudocanalículo de un total de al menos 200 duplas por preparación y referidas al valor de AVc control. Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM (n = 3). <sup>a</sup> Significativamente diferente del control (p < 0,05). <sup>b</sup> Significativamente diferente de E17G y control (p < 0,05).

## Resultados

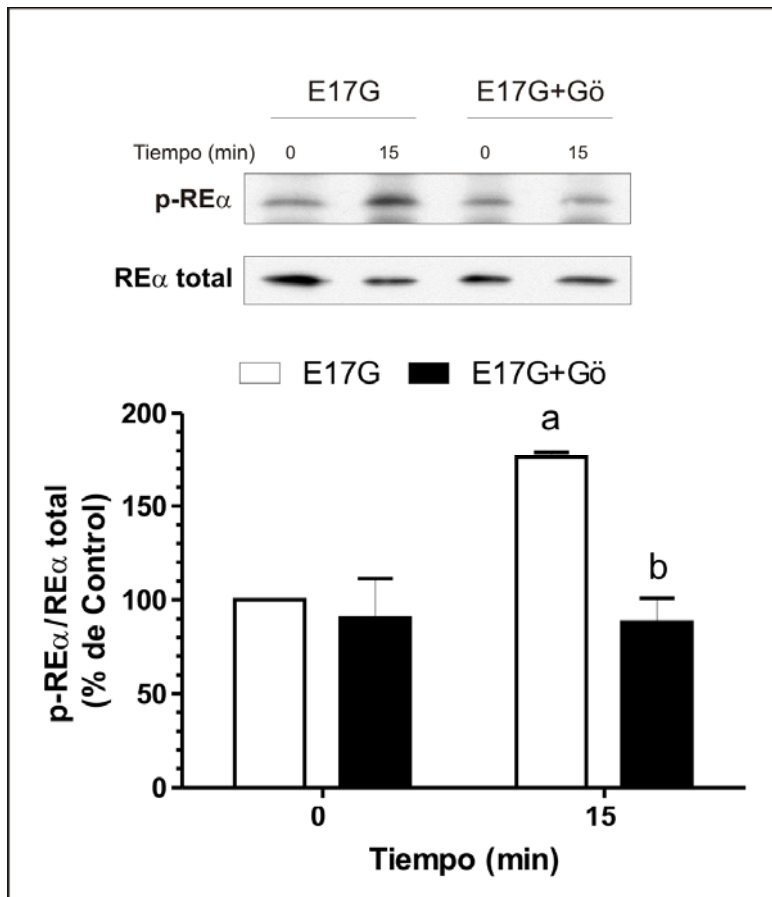
### 4.1.2.2.2 La activación de RE $\alpha$ precede a la activación de PKC $\alpha$ (PKC $\alpha$ ).

Para evaluar la secuencia temporal de la activación de RE $\alpha$  y PKC $\alpha$ , dos tipos de experimentos fueron llevados a cabo en cultivo primario de hepatocitos. En primer lugar, la Figura 4.11 muestra que el pre-tratamiento de los hepatocitos con ICI no afecta la activación de PKC $\alpha$  inducida por E17G, estimada a través de la translocación de la quinasa a la membrana, descartando que la activación de RE $\alpha$  fuera necesaria para la activación de PKC $\alpha$ . En segundo lugar, la Figura 4.12 indica que el pre-tratamiento de los hepatocitos con Gö6976 previene la activación de RE $\alpha$  observada para los hepatocitos tratados con E17G indicando que la activación de PKC $\alpha$  ocurre antes que la de RE $\alpha$  y es necesaria para que se produzca la activación del mismo.



**Figura 4.11. Activación de PKC $\alpha$  mediada por E17G en presencia del inhibidor ICI.** El gráfico de barras indica la translocación de la isoforma PKC $\alpha$ . Se asignó un valor de 100 % a la translocación al tiempo 0 min sin ICI (Control). Se realizó la densitometría de las bandas de PKC $\alpha$  tanto para la fracción de membrana como para la fracción citosólica, calculándose la relación de las mismas, la cual fue utilizada para estimar la fracción de esta quinasa que sufrió translocación a membrana (o activación). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM; n =3 análisis de WB, de diferentes cultivos celulares. <sup>a</sup> Significativamente diferente del control ( $p < 0,05$ ).

## Resultados



**Figura 4.12. Activación RE $\alpha$  en presencia del inhibidor Gö6976.** Efecto de Gö6976 sobre la activación de RE $\alpha$  por E17G. La actividad fue determinada por WB usando anticuerpos contra RE $\alpha$  fosforilado (p-RE $\alpha$ Ser118) y RE $\alpha$ . La relación de la densitometría de las bandas p-RE $\alpha$ /RE $\alpha$  fue comparada con la relación del control (100%). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM; n =3 análisis de WB, de diferentes cultivos celulares. <sup>a</sup> Significativamente diferente del control ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Significativamente diferente de E17G ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.2.3 Evaluación de la interacción de la vía de GPR30/AC/PKA con RE $\alpha$ .

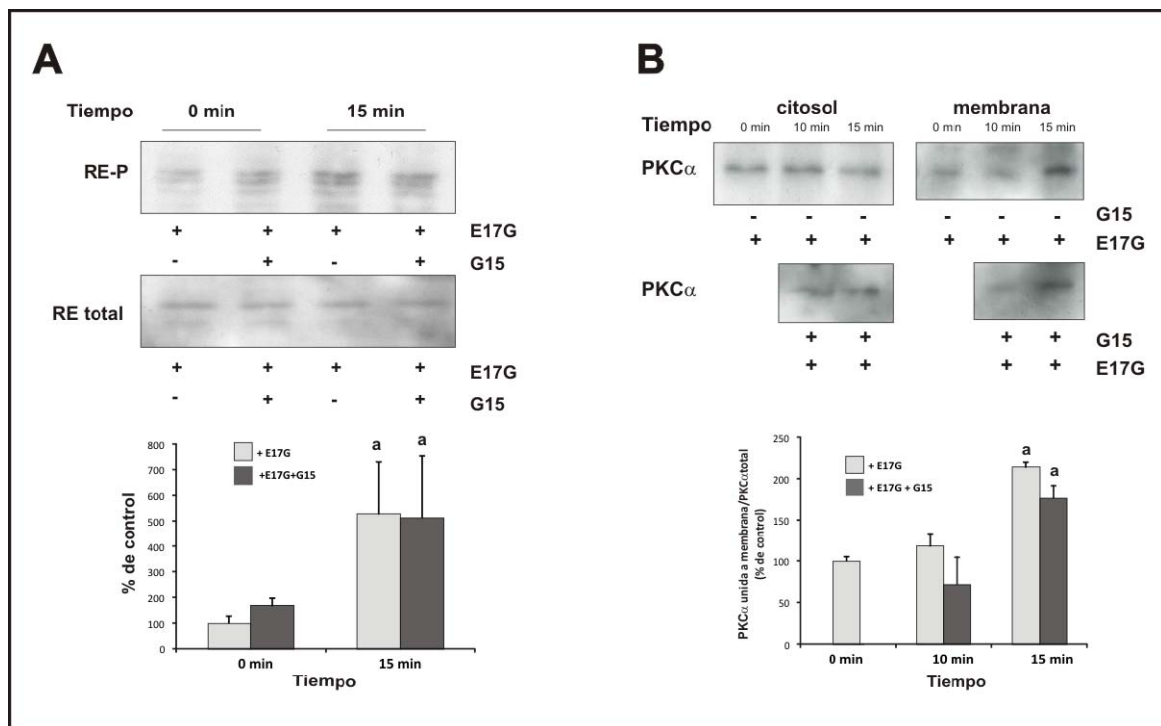
Como en estudios previos se había observado que la protección con un antagonista de GPR30 era casi completa, los estudios de “sumación” en las DAHR no son adecuados para evaluar si GPR30 y RE comparten la misma vía de señalización. Por lo tanto, se decidió evaluar directamente el efecto de la inhibición de la vía de GPR30/AC/PKA sobre la activación del RE $\alpha$  y la activación de PKC $\alpha$ , así como efecto de la inhibición de RE $\alpha$  sobre la activación de PKA, último eslabón de la vía.



## Resultados

### 4.1.2.3.1 La activación de RE $\alpha$ y PKC $\alpha$ es independiente a la activación de GPR30.

En cultivos primarios de hepatocitos, se realizó pre-tratamiento con el inhibidor de GPR30 (G15) y tratamiento con E17G. En la Figura 4.13 se observa que el tratamiento con G15 no previno la activación característica de RE $\alpha$  (Figura 4.13 A) ni la activación de PKC $\alpha$  (Figura 4.13 B) que produce E17G.

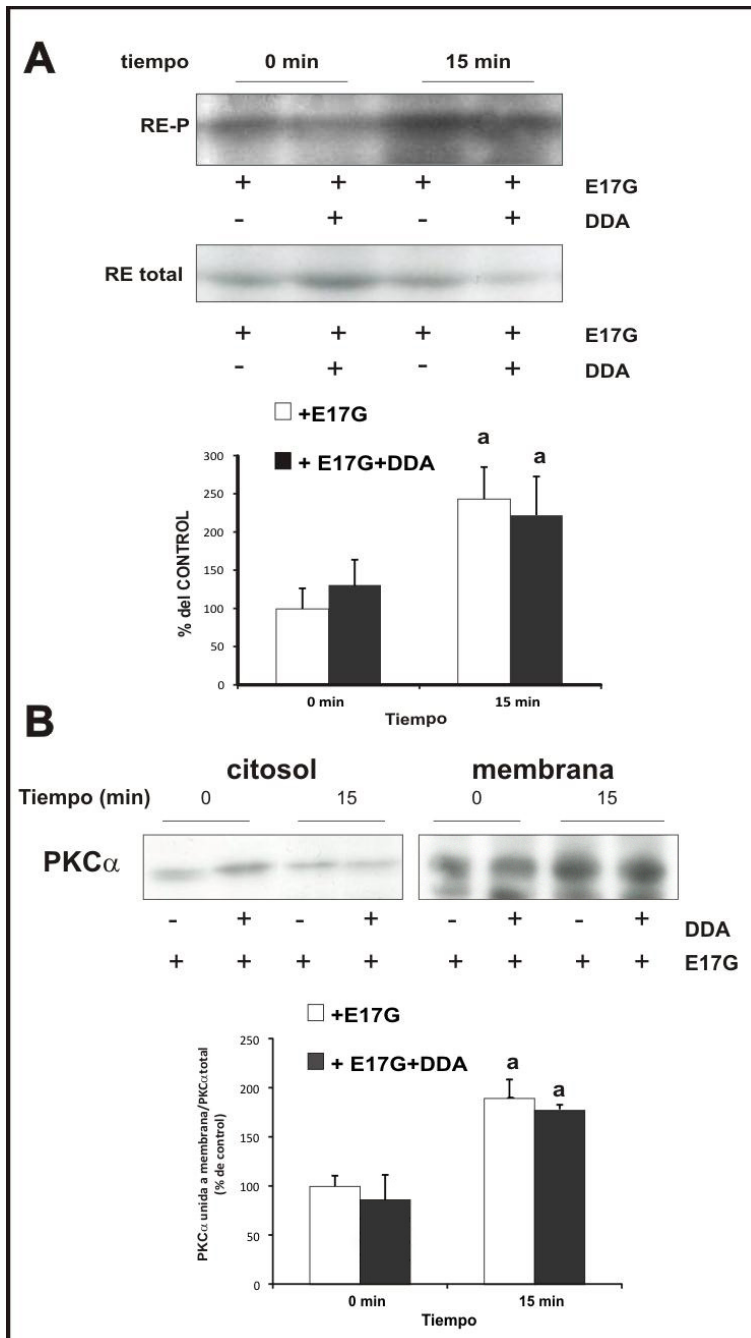


**Figura 4.13. Activación de RE $\alpha$  y PKC $\alpha$  mediada por E17G en presencia del inhibidor G15. A.** Efecto de G15 sobre la activación específica de RE $\alpha$ . La actividad fue determinada por WB usando anticuerpos contra RE $\alpha$  fosforilado (p-RE $\alpha$ Ser118) y RE $\alpha$ . Las relaciones de las densitometrías de las bandas p-RE $\alpha$ /RE $\alpha$  fueron comparadas con la relación del control (100%). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM; n =3 análisis de WB, de diferentes cultivos celulares. <sup>a</sup> Significativamente diferente del control (p<0,05). **B.** Efecto de G15 sobre la activación de PKC $\alpha$ . El gráfico de barras indica la translocación a membrana de la isoforma PKC $\alpha$ . A la translocación de PKC $\alpha$  al tiempo 0 min sin G15 (control) se le asignó el valor arbitrario 100. Se realizó la densitometría de las bandas de PKC $\alpha$  tanto para la fracción de membrana como para la fracción citosólica y la relación de las mismas fue determinada utilizándose para el cálculo de la translocación (o activación). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM; n =3 análisis de WB, de diferentes cultivos celulares. <sup>a</sup> Significativamente diferente del control (p<0,05).

## Resultados

### 4.1.2.3.2 La activación de RE $\alpha$ y PKC $\alpha$ es independiente a la activación de AC.

La Figura 4.14 muestra que el tratamiento con el inhibidor DDA, no previno la de activación de RE $\alpha$  (Figura 4.14A) ni la activación de PKC $\alpha$  (Figura 4.14 B).



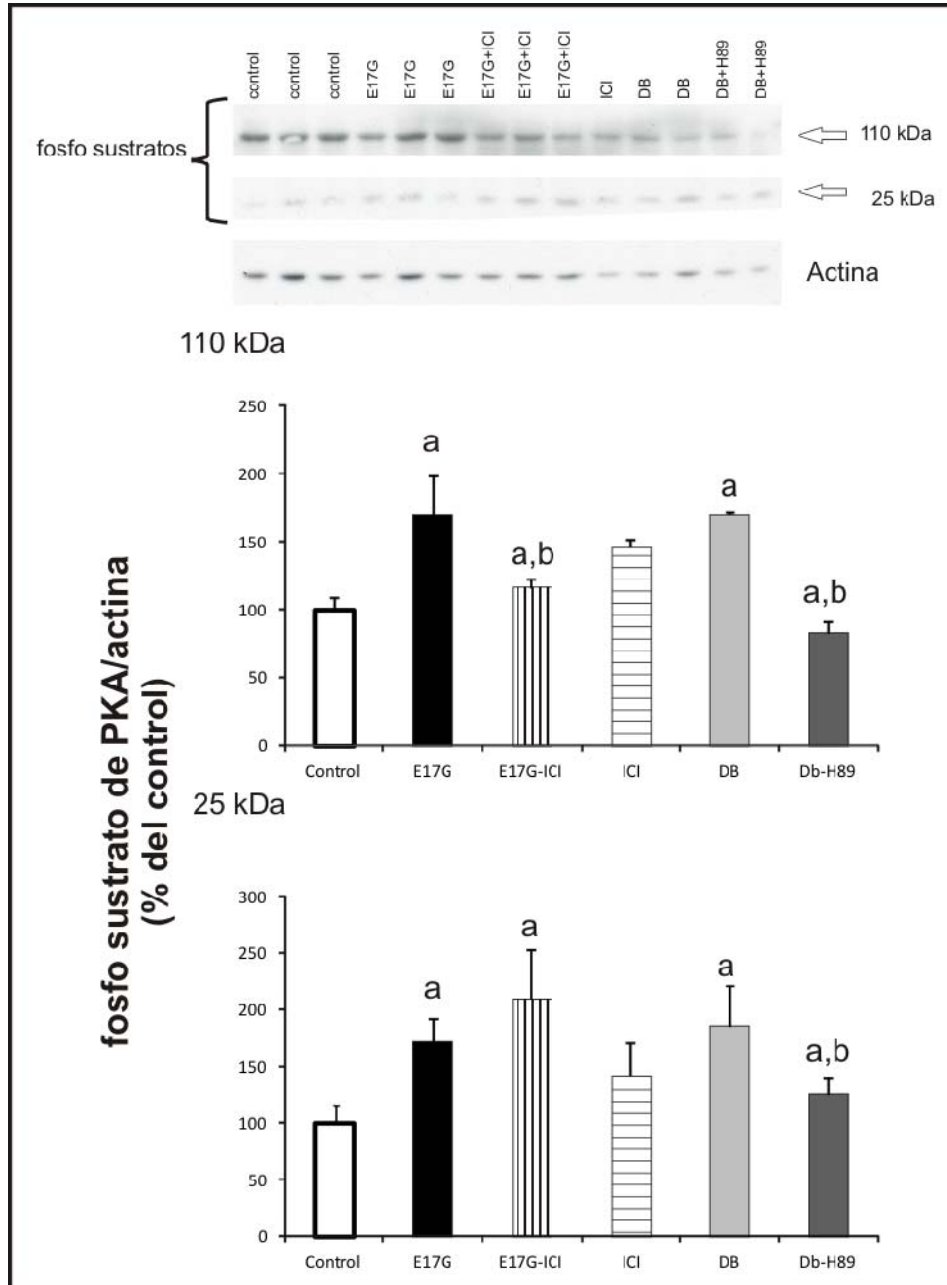
**Figura 4.14. Activación de RE $\alpha$  y PKC $\alpha$  en presencia inhibidor DDA.**

**A.** Efecto de DDA sobre la activación específica de RE $\alpha$  por E17G. La actividad fue determinada por WB. La relación de la densitometría de las bandas p-RE $\alpha$ /RE $\alpha$  fue comparada con la relación del control (100%). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM; n =3 análisis de WB, de diferentes cultivos celulares. <sup>a</sup> Significativamente diferente del control (p<0,05).

**B.** Efecto de DDA sobre la activación de PKC $\alpha$  por E17G. El gráfico de barra indica la translocación de la isoforma PKC $\alpha$ . A la translocación de PKC $\alpha$  al tiempo 0 min sin DDA (control) se le asigno el valor arbitrario de 100. Se realizó la densitometría de las bandas de PKC $\alpha$  tanto para la fracción de membrana y la fracción citosólica y la relación de las mismas fueron determinadas y se utilizó como un cálculo de la translocación (o activación). Los datos son expresados como media  $\pm$  SEM; n =3 análisis de WB, de diferentes cultivos celulares. <sup>a</sup> Significativamente diferente del control (p<0,05).

## Resultados

### 4.1.2.3.3 El ICI previene parcialmente la activación de PKA inducida por E17G.



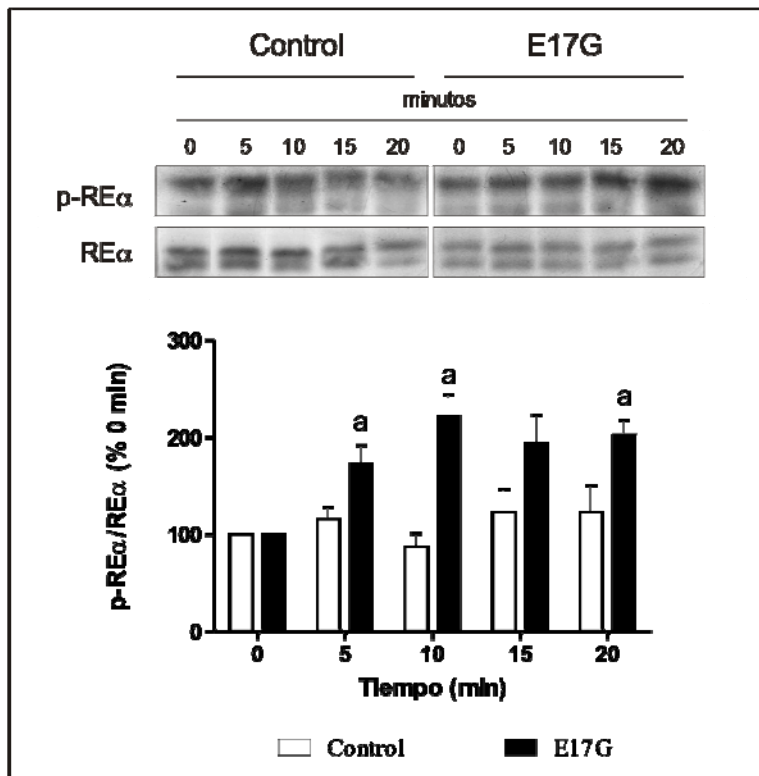
**Figura 4.15. Activación de PKA por E17G en presencia de ICI.** En la parte superior se observa el WB para los sustratos fosforilados de PKA. Basados en su respuesta a DB-AMPC (DB) en conjunto con el inhibidor de PKA, se analizaron dos bandas (110 y 25 kDa). La posible diferencia en el cargado de las proteínas se corrigió por el análisis correspondiente a la banda de actina. En la parte inferior de la figura se puede apreciar el análisis densitométrico de estas dos bandas, expresado como el cociente sustrato fosforilado/ actina y comparado con el análisis del control (100%). <sup>a</sup> Diferente significativa-mente de Control, <sup>b</sup> Diferente significativa-mente de Control y de E17G.

## Resultados

Se evaluó la actividad de PKA por wb evaluando la fosforilación de sustratos de PKA (figura 4.15) en cultivos primarios de hepatocitos aislados. Este western blot presenta varias bandas que representan posibles sustratos fosforilados de PKA, dentro de las cuales dos bandas de aproximadamente 25 y 110 kDa respondieron a DB-AMPC (activador de PKA, control positivo) y a su correspondiente inhibición por el inhibidor de PKA estudiado (H89), por lo que se consideraron sustratos de PKA. En la misma figura puede observarse que la incubación durante 15 min con E17G aumentó la fosforilación de estos sustratos de PKA, efecto que fue bloqueado parcialmente en presencia del inhibidor ICI para el caso de la banda de 110kDa pero no para la banda de 25 kDa.

### 4.2 Experimentos *in vivo*.

#### 4.2.1 Activación de RE $\alpha$ en el modelo de animal entero.



**Figura 4.16.** La activación del RE $\alpha$  por estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronido *in vivo*. E17G (15  $\mu$ mol/kg) o su solvente fue administrado a través de la vena femoral. Inmediatamente después de la administración de E17G, se realizaron hepatectomías parciales a diferentes tiempos (5, 10, 15, 20 min). La actividad de RE $\alpha$  fue determinada por western blot utilizando anticuerpos contra RE $\alpha$  fosforilado (p-RE $\alpha$  Ser118) y RE $\alpha$ . La relación de la densidad densitométrica de ambas formas de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$ /RE $\alpha$  fueron comparadas con la relación al tiempo 0 min (100%). Los datos son expresados como la media  $\pm$  SEM (n = 3). <sup>a</sup> Significativamente diferente de la muestra control al correspondiente tiempo (p<0,05).



## Resultados

---

*In vivo*, E17G también activa el RE $\alpha$ . En homogenados de hígados, la activación del RE $\alpha$  fue observada a los 10 min después de la inyección de E17G, además se observó que la activación del RE $\alpha$  se mantiene hasta 20 min después de haber inyectado el E17G (Figura 4.16).

### **4.2.2 Estudios en hígado aislado y perfundido de rata (HAPR).**

Para indagar la participación del RE $\alpha$  estudiadas en un modelo de mayor complejidad fisiológica que los cultivos primarios se diseñaron experimentos de secreción biliar en hígado aislado y perfundido de rata (HAPR) (ver diseño en metodología).

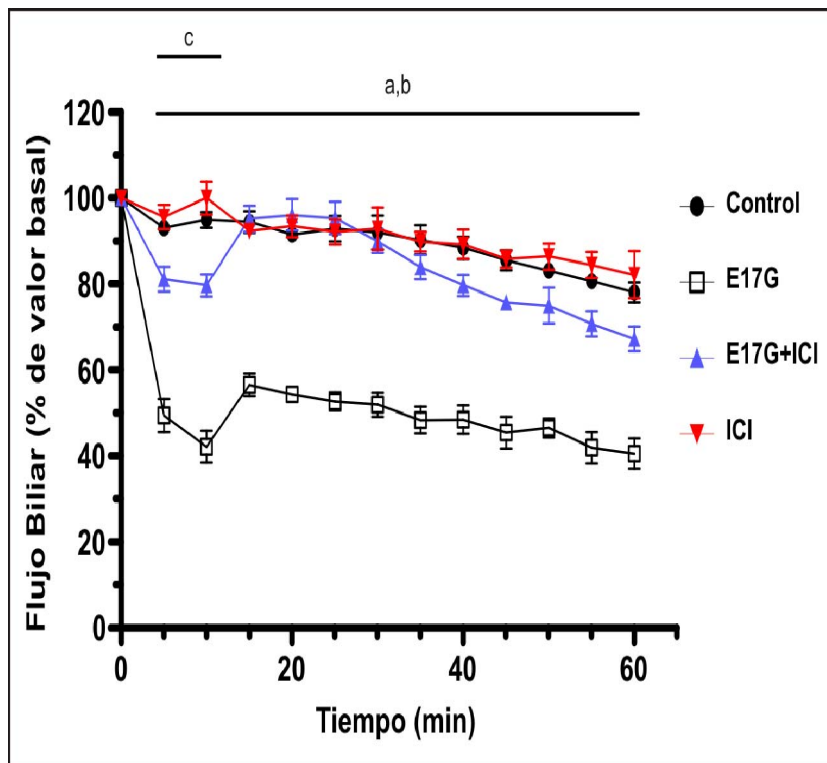
A diferencia de los modelos *in vitro* en la condición aguda, la reducción inicial del flujo biliar debido a la endocitosis de transportadores canaliculares después de la administración de E17G y la recuperación posterior del mismo debido a la re inserción de estos transportadores se producen diferencialmente en el tiempo. Por lo tanto, pueden ser fácilmente analizados con el modelo de HAPR, que permite el seguimiento dinámico de cambios en la función secretora biliar.

#### **4.2.2.1 Estudios de Flujo Biliar y de Velocidad de excreción de DNF-G y TC.**

La administración en bolo de E17G disminuyó el flujo biliar a un mínimo de aproximadamente 40% del flujo basal dentro de los 10 min, y además el flujo biliar no se recuperó en el período de perfusión (Figura 4.17). Esto fue acompañado por una disminución en la excreción de DNF-G, (mínimo 40 %) sustrato de Abcc2 (Figura 4.18 A) y de una disminución de la excreción de taurocolato (mínimo 35 %) sustrato de Abcb11 (Figura 4.18 B). La actividad de ambos transportadores se recuperó a un 60 % aproximadamente del valor basal (Figura 4.18, A y B). La excreción acumulativa de DNF-

## Resultados

G disminuyó a un  $72 \pm 2$  % de la excreción control, mientras que la excreción acumulativa de TC fue  $59 \pm 4$  % del control después de la administración de E17G (Tabla 4.2). El ICI protegió de la disminución del flujo biliar inicial provocada por E17G (mínimo 78 %) y previno completamente las alteraciones del flujo biliar provocadas por E17G a partir de los 15 min.



**Figura 4.17. ICI 182,780 protege contra el daño inducido por E17G del flujo biliar en el modelo de HAPR.** Cambio temporal en el flujo biliar y a través del período de perfusión. HAPRs fueron tratados con un bolo de E17G ( $3 \mu\text{mol/hígado}$ ) o con vehículo DMSO/BSA 10% en solución salina (control), en presencia o ausencia de ICI ( $0,5\mu\text{M}$ ). <sup>a</sup> Control significativamente diferente de E17G, <sup>b</sup> Control significativamente diferente de E17G+ICI, <sup>c</sup> E17G significativamente diferente de E17G+ICI. ( $p < 0,05$ ). N = 3-4 animales por grupo.

El pre-tratamiento con ICI también produjo una protección de la excreción biliar de los sustratos de Abcc2 y Abcb11 observada en las ratas tratadas con E17G, donde la excreción de DNF-G alcanzó un mínimo de 75 % y el mínimo alcanzado para TC fue 82 %. La excreción de ambos sustratos para las ratas tratadas con ICI+E17G aumentaron y alcanzaron la excreción de sustratos de ratas control y de ratas tratadas con E17G 15 min después de inyectado del mismo. Como resultado, la excreción acumulativa de DNF-

## Resultados

glutación ( $99\pm 2\%$  del control) y TC ( $99\pm 3\%$  de control) en ratas ICI+E17G no difirieron de las ratas control (Tabla 4.2).

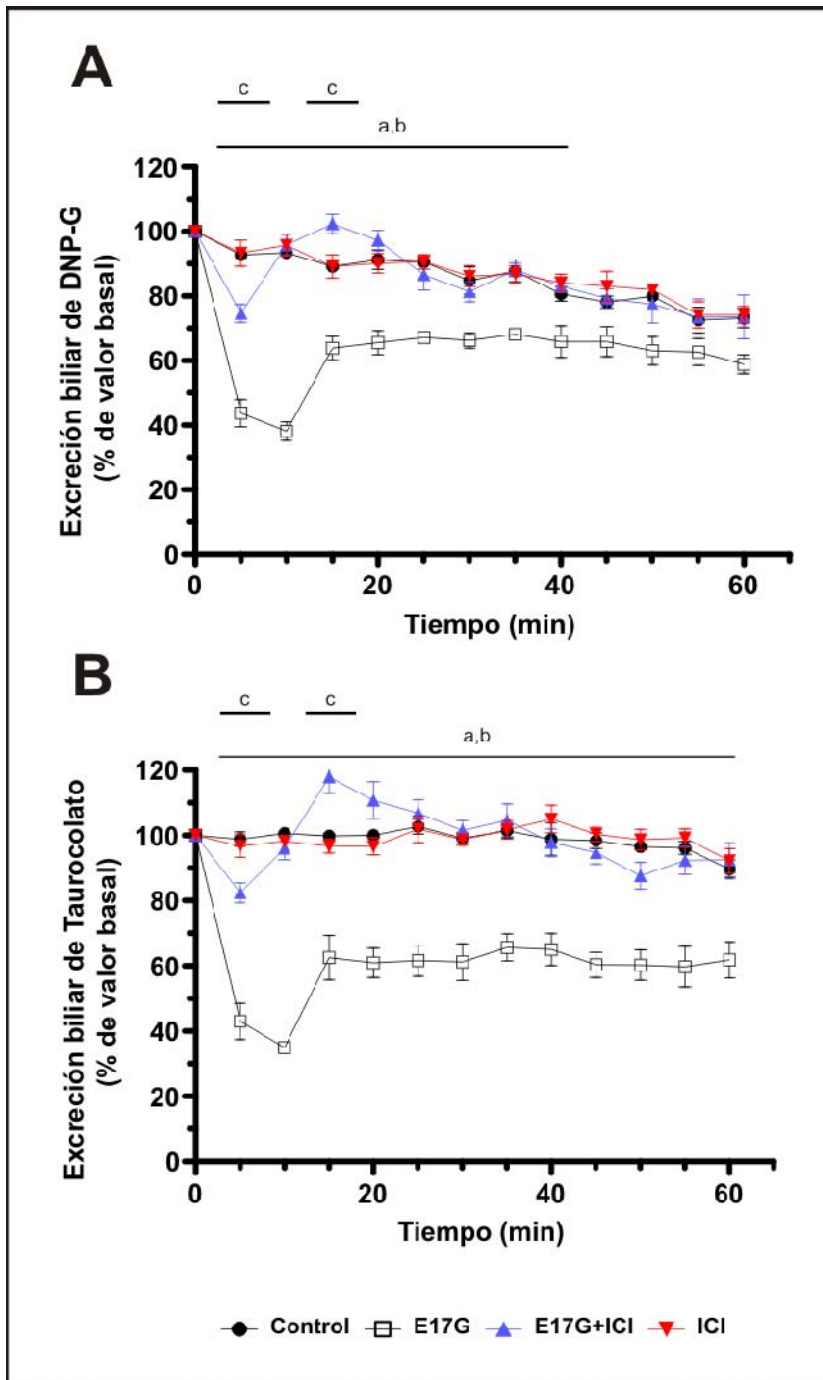


Figura 4.18. ICI 182,780 protege contra el daño inducido por E17G de la excreción de dinitrofenilglutacion y taurocolato en el modelo de HAPR. Cambio temporal en la velocidad de excreción de tanto DNF-G total (panel A) como taurocolato (panel B) a través del período de perfusión. HAPRs fueron tratados con un bolo de E17G ( $3 \mu\text{mol/hígado}$ ) o con vehículo DMSO/BSA 10% en solución salina (control), en presencia o ausencia de ICI ( $0.5 \mu\text{M}$ ). <sup>a</sup> Control significativamente diferente de E17G, <sup>b</sup> Control significativamente diferente de E17G+ICI, <sup>c</sup> E17G significativamente diferente de E17G+ICI. ( $p < 0,05$ ). N = 3-4 animales por grupo.

## Resultados

	Excreción de TC	DNF-G
ICI	100±2	101±1
E17G	59±4 <sup>a</sup>	72±2 <sup>a</sup>
E17G+ICI	99±3	99±2

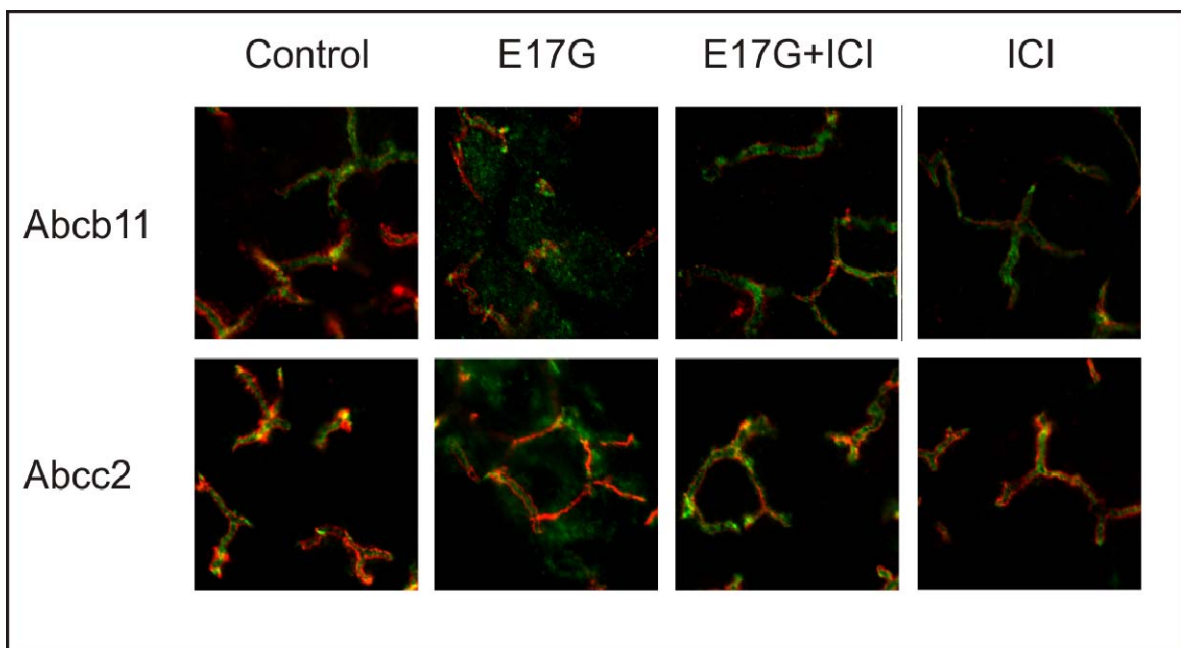
**Tabla 4.2. La disminución de la excreción de TC y DNF-G por E17G y su prevención por la inhibición de RE $\alpha$ .** Los resultados expresan la excreción biliar acumulativa de cada sustrato por un periodo de recolección de bilis de 60 min graficada en la Figura. 4.19, comparada con la excreción Control (% Valor Control). ICI (0,5  $\mu$ M) fue administrado en el medio de perfusión 15 min antes de la inyección de E17G (3  $\mu$ mol/kg iv). Los hígados control recibieron vehículo. Los resultados son expresado como media  $\pm$  SE por 3 animales/grupo. P < 0,05, <sup>a</sup> diferente del grupo control.

### 4.2.2.2 Estudios de localización de transportadores en HAPR.

La Figura 4.19 muestra imágenes confocales representativas de los transportadores Abcb11 (imágenes superiores) o Abcc2 (imágenes inferiores), en verde, y ocludina, en rojo, 10 min después de administrado el E17G (o DMSO). En hígados tratados con E17G, ambos transportadores canaliculares, Abcb11 como Abcc2, fueron detectados en estructuras intracelulares, consistente con su internalización endocítica desde la membrana canalicular. Este patrón de internalización se hizo evidente en algunas estructuras canaliculares y en otros sitios coexistió con la localización canalicular conservada de los transportadores. En los estudios densitométricos realizados (ver Metodología), los hígados tratados con E17G mostraron un perfil más ancho y más plano consistente con un aumento de la fluorescencia a una mayor distancia de la membrana canalicular, indicativo de la internalización de estos transportadores en compartimentos intracelulares (Figura 4.20). En hígados perfundidos con E17G + ICI, la distribución de

## Resultados

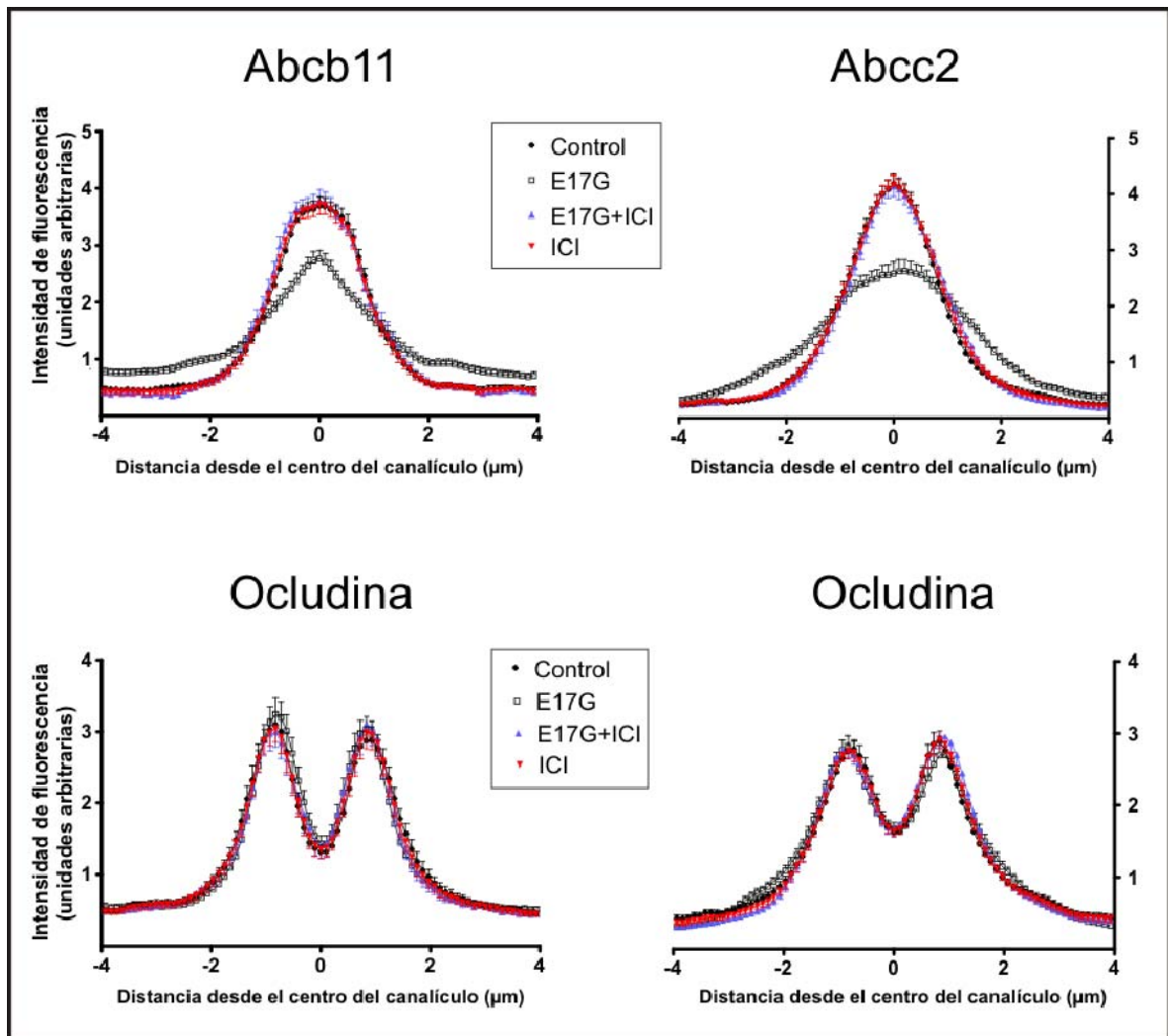
tanto Abcb11 como Abcc2 fueron casi idénticos que los hígados controles (DMSO y ICI) y esto fue corroborado con los análisis densitométricos (Figura 4.20). Ni E17G ni ICI *per se*, alteraron el ancho del canalículo estimado por los dos picos densitométricos de la ocludina (Figura 4.20).



**Figura 4.19. La inhibición del RE $\alpha$  previene la internalización de Abcb11 y Abcc2 en el modelo de HAPR.** Las imágenes confocales representativas de muestras de hígado muestran a Abcb11 (verde) y ocludina (rojo) (imagen superior); y Abcc2 (rojo) y ocludina (verde) (imagen inferior). En hígado control al igual que el tratamiento con ICI, tanto Abcb11 como Abcc2 se mantienen confinados en el espacio canalicular determinado por la proteína ocludina. En cambio, en algunos canalículos de E17G (3  $\mu$ mol/liver) se observa fluorescencia intracelular a mayor distancia de la membrana canalicular asociada con Abcb11 o Abcc2, consistente con su internalización endocítica. ICI previene la internalización de los transportadores canaliculares, en las imágenes se observa un patrón semejante al grupo control para la distribución de los transportadores en estudio. ICI *per se* no indujo ningún cambio en la localización de los transportadores canaliculares.



## Resultados



**Figure 4.20. Densitometría de las imágenes confocales de Abcb11 y Abcc2** Los gráficos representan la intensidad de fluorescencia asociada con los transportadores a lo largo de una línea de 8- $\mu\text{m}$  (4  $\mu\text{m}$  para cada lado desde el centro canalicular) perpendicular al canalículo. En hígado control, la fluorescencia asociada a los transportadores fue concentrada en el espacio canalicular. La deslocalización de los transportadores inducido por E17G de la membrana canalicular ( $P < 0.01$  versus control) fue detectado como una disminución de la intensidad de la fluorescencia alrededor al área canalicular conjuntamente con un aumento del a intensidad de fluorescencia a una mayor distancia del canalículo. Los perfiles de distribución de los hígados tratados con E17G+ICI fue similar al control indicando una disminución significativa de la internalización de Abcb11 y Abcc2 ( $P < 0.01$  versus E17G). ( $n = 20-50$  canalículos por preparación de tres preparaciones diferentes). El análisis estadístico de la distribución de los perfiles de ocludina usado para demarcar los límites del canalículo no mostró cambios en los diferentes tratamientos.

## **5-DISCUSIÓN**

### 5 Discusión.

En las últimas dos décadas, diferentes evidencias han aportado conocimientos que han ayudado a dilucidar cascadas de señalización en el fenómeno de colestasis (84;85;86;145;167). Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que PKC $\alpha$  participa en parte de la colestasis aguda inducida por E17G (84) y por el agente pro-oxidante *tert*-butil hidroperóxido (86). La activación de PKC $\alpha$  inducida por estos agentes colestásicos se correlaciona con su capacidad de inducir la internalización endocítica de transportadores canaliculares críticos para la secreción biliar, como lo son Abcb11 y Abcc2 (84;86). Estos hallazgos preliminares concuerdan con un trabajo que indica que la activación selectiva de PKC $\alpha$  por timoleatoxina induce tanto la colestasis como la internalización endocítica de Abcb11 (85).

Las acciones de PKC $\alpha$  en la colestasis aguda causada por E17G no podían explicar la totalidad de los fenómenos observados, indicando que otras vías de señalización podrían estar implicadas. Una de las vías de señalización candidata era la vía dependiente de PI3K. Sustentando esta hipótesis, Boaglio *et al* (83) mostraron por primera vez que E17G activa PI3K en el hígado, y que este evento está involucrado en el efecto colestásico del estrógeno. La vía de señalización PI3K participa también en la colestasis inducida por la sal biliar taurolitocolato (167) que exhibe marcadas similitudes fisiopatológicas con la causada por E17G. En ambos modelos (E17G y taurolitocolato) se ha observado la internalización endocítica de Abcb11 (81) y Abcc2 (77).

Recientemente, otros trabajos de nuestro grupo han demostrado en el modelo de colestasis aguda inducida por E17G provoca la activación de las distintas proteínas activadas por mitógenos, p38<sup>MAPK</sup>, ERK1/2<sup>MAPK</sup> y JNK1/2<sup>MAPK</sup> (168), evidenciada por el



## Discusión

---

aumento de su fosforilación, inducida por E17G en el modelo de hepatocitos aislados de rata. También en el mismo trabajo se demostró en DAHR, que la inhibición selectiva de  $p38^{MAPK}$  y  $ERK1/2^{MAPK}$ , no así la de  $JNK 1/2^{MAPK}$ , previene la alteración inducida por E17G tanto en la localización de Abcb11 y Abcc2 como en la secreción canalicular de sus sustratos fluorescentes.

Si bien hasta el momento se había vinculado a las MAPKs con fenómenos coleréticos y pro-insertores, la existencia de evidencia de entrecruzamientos con las vías de señalización de PKC $\alpha$  y PI3K (quinasas pro-colestásicas, ambas activadas por E17G) en distintos contextos experimentales y tipos celulares (169;170), incluidos hepatocitos (171) llevó a nuestro grupo a concluir que estos entrecruzamientos podrían resultar en efectos finales opuestos (colestásicos) de las MAPKs dependiendo de los agentes moduladores involucrados y el entorno celular en particular (168).

Otro hallazgo de nuestro grupo de trabajo ha sido la participación de GPR30 en el modelo de colestasis por E17G tanto en *in vitro* como *in vivo* mediante un aumento de AMPc y la subsiguiente activación de PKA indicando que este receptor participa en la alteración funcional que E17G induce sobre los transportadores canaliculares Abcc2 y Abcb11 (119). La acción de inhibidores de GPR30 y de Adenilato Ciclasa confirmaron que estas vías participan cascada arriba de PKA, lo cual concuerda con estudios previos donde se observó activación de PKA por activación de GPR30 con estradiol no conjugado (107). Sin embargo, la activación específica de GPR30 no mostró efectos colestásicos a pesar de lograr aumentar AMPc y activar PKA, indicando que la activación de esta vía es necesaria como ha ocurrido con los estudios de otras vías de señalización pero no suficiente para producir estas alteraciones.

## Discusión

---

A modo de síntesis, se ha descrito que E17G es capaz de activar las vías de PKC $\alpha$ , PI3K, MAPKs (p38<sup>MAPK</sup>, ERK1/2<sup>MAPK</sup>) y GPR30. Estas vías, fueron a su vez implicadas en la generación de la colestasis por el conjugado estrogénico en cuestión, ya que la inhibición de cada una de ellas tuvo efectos protectivos (83;84;119). Es de destacar, sin embargo, que la inhibición de las vías recién nombradas, con excepción de la vía iniciada en GPR30, condujo a una protección parcial, habiéndose descrito complementariedad y protección total en el caso de inhibición conjunta de PI3K-ERK1/2<sup>MAPK</sup> y PKC $\alpha$ -p38<sup>MAPK</sup>. A partir de los trabajos de Crocenzi *y col.* (84), Boaglio *y col.* (83;168) y Zucchetti *y col.* (119) se puede deducir la existencia de al menos dos vías de señalización necesarias para la colestasis: una que sería responsable del proceso que conduce a la desinserción de los transportadores canaliculares, y otra que sería necesaria para mantener a los transportadores desinsertados de la membrana canalicular.

Varios trabajos científicos han evidenciado que el estradiol no conjugado es capaz de activar varias vías de señalización inclusive las vías de señalización ya mencionadas anteriormente, estos estudios se han desarrollados en diferentes tipos de tejidos incluyendo células hepáticas (134;172). Estas activaciones en algunos casos fueron independientes al RE (tanto RE $\alpha$  como RE $\beta$ ) y en otros casos fueron dependientes de la activación de RE $\alpha$  (172) o por la activación del RE $\beta$ . Cabe destacar que RE $\beta$  no se expresa en el tejido hepático (173) debido a ello las conclusiones de los estudios realizados en esta Tesis se asignaron al RE $\alpha$ . Como ya hemos mencionado anteriormente este receptor cumple una función central tanto en los efectos citosólicos como en los efectos nucleares producidos por el estradiol. No existe evidencia alguna de la participación del receptor de estrógeno en la colestasis inducida por estradiol-17 $\beta$ -D-glucurónido y este trabajo de tesis ofrece una

## Discusión

---

primera visión del papel de este receptor en las alteraciones en la función de los transportadores canaliculares provocadas por el mismo.

En la primera parte del presente trabajo de Tesis reunimos evidencias que demuestran la participación del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G. En primer lugar, observamos que E17G activa RE $\alpha$ , en forma similar a como se ha observado con el estradiol no conjugado; esta activación se ha manifestado tanto en un modelo *in vitro* de colestasis aguda (Figura 4.1) como en un modelo *in vivo* de animal entero (Figura 4.17). Esta activación del RE $\alpha$  medida por la proporción de RE $\alpha$  fosforilada en la Ser-118 alcanza un máximo de activación a los 15 min en el modelo de cultivo primario de hepatocitos y a los 10 min en modelo de animal entero. Estas diferencias en los tiempos de activación pueden deberse a la diferencia inherente al modelo y además a que la evaluación fue desarrollada en diferentes fracciones celulares, fracción de membrana en el caso del modelo *in vitro* y homogenado en el modelo *in vivo*. También hay que tener en cuenta que la administración del E17G en estos dos modelos se efectúa de diferente manera, en un caso (hepatocitos), E17G está siempre presente, mientras que *in vivo*, E17G es excretado por bilis y deja de actuar.

Esta activación del RE $\alpha$  se ha involucrado en el desarrollo de la colestasis, la estrategia utilizada para demostrarlo fue utilizando el compuesto ICI182,780, también conocido comercialmente como Fulvestrant, el cual es un inhibidor total de RE $\alpha$  (sin actividad estrogénica) que es utilizado ampliamente en el tratamiento de cáncer de mama metastásico en mujeres postmenopáusicas con receptores hormonales positivos (145). El ICI 182,780 previno parcialmente la disminución en la actividad de Abcb11 y Abcc2 provocada por E17G en el modelo de DAHR en una amplia variedad de concentraciones

## Discusión

---

ensayadas salvo cuando se utilizó a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Figura 4.2). Se obtuvo una máxima protección para el rango de concentraciones de (0,1-1)  $\mu\text{M}$ ; para los estudios en los modelos *in vitro* se utilizó el ICI a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  debido a que era la concentración utilizada en la mayoría de la bibliografía, en tanto que para el modelo de HAPR se utilizó una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  por una cuestión meramente de costo económico, ya que se requiere una cantidad mucho mayor de ICI para los estudios en *in vivo* que en los estudios *in vitro*. De los experimentos de “concentración de E17G-respuesta” se puede mencionar que el ICI protegió en todos los rangos de E17G utilizados obteniéndose un CI50 de los tratamientos de E17G+ICI significativamente mayor que el CI50 para el tratamiento de E17G para ambos transportadores (Figura 4.3). Además ICI protegió de la deslocalización de los mismos inducida por E17G evaluado a través de las imágenes obtenidas por microscopia confocal (Figura 4.4). Las protecciones funcionales obtenidas para ambos transportadores fueron parciales y la protección de la deslocalización de los transportadores desde el canalículo fue total, estas diferencias puede deberse a que el transportador localizado en el canalículo no necesariamente tiene que ser funcional. Estos experimentos de localización de transportadores son compatibles con los experimentos de funcionalidad y este patrón discordante de protección parcial de la alteración en la actividad de transporte y protección total de la deslocalización de los transportadores en colestasis por E17G ya fue descripta previamente por nuestro grupo (83;84).

Por otro lado se ha desarrollado un modelo *in vitro* de hepatocitos de rata polarizado (cultivo primario de HRCS, ver Figura 2.3 y Figura 2.4), en el que se ha podido desarrollar la técnica de *knock-down* del REa (Figura 4.5 y Figura 4.6). Si bien la polarización se alcanza completamente a partir del quinto día de cultivo, se ha reportado que a partir de las 72 hs comienzan a formarse los primeros canalículos (174). Sobre la

## Discusión

---

técnica de *knock-down* puede mencionarse que de cuatro ARN de interferencia ensayado tanto a las 48 hs como a las 72 hs, sólo uno (el denominado siRNA1) produjo una disminución del RE $\alpha$  (Figura 4.5). Si bien al observar disminución a las 48 hs hubiéramos esperado que el *knock-down* se mantuviera a las 72 hs, estos resultados reflejan los complejos mecanismos de regulación de la transcripción que poseen las células como pueden ser las diferentes vidas medias de los transcritos primarios. El desarrollo de esta técnica permitió hacer un estudio de localización de los transportadores canaliculares en estudio, como el máximo efecto del *knock-down* del RE $\alpha$  fue a las 72 hs del cultivo primario de HRCS (48 hs post-transfección) estos estudios se realizaron en ese período de tiempo.

Las imágenes confocales obtenidas de los transportadores Abcc2 y Abcb11 proporcionaron la información de que el tratamiento con E17G a las células con *knock-down* para el RE $\alpha$  (Figura 4.7 y Figura 4.8) no se indujo deslocalización característica que se observa en las células tratadas con E17G que no fueron transfectadas. Cabe aclarar que en las células con *knock-down* del RE $\alpha$  también se observaron zonas con deslocalización de ambos transportadores aunque en menor proporción de las que se observaron en células no transfectadas. Estos resultados son lógicos dado que la disminución de la expresión de RE $\alpha$  del 50 % producida por los experimentos de *knock-down* representa un promedio de la expresión del RE $\alpha$  en células no transfectadas con la expresión disminuída del RE $\alpha$  en células transfectadas. Estos resultados fueron valiosos porque refuerzan la participación del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G, minimizando la probabilidad que las acciones de ICI182780 se deban a algún efecto inespecífico independiente de RE $\alpha$ , aun no descripto.

## Discusión

---

Esta protección tanto de alteraciones de la actividad como de la deslocalización de los transportadores no solo ha sido demostrada en un modelo *in vitro* como es el modelo de DAHR y validado por el modelo de cultivo primario de HRCS sino también se demostraron en un modelo más complejo y fisiológico como es el modelo de HAPR.

El rol del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G fue más evidente en el modelo de HAPR donde se observó que ICI protegió casi completamente del efecto producido por E17G sobre el flujo biliar (Figura 4.18A) y sobre la velocidad de excreción de sustratos de Abcc2 (DNF-G) (Figura 4.19A) y Abcb11 (TC) (Figura 4.19B). Aunque se observó una disminución leve pero significativa en los parámetros de velocidad de excreción de TC y DNF-G 10 min después de la administración de E17G en ratas tratadas con ICI 182,780 inmediatamente se produjo un efecto rebote y la velocidad de excreción de TC y el DNF-G fueron similares a las ratas control. La mayor prevención de la colestasis producida por ICI que se observó en HAPR con respecto al modelo de DAHR no es sorprendente ya que el bloqueo de otras vía de señalización como PKC $\epsilon$  y PI3K también fue más efectivo en HAPR que en DAHR (83;84). Las causas de esta diferencia no son claras, aunque indudablemente son inherentes a las diferentes características de los modelos experimentales. En el HAPR, la acción de E17G es transitoria ya que se administra una vez y es excretada a nivel canalicular, mientras que en DAHR el estrógeno está siempre presente y además, si bien es excretado a la vacuola canalicular, E17G queda retenido allí sin posibilidad de drenar al exterior como en el HAPR.

De estos experimentos de HAPR es interesante mencionar que aunque el E17G produce una disminución de la velocidad de excreción de DNF-G y TC (Figura 4.19 A y B) puede observarse que luego de los 10 min de haber administrado el E17G se observa

## Discusión

---

una recuperación de las mismas para ambos sustratos, haciéndose para el caso de la velocidad de excreción de DNF-G a partir de los 40 min similar (estadísticamente) al Control y al tratamiento con ICI (E17G+ICI). Esta recuperación no fue acompañada de una recuperación del flujo biliar como se podría pensar, este fenómeno puede deberse a que los agregado de sales biliares y CDNB son considerados trazas y que además el sistema de perfusión es un sistema abierto, ésta mejor funcionalidad de los transportadores no alcanza a crear una fuerza impulsora para la formación de bilis sumado a que también se ve afectada otros transportadores implicados en el FBiSB, como puede llegar a ser el transportador AE2.

Independientemente, se realizaron estudios de localización de los transportadores Abcb11 y Abcc2 en el modelo de HAPR en los que se observó al igual que en las imágenes obtenidas en el modelo de DAHR que el tratamiento con ICI previno de la deslocalización de los transportadores (Figura 4.19 y Figura 4.20) llevando una correlación con los resultados obtenidos en los modelos *in vivo*, tanto la activación del RE $\alpha$  en el modelo de animal entero como la recuperación del flujo biliar y la funcionalidad de los transportadores en el modelo de HAPR.

En un intento de esclarecer los mecanismos por los cuales el RE $\alpha$  participa en la colestasis por E17G y en vista que Boaglio y col (83) describieron que las vías de señalización de PI3K y PKC $\alpha$  actúan complementariamente en su participación de la colestasis por E17G debido a que la inhibición de ambas proteínas protege completamente las alteraciones en el transporte canalicular, en una segunda parte de esta tesis se estudió con cuales de estas vías de señalización el RE $\alpha$  estaría interactuando.

## Discusión

---

Los experimentos de coinhibición inhibiendo tanto PI3K (Wm 200 nM, máximo efecto) como el RE $\alpha$  (ICI 1  $\mu$ M, máximo efecto) en el modelo de DAHR resultaron aditivos (Figura 4.9 A y B) sugiriendo que tanto RE $\alpha$  como PI3K pertenecen a diferentes vías de señalización, mientras que la coinhibición de PKC $\epsilon$  (Gö6976 1 $\mu$ M, máximo efecto) y RE $\alpha$  (ICI 1  $\mu$ M, máximo efecto) no llevaron a una sumatoria de efectos (Figura 4.10 A y B) sugiriendo que ambas proteínas participan de una misma vía de señalización. El próximo paso del trabajo fue enfocarse en la activación temporal de PKC $\epsilon$  y RE $\alpha$ , mediante la combinación de la inhibición de una de las proteínas y la medición de la activación de la otra utilizando la técnica western blot. Los experimentos demostraron que la activación de PKC $\epsilon$ , en este caso PKC $\alpha$ , precede a la activación de RE $\alpha$  (Figura 4.11 y Figura 4.12). Estos resultados no estarían indicando que PKC $\alpha$  necesariamente estuviese fosforilando a RE $\alpha$ , sólo que PKC $\epsilon$  se activa antes que RE $\alpha$  pudiendo existir posiblemente otras moléculas de señalización intermediarias.

Estos resultados no serían los únicos que avalarían la activación independiente de ligando de receptores de esteroides ya que se han sido descrito trabajos en lo que se evidencia que diferentes clases de receptores (receptor de andrógenos, receptor de pregnanos) inducen actividad por la activación de vías de señalización independiente de ligando. El fenómeno de la activación independiente del ligando se conoció cuando se descubrió que el neurotransmisor dopamina, que señala a través de AMPc, puede activar tanto PR y RE $\alpha$ . El RE $\alpha$  también podría ser activado por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (175). Desde entonces, una gran variedad de señales que no funcionan como ligandos directos de estos receptores de esteroides, se ha demostrado que inducen la actividad transcripcional de cuatro receptores de esteroides sexuales, RE $\alpha$ , RE $\beta$ , PR, y receptor de andrógenos (176). Esto no descarta, en nuestro caso, que aunque la activación



## Discusión

---

de RE $\alpha$  (fosforilación en Ser-118) sea independiente de la unión a E17G, la unión con este sea necesaria para proseguir la vía cascada abajo del RE $\alpha$ .

Siguiendo con las evidencias obtenidas con nuestro grupo de trabajo se relacionó la participación de las vías de señalización PKC $\alpha$ -RE $\alpha$  con las vías de señalización descritas por Zucchetti *y col* (119). Debido a que evidencias previas la inhibición específica de GPR30 utilizando el compuesto G15 proporcionó altos porcentajes de prevención (alrededor del 90 %) no se utilizaron estudios de sumación de efectos en el DAHR ya que podrían llevar a conclusiones erróneas (dado que el valor máximo de protección es 100%, la ventana para observar sumación sería solo 10%, un valor demasiado bajo y que impediría obtener diferencias estadísticamente significativas) La metodología planteada para este punto de la Tesis fue el uso de inhibidores específicos (G15, DDA, ICI) en el modelo de cultivo primario de hepatocitos y estudiar la activación de las vías en cuestión. Tanto con G15 como cuando se utilizó DDA y se evaluó la activación de PKC $\alpha$  y RE $\alpha$  por E17G no se observó bloqueo de dicha activación. Esto llevaría a concluir que la activación de PKC $\alpha$  y RE $\alpha$  ocurre por vías de señalización independientes a las vías de señalización de GPR30/AC (Figura 4.14 y Figura 4.15).

Un punto de vista que no puede dejarse de lado es que si bien los tratamientos con la G15 y DDA no provocaron una disminución de la fosforilación en la Ser-118 RE $\alpha$  (Figura 4.14 B y Figura 4.15 B) no puede descartarse la fosforilación en otros aminoácidos. Por ejemplo Chen D *y col* (177) observó la fosforilación en la Ser-236 del RE $\alpha$  por medio de PKA, también Carascossa S *y col* (178) observó la fosforilación en la Ser-448 en células MCF7 y LCC2 por medio de la participación de PKA. Esto nos da una

## Discusión

---

idea de la posibilidad de que las vías de PKC $\epsilon$  y PKA actúen sinérgicamente sobre el RE $\alpha$  de una manera independiente de ligando. La actividad de PKA no activaría al RE de la forma clásica pero la fosforilación inducida por PKA podría condicionar las acciones cascada abajo de RE.

Por otro lado, cabe señalar que cuando se realizaron los estudios inversos es decir que se realizó el tratamiento de los hepatocitos con el ICI y se estudió como una medida de activación de la vía de señalización de GPR30/AC la actividad de PKA que es la quinasa efectora de esta vía en el modelo de colestasis por E17G (119), se obtuvo que la inhibición de RE $\alpha$  no afectaba la fosforilación del sustrato de PKA de 25 kDa, descrita como una de las bandas que responden al E17G, pero sí afectó la banda de 110 kDa, que es otra de las bandas descrita que responden al E17G (Figura 4.16). Una de las explicaciones posibles es que los niveles de fosforilación de los sustratos PKA (110 kDa y 25 kDa) sean el resultado de la fosforilación de PKA activados a diferentes niveles, el sustrato de 110 kDa requeriría que además de PKA participe alguna vía cascada abajo del RE $\alpha$  mientras que para la fosforilación del sustrato de 25 kDa se requeriría solo la activación de la vía GPR30/AC/PKA, independiente de RE $\alpha$ . No debe descartarse tampoco que alguno de los sustratos fosforilados de PKA, ya sea el de 110 kDa que responde a los tratamientos con ICI o el de 25 kDa que no responde, no participe de las vías de señalización implicadas en la colestasis ya que las acciones de E17G son múltiples y no todas conducen a la desinserción de transportadores.

Los eventos de fosforilación-desfosforilación de proteínas ocurren a través de una serie de regulación no sólo de kinasas sino también de la regulación de fosfatasas. Por este motivo, otra explicación posible es que en la regulación de la fosforilación del sustrato de

## Discusión

---

110 kDa, que es fosforilado por PKA, la fosfatasa involucrada sea inhibida mientras RE $\alpha$  se mantenga activa, por algún efector cascada abajo de RE $\alpha$ . Existe evidencia que vincula a RE $\alpha$  con fosfatasas con la salvedad de que generalmente se observado la activación de las mismas, se puede mencionar que Tan *y col* han reportado que la Striatina-3 $\gamma$  se asocia al RE $\alpha$  de una manera dependiente de ligando en un sistema híbrido de levaduras, la Striatina-3 $\gamma$  es una proteína de anclaje que reclutaría a la proteína fosfatasa PP2A y en este caso PP2A desfosforilaría el fosfato de la Ser-118 del RE $\alpha$ . (179). Por otro lado He *y col* han descrito que la asociación del RE $\alpha$  y la tirosina fosfatasa SH2 aumenta con el tratamiento del estradiol no conjugado y participa del control del balance de energía en ratones transgénicos (180). Si bien no hay evidencias en la literatura sobre inhibición de fosfatasas mediadas por RE $\alpha$ , es una posibilidad ya que Hu *y col* describieron que la quinasa Src inhibe a PP2A en cerebro (181) y se sabe que esta quinasa es activada cascada abajo de RE $\alpha$  (182). En esta situación en particular, lo que puede estar ocurriendo con el sustrato de 110 kDa sería que, en condiciones normales, el sustrato fosforilado por PKA sería desfosforilado con rapidez pero cuando se activa RE $\alpha$  la fosfatasa se inhibiría y el sustrato permanecería fosforilado.

Por otro lado, retomando al punto de la fosforilación de RE $\alpha$ , varios grupos de investigación han demostrado en un número de tipos celulares diferentes que en respuesta al estradiol no conjugado, el RE $\alpha$  sufre fosforilaciones en serinas ubicadas en diferentes posición de la cadena de aminoácidos (138). Las serinas en la posición 104, 106 y 118 son altamente conservadas y fueron identificadas a sufrir fosforilaciones identificándose la fosforilación en la Ser-118 como una activación del receptor de estrógeno (183).

## Discusión

---

Dado que las quinasas tienen mayor espectro de sustrato en los modelos *in vitro* que en los modelos *in vivo*, es difícil determinar el rol fisiológico de estas fosforilaciones del RE $\alpha$ , basado solamente en modelos *in vitro*, y determinar qué quinasa cumple la función de fosforilar al RE $\alpha$  (138).

Entre las quinasas que pueden fosforilar al RE $\alpha$  (139), conocidas hasta el momento, si bien muchas tienen que ver con acciones nucleares (quinasas dependientes de ciclinas, quinasas dependientes de ADN, etc), se destacan la GSK-3 $\beta$  (140) y la quinasa activada por mitógenos p38<sup>MAPK</sup> (141). En concordancia con este hecho, Goode *y col* demostraron que PKC $\epsilon$  podría fosforilar a GSK-3 $\beta$  (184). Otro posible intermediario blanco de PKC $\epsilon$  podrían ser las MAPK las cuales también han sido señaladas para fosforilar la Ser-118 del RE $\alpha$  (185).

Existen varias potenciales explicaciones para la fosforilación del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G. En primer lugar podría tratarse de que PKC fosforile una fosfatasa, activándola, y que esta fosfatasa desfosforile GSK-3 $\beta$ . Como ejemplo, Calcineurina puede desfosforilar GSK-3 $\beta$  (186) y esta proteína interacciona con PKC a nivel de AKAP79 (187). Por otro lado, Medunjanin *y col* han reportado que GSK3 $\beta$  y RE $\alpha$  forman un complejo interactuando ambas proteínas, es probable que el desarmado de este complejo influya en la fosforilación de GSK3 $\beta$  (140). En este sentido, la proteína quinasa p38<sup>MAPK</sup> podría fosforilar al RE $\alpha$  aunque se ha reportado esta fosforilación es en una Thr-311 y no en la Ser-118 (188). Sin embargo, esta fosforilación podría favorecer la unión de otras quinasas que posibiliten la fosforilación en la Ser-118. Como se mencionó p38<sup>MAPK</sup> es fosforilado cascada abajo de PKC $\epsilon$  luego de la acción de E17G (83).

## Discusión

---

Si bien el pensamiento inicial proponía una secuencia de activación diferente, es decir que el E17G se uniera al RE $\alpha$  y luego se active PKC $\epsilon$  o por otro lado que GPR30 fuese de la misma vía de señalización, los datos presentados llevan a un pensamiento completamente alternativo es decir la activación del receptor de estrógeno por E17G requiere la activación de la PKC $\epsilon$  y que además la activación de RE $\alpha$  es independiente a la activación de GPR30, otro receptor de estrógeno localizado en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico que se ha implicado recientemente en colestasis inducida por E17G, llevando a formular una de las cuestiones fundamentales ¿Cuál sería el receptor inicial de E17G? Un posible mecanismo es que E17G se una primero tanto al RE $\alpha$  como al receptor GPR30, entonces el complejo RE-E17G active la PKC $\epsilon$  y finalmente PKC por sí mismo o por medio de una quinasa intermedia fosforee al RE $\alpha$ . Otro posible mecanismo que no puede ser descartado es que PKC $\epsilon$  actúe como el receptor de unión inicial de E17G, que conduzca a su activación y a la fosforilación posterior de RE $\alpha$  provocando una activación independiente de ligando. Siguiendo esta línea, Alzamora R y col han demostrado la activación directa de la PKC $\alpha$  por concentraciones fisiológicas (aproximadamente 0.1-0.5 nM) de aldosterona y 17- $\beta$ -estradiol, y la activación directa de PKC $\delta$  por 17- $\beta$ -estradiol (189). Las principales conclusiones de estos estudios fueron que la unión directa de aldosterona y 17- $\beta$ -estradiol a determinadas isoformas de PKC (PKC $\alpha$  y PKC $\delta$ ) dispara señales de fosforilación, sugiriendo que PKC $\alpha$  y PKC $\delta$  pueden servir como receptores de aldosterona y 17- $\beta$ -estradiol, proporcionando un nuevo mecanismo para efectos rápidos producidos por estas hormonas.

El mecanismo por el cual la activación del RE $\alpha$  conduce a la desinserción endocítica de los transportadores no puede deducirse de los resultados presentados en esta Tesis. El RE $\alpha$  como se mencionó anteriormente puede activar vías de señalización

## Discusión

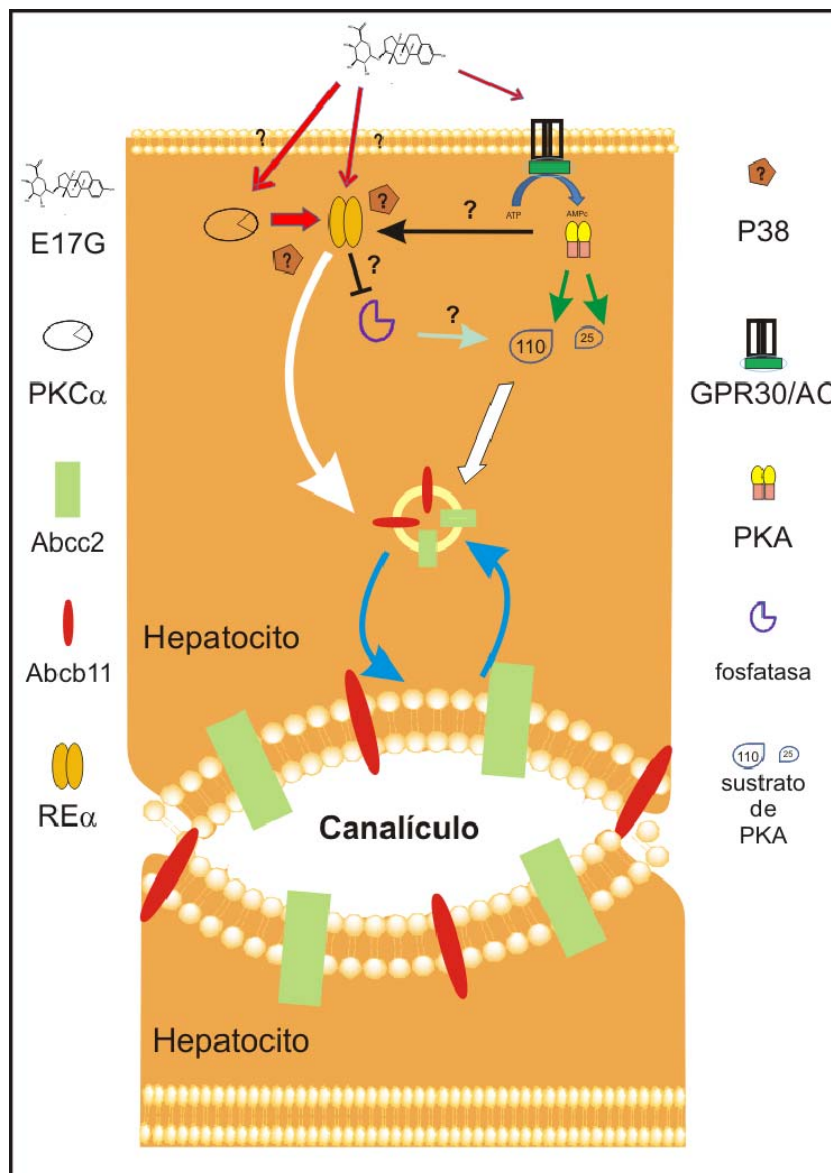
---

nucleares y vías de señalización citoplasmáticas. El papel de los efectos genómicos no puede descartarse, sin embargo, según los conocimientos actuales del período de tiempo requerido para la síntesis de proteínas parece superar el tiempo empleado por E17G para ejercer sus efectos colestásicos. Los efectos citoplasmáticos en los que participa el RE $\alpha$  parecen ser los más probables. El receptor de estrógeno unido a la membrana plasmática se sabe que interactúa con la membrana y con las proteínas citoplasmáticas adaptadoras incluyendo caveolinas, striatina, p130Cas, Shc, HPIP, MTA-1s, y MNAR / PELP-1, estas son proteínas de anclajes encargadas de regular los complejos proteicos que controlan la migración y la quimiotaxis, apoptosis, ciclo celular, diferenciación, y homeostasis (182). A través de la interacción con estas proteínas, el RE $\alpha$  activa vías de señalización tales como Src/MAPK y PI3K/Akt. Si bien debido a la evidencia presentada en este trabajo de Tesis esta última interacción es poco probable ya que RE $\alpha$  y PI3K actuarían por vías de señalización independientes, sin embargo, las vías de señalización de las MAPKs son vías de señalización que pueden continuar con la cascada de activación de proteínas que conduzcan a la internalización endocítica de los transportadores canaliculares responsables de la secreción de sustratos para la formación de la bilis. Tampoco puede ser descartada la posibilidad que además de vías de señalización de quinasas sean activadas vías de señalización de fosfoesterasas, tales como PP1, PP2A, MKP1, MKP3, etc; (ver Figura 5.1).

Los presentes resultados ayudan a consolidar el concepto de que el fenómeno colestásico agudo puede ser causado por un desbalance entre vías de señalización intracelulares y no necesariamente por la acción directa de un compuesto colestásico sobre estructuras hepatocelulares relevantes a la formación de bilis. De una manera reflexiva me gustaría mencionar también que los resultados presentados dan ejemplos de los maravillosos resultados de la evolución debido a que las vías de señalización existentes en

## Discusión

las células como es sabido fueron el resultado de una presión evolutiva dando prevalencia a las vías de señalización más aptas y beneficiosas sin importarles a los sistemas biológicos (células), desde un punto de vista del pensamiento humano (la ciencia), si estas vías eran las vías más sencillas (o sea simples), complejas o si implicaban un mayor gasto de energía.



**Figura 5.1. Modelo propuesto de la participación del RE $\alpha$  en la colestasis por E17G.** El E17G produce desinserción de transportadores de la membrana apical hacia vesículas subapicales y compartimentos endosomales lejanos activando varias vías de señalización, una de ellas es la del RE $\alpha$  que se activaría posteriormente a la activación de PKC $\alpha$ .

## **6-CONCLUSIÓN**



### **6 Conclusión.**

La acción colestásica del E17G provoca un desbalance entre la desinserción endocítica y la reinserción exocítica de transportadores canaliculares. Este desbalance está relacionado con la activación de determinadas vías de señalización intracelular. Existen tanto vías de señalización que promueven la desinserción como vías que favorecen a la reinserción de transportadores. Los resultados de esta Tesis han demostrado la participación del RE $\alpha$  dentro de las vías que promueven la desinserción de transportadores canaliculares Abcc2 y Abcb11 inducida por E17G, es decir, juega un rol en la colestasis por estrógenos.

A pesar que la interacción entre un derivado estrogénico como el E17G y un receptor estrogénico (RE $\alpha$ ) puede parecer natural, era necesario conocer el rol del RE $\alpha$  ya que el objetivo final es develar las vías de señalización involucradas en colestasis. Muchas moléculas de señalización pueden actuar antes o después de RE $\alpha$ . A partir de experimentos realizados en esta tesis, se pudo colocar a esta proteína en una de las vías de señalización que conducen a las colestasis por estrógeno descriptas hasta el momento.

El E17G primero activa PKC $\epsilon$ , una de las vías de señalización implicadas en la desinserción endocítica de transportadores canaliculares, entonces esta proteína *per se* o probablemente a través de otra proteína de señalización intermediaria activa a RE $\alpha$  que finalmente lleva a la desinserción de transportadores mediante la activación de mediadores desconocidos hasta el momento. Si no se tuviera en cuenta al RE $\alpha$  o se lo considerara una unión obvia sin más estudio se podría concluir erróneamente que PKC cumple un rol en la desinserción de transportadores en lugar de concluir que la desinserción es cascada abajo

## Conclusión

---

de PKC via RE $\alpha$ .

Otros experimentos demostraron que la vía de señalización que involucra a PI3K, que es la responsable de mantener los transportadores canaliculares desinsertados al igual que la vía que involucra a GPR30/AC/PKA, serían independiente de la activación del RE en la colestasis producida por E17G por lo que se concluye que las acciones colestásicas de E17G requieren que el estrógeno active varias vías simultáneamente.

## **BIBLIOGRAFÍA**

# Bibliografía

---

## Bibliografía

1. Tso,P. y McGill,J. (2003). The Physiology of the Liver. In: Medical Physiology, ed. R.A.Rhoades y G.A.TannerPhiladelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 514-516.
2. Hooiveld,G.J., van Montfoort,J.E., Meijer,D.K., y Muller,M. (2001). Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 525-543.
3. Tsuboi,K., Tazuma,S., Nishioka,T., y Chayama,K. (2004). Partial characterization of cytoprotective mechanisms of lecithin against bile salt-induced bile duct damage. *J Gastroenterol.* 39, 955-960.
4. Anderson,J.M. (1993). Hepatocyte tight junctions in health and disease. *Prog. Liver Dis.* 11, 45-68.
5. Kalaany,N.Y. y Mangelsdorf,D.J. (2006). LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol* 68, 159-191.
6. Chiang,J.Y. (2004). Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J. Hepatol.* 40, 539-551.
7. Alnouti,Y. (2009). Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol. Sci.* 108, 225-246.
8. Sperber,I. (1959). Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharmacol. Rev.* 11, 109-134.
9. Brauer,R.W., Leong,G.F., y Holloway,R.J. (1954). Mechanisms of bile secretion: Effect of perfusion pressure and temperature on bile flow and bile secretion pressure. *Am J Physiol* 177, 103-112.
10. Huebert,R.C., Splinter,P.L., Garcia,F., Marinelli,R.A., y LaRusso,N.F. (2002). Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *J Biol Chem* 277, 22710-22717.
11. Jessner,W., Zsembery,A., y Graf,J. (2008). Transcellular water transport in hepatobiliary secretion and role of aquaporins in liver. *Wien. Med Wochenschr.* 158, 565-569.
12. Marinelli,R.A., Tietz,P.S., Caride,A.J., Huang,B.Q., y LaRusso,N.F. (2003). Water transporting properties of hepatocyte basolateral and canalicular plasma membrane domains. *J Biol. Chem.* 278, 43157-43162.
13. Larocca,M.C., Soria,L.R., Espelt,M.V., Lehmann,G.L., y Marinelli,R.A. (2009). Knockdown of hepatocyte aquaporin-8 by RNA interference induces defective bile canalicular water transport. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 296, G93-100.

## Bibliografía

---

14. Marinelli,R.A. y LaRusso,N.F. (1996). Solute and water transport pathways in cholangiocytes. *Semin. Liver Dis.* 16, 221-229.
15. Kullak-Ublick,G.A., Baretton,G.B., Oswald,M., Renner,E.L., Paumgartner,G., y Beuers,U. (2002). Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Res.* 23, 78-82.
16. Kullak-Ublick,G.A., Beuers,U., y Paumgartner,G. (2000). Hepatobiliary transport. *J. Hepatol.* 32 *Suppl 1*, 3-18.
17. Kullak-Ublick,G.A., Stieger,B., Hagenbuch,B., y Meier,P.J. (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin. Liver Dis.* 20, 273-292.
18. Borst,P. y Elferink,R.O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-592.
19. Gatmaitan,Z.C. y Arias,I.M. (1995). ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol. Rev.* 75, 261-275.
20. Gerloff,T., Stieger,B., Hagenbuch,B., Madon,J., Landmann,L., Roth,J., Hofmann,A.F., y Meier,P.J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273, 10046-10050.
21. Arrese,M. y Ananthanarayanan,M. (2004). The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *Pflugers Arch.* 449, 123-131.
22. Akita,H., Suzuki,H., Ito,K., Kinoshita,S., Sato,N., Takikawa,H., y Sugiyama,Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim. Biophys. Acta* 1511, 7-16.
23. Kullak-Ublick,G.A., Ismail,M.G., Stieger,B., Landmann,L., Huber,R., Pizzagalli,F., Fattinger,K., Meier,P.J., y Hagenbuch,B. (2001). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120, 525-533.
24. Pourahmad,J., Ross,S., y O'Brien,P.J. (2001). Lysosomal involvement in hepatocyte cytotoxicity induced by Cu(2+) but not Cd(2+). *Free Radic. Biol. Med.* 30, 89-97.
25. Yang,B. y Hill,C.E. (2001). Nifedipine modulation of biliary GSH and GSSG/conjugate efflux in normal and regenerating rat liver. *Am J Physiol* 281, G85-G94.
26. Ballatori,N. y Truong,A.T. (1992). Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 263, G617-G624.
27. Crocenzi,F., Mottino,A., y Roma,M. (2004). Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis: Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr Med Chem* 11, 501-524.

## Bibliografía

---

28. Esteller,A. (2008). Physiology of bile secretion. *World J. Gastroenterol.* *14*, 5641-5649.
29. Gatmaitan,Z.C., Nies,A.T., y Arias,I.M. (1997). Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am J Physiol* *272*, G1041-G1049.
30. Trauner,M., Fickert,P., y Wagner,M. (2007). MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Semin. Liver Dis.* *27*, 77-98.
31. Muller,M. y Jansen,P.L. (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* *272*, G1285-G1303.
32. Klaassen,C.D. y Aleksunes,L.M. (2010). Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* *62*, 1-96.
33. Wittenburg,H. y Carey,M.C. (2002). Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin. Invest* *110*, 605-609.
34. Roma,M.G., Crocenzi,F.A., y Sanchez Pozzi,E.A. (2008). Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin. Sci. (Lond)* *114*, 567-588.
35. Calamita,G., Mazzone,A., Bizzoca,A., Cavalier,A., Cassano,G., Thomas,D., y Svelto,M. (2001). Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *Eur. J. Cell Biol.* *80*, 711-719.
36. Elkjaer,M., Vajda,Z., Nejsun,L.N., Kwon,T., Jensen,U.B., Amiry-Moghaddam,M., Frokiaer,J., y Nielsen,S. (2000). Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *276*, 1118-1128.
37. Garcia,F., Kierbel,A., Larocca,M.C., Gradilone,S.A., Splinter,P., LaRusso,N.F., y Marinelli,R.A. (2001). The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J Biol Chem* *276*, 12147-12152.
38. Banales,J.M., Prieto,J., y Medina,J.F. (2006). Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World J. Gastroenterol.* *12*, 3496-3511.
39. Cosentino,C. y col. (2007). p85 regulatory subunit of PI3K mediates cAMP-PKA and estrogens biological effects on growth and survival. *Oncogene* *26*, 2095-2103.
40. Kagawa,T., Misra,S., Varticovski,L., y Arias,I.M. (2000). The mechanism whereby cAMP activates PI 3-kinase which regulates canalicular spgp. *Hepatology* *32*, 306A.
41. Soria,L.R., Gradilone,S.A., Larocca,M.C., y Marinelli,R.A. (2009). Glucagon induces the gene expression of aquaporin-8 but not that of aquaporin-9 water channels in the rat hepatocyte. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* *296*, R1274-R1281.

## Bibliografía

---

42. Webster,C.R. y Anwer,M.S. (1999). Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am. J Physiol* 277, G1165-G1172.
43. Kipp,H., Pichetshote,N., y Arias,I.M. (2001). Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem* 276, 7218-7224.
44. Kipp,H. y Arias,I.M. (2000). Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem* 275, 15917-15925.
45. Misra,S., Ujhazy,P., Gatmaitan,Z., Varticovski,L., y Arias,I.M. (1998). The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem* 273, 26638-26644.
46. Wakabayashi,Y., Dutt,P., Lippincott-Schwartz,J., y Arias,I.M. (2005). Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
47. Kipp,H. y Arias,I.M. (2002). Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu. Rev. Physiol* 64, 595-608.
48. Soroka,C.J., Pate,M.K., y Boyer,J.L. (1999). Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J Biol Chem* 274, 26416-26424.
49. Sai,Y., Nies,A.T., y Arias,I.M. (1999). Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J. Cell Sci.* 112, 4535-4545.
50. Wakabayashi, Y. y Arias, I. M. (2000). Microtubular dependent apical recycling of sister of P-glycoprotein (SPGP) in polarized WIF-B9 hepatocytes. *Hepatology* 32, 435A.
51. Wakabayashi, Y. y Arias, I. M. (2001). Microtubular-dependent bidirectional trafficking of Bsep in polarized WIF-B9 cells. *Hepatology* 34, 259A.
52. Rahner,C., Stieger,B., y Landmann,L. (2000). Apical endocytosis in rat hepatocytes In situ involves clathrin, traverses a subapical compartment, and leads to lysosomes. *Gastroenterology* 119, 1692-1707.
53. Lam,P., Xu,S., Soroka,C.J., y Boyer,J.L. (2012). A c-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology* 6, 1901-1910.
54. Roelofsen,H., Soroka,C.J., Keppler,D., y Boyer,J.L. (1998). Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J. Cell Sci.* 111, 1137-1145.

## Bibliografía

---

55. Roma, M.G., Milkiewicz, P., Elias, E., y Coleman, R. (2000). Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocyte couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology* 32, 1342-1356.
56. García, C. (2006). Fisiopatología de la colestasis. *Med Int Mex* 22, 411-421.
57. Shaffer, E.A. (2002). Cholestasis: the ABCs of cellular mechanisms for impaired bile secretion--transporters and genes. *Can. J. Gastroenterol.* 16, 380-389.
58. Wakabayashi, Y., Kipp, H., y Arias, I.M. (2006). Transporters on demand: intracellular reservoirs and cycling of bile canalicular ABC transporters. *J. Biol. Chem.* 281, 27669-27673.
59. Chitturi, S. y Farrell, G.C. (2001). Drug-induced cholestasis. *Semin. Gastrointest. Dis.* 12, 113-124.
60. Dourakis, S.P. y Tolis, G. (1998). Sex hormonal preparations and the liver. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* 3, 7-16.
61. Schreiber, A.J. y Simon, F.R. (1983). Estrogen-induced cholestasis: clues to pathogenesis and treatment. *Hepatology* 3, 607-613.
62. Bossard, R., Stieger, B., O'Neill, B., Fricker, G., y Meier, P.J. (1993). Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest* 91, 2714-2720.
63. Lee, J.M., Trauner, M., Soroka, C.J., Stieger, B., Meier, P.J., y Boyer, J.L. (2000). Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 118, 163-172.
64. Simon, F.R., Fortune, J., Iwahashi, M., Gartung, C., Wolkoff, A.W., y Sutherland, E. (1996). Ethinylestradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters. *Am J Physiol* 271, G1043-G1052.
65. Trauner, M., Arrese, M., Soroka, C.J., Ananthanarayanan, M., Koeppl, T.A., Schlosser, S.F., Suchy, F.J., Keppler, D., y Boyer, J.L. (1997). The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 113, 255-264.
66. Geier, A., Dietrich, C.G., Gerloff, T., Haendly, J., Kullak-Ublick, G.A., Stieger, B., Meier, P.J., Matern, S., y Gartung, C. (2003). Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1609, 87-94.
67. Alvaro, D., Gigliozzi, A., Piat, C., Carli, L., Fraioli, F., Romeo, R., Francia, C., y et al (1997). Inhibition of biliary bicarbonate secretion in ethinylestradiol-induced cholestasis is not associated with impaired activity of the  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger in the rat. *J. Hepatol.* 26, 146-157.



## Bibliografía

---

68. Bouchard,G., Yousef,I.M., y Tuchweber,B. (1994). Decreased biliary glutathione content is responsible for the decline in bile salt-independent flow induced by ethinylestradiol in rats. *Toxicol. Lett.* 74, 221-233.
69. Elias,E., Iqbal,S., Knutton,S., Hickey,A., y Coleman,R. (1983). Increased tight junction permeability: a possible mechanism of oestrogen cholestasis. *Eur J Clin Invest* 13, 383-390.
70. Forker,E.L. (1969). The effect of estrogen on bile formation in the rat. *J Clin Invest* 48, 654-663.
71. Crocenzi,F.A., D'Andrea,V., Catania,V.A., Luquita,M.G., Pellegrino,J.M., Ochoa,J.E., Mottino,A.D., y Sanchez Pozzi,E.J. (2005). Prevention of Mrp2 activity impairment in ethinylestradiol-induced cholestasis by ursodeoxycholate in the rat. *Drug Metab Dispos.* 33, 888-891.
72. Sanchez Pozzi,E.J., Crocenzi,F.A., Pellegrino,J.M., Catania,V.A., Luquita,M.G., Roma,M.G., Rodriguez Garay,E.A., y Mottino,A.D. (2003). Ursodeoxycholate reduces ethinylestradiol glucuronidation in the rat: role in prevention of estrogen-induced cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 279-286.
73. Vore,M., Hadd,H., y Slikker,W.Jr. (1983). Ethinylestradiol-17  $\beta$  D-ring glucuronide conjugates are potent cholestatic agents in the rat. *Life Sci.* 32, 2989-2993.
74. Yamamoto,Y., Moore,R., Hess,H.A., Guo,G.L., Gonzalez,F.J., Korach,K.S., Maronpot,R.R., y Negishi,M. (2006). Estrogen receptor alpha mediates 17 $\alpha$ -ethinylestradiol causing hepatotoxicity. *J. Biol. Chem.* 281, 16625-16631.
75. Marino,M., Distefano,E., Pallottini,V., Caporali,S., Bruscalupi,G., y Trentalance,A. (2001). Activation of IP(3)-protein kinase C-alpha signal transduction pathway precedes the changes of plasma cholesterol, hepatic lipid metabolism and induction of low-density lipoprotein receptor expression in 17-beta-oestradiol-treated rats. *Exp. Physiol* 86, 39-45.
76. Vore,M., Liu,Y., y Huang,L. (1997). Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug. Metabol. Rev.* 29, 183-203.
77. Mottino,A.D., Cao,J., Veggi,L.M., Crocenzi,F.A., Roma,M.G., y Vore,M. (2002). Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* 35, 1409-1419.
78. Mottino,A.D., Crocenzi,F.A., Pozzi,E.J., Veggi,L.M., Roma,M.G., y Vore,M. (2005). Role of microtubules in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced alteration of canalicular Mrp2 localization and activity. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 288, G327-G336.
79. Huang,L., Smit,J.W., Meijer,D.K.F., y Vore,M. (2000). Mrp2 is essential for estradiol 17- $\beta$ ( $\beta$ -D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology* 32, 66-72.

## Bibliografía

---

80. Stieger,B., Fattinger,K., Madon,J., Kullak-Ublick,G.A., y Meier,P.J. (2000). Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118, 422-430.
81. Crocenzi,F.A., Mottino,A.D., Cao,J., Veggi,L.M., Sanchez Pozzi,E.J., Vore,M., Coleman,R., y Roma,M.G. (2003). Estradiol-17- $\beta$ D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G449-G459.
82. Beuers,U., Nathanson,M.H., Isales,C.M., y Boyer,J.L. (1993). Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca<sup>++</sup> mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 92, 2984-2993.
83. Boaglio,A.C., Zucchetti,A.E., Sanchez Pozzi,E.J., Pellegrino,J.M., Ochoa,J.E., Mottino,A.D., Vore,M., Crocenzi,F.A., y Roma,M.G. (2010). Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is involved in estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis: complementarity with classical protein kinase C. *Hepatology* 52, 1465-1476.
84. Crocenzi,F.A., Sanchez Pozzi,E.J., Ruiz,M.L., Zucchetti,A.E., Roma,M.G., Mottino,A.D., y Vore,M. (2008). Ca(2+)-dependent protein kinase C isoforms are critical to estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in the rat. *Hepatology* 48, 1885-1895.
85. Kubitz,R., Saha,N., Kuhlkamp,T., Dutta,S., vom Dahl,S., Wettstein,M., y Haussinger,D. (2004). Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C-isoforms induce cholestasis in rat liver. *J. Biol. Chem.* 279, 10323-10330.
86. Perez,L.M., Milkiewicz,P., Ahmed-Choudhury,J., Elias,E., Ochoa,J.E., Sanchez Pozzi,E.J., Coleman,R., y Roma,M.G. (2006). Oxidative stress induces actin-cytoskeletal and tight-junctional alterations in hepatocytes by a Ca<sup>2+</sup> -dependent, PKC-mediated mechanism: protective effect of PKA. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 2005-2017.
87. Breitkreutz,D., Braiman-Wiksmann,L., Daum,N., Denning,M.F., y Tennenbaum,T. (2007). Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res. Clin. Oncol.* 133, 793-808.
88. Newton,A.C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370, 361-371.
89. Swannie,H.C. y Kaye,S.B. (2002). Protein kinase C inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.* 4, 37-46.
90. Geraldés,P. y King,G.L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ. Res.* 106, 1319-1331.
91. Martiny-Baron,G., Kazanietz,M.G., Mischak,H., Blumberg,P.M., Kochs,G., Hug,H., Marme,D., y Schachtele,C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* 268, 9194-9197.
92. Hirsch,E., Costa,C., y Ciruolo,E. (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol.* 194, 243-256.

## Bibliografía

---

93. Marone,R., Cmiljanovic,V., Giese,B., y Wymann,M.P. (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 159-185.
94. Domin,J., Gaidarov,I., Smith,M.E., Keen,J.H., y Waterfield,M.D. (2000). The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2alpha is concentrated in the trans-Golgi network and present in clathrin-coated vesicles. *J Biol. Chem.* 275, 11943-11950.
95. Herman,P.K., Stack,J.H., y Emr,S.D. (1992). An essential role for a protein and lipid kinase complex in secretory protein sorting. *Trends Cell Biol.* 2, 363-368.
96. Murray,J.T., Panaretou,C., Stenmark,H., Miaczynska,M., y Backer,J.M. (2002). Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic.* 3, 416-427.
97. Powis,G. y *col.* (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* 54, 2419-2423.
98. Newton,A.C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev.* 101, 2353-2364.
99. Kubitz,R., Huth,C., Schmitt,M., Horbach,A., Kullak-Ublick,G., y Haussinger,D. (2001). Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* 34, 340-350.
100. Beene,D.L. y Scott,J.D. (2007). A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 192-198.
101. Tasken,K. y Aandahl,E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 84, 137-167.
102. Taylor,S.S., Buechler,J.A., y Yonemoto,W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem* 59, 971-1005.
103. Baillie,G.S. y Houslay,M.D. (2005). Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 129-134.
104. Conti,M. y Beavo,J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 481-511.
105. Aronica,S.M., Kraus,W.L., y Katzenellenbogen,B.S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 8517-8521.
106. Prossnitz,E.R. y Maggiolini,M. (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol. Cell Endocrinol.* 308, 32-38.

## Bibliografía

---

107. Hsieh, Y.C., Yu, H.P., Frink, M., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., y Chaudry, I.H. (2007). G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage. *Am. J. Pathol.* *170*, 1210-1218.
108. Wang, H.H., Liu, M., Clegg, D.J., Portincasa, P., y Wang, D.Q. (2009). New insights into the molecular mechanisms underlying effects of estrogen on cholesterol gallstone formation. *Biochim. Biophys. Acta* *1791*, 1037-1047.
109. Dennis, M.K. y col. (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 421-427.
110. Corbin, J.D., Soderling, T.R., y Park, C.R. (1973). Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J. Biol. Chem.* *248*, 1813-1821.
111. Corbin, J.D. y Keely, S.L. (1977). Characterization and regulation of heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase isozymes. *J. Biol. Chem.* *252*, 910-918.
112. Potter, R.L. y Taylor, S.S. (1979). Relationships between structural domains and function in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* *254*, 2413-2418.
113. Corbin, J.D., Keely, S.L., y Park, C.R. (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *J. Biol. Chem.* *250*, 218-225.
114. Reimann, E.M., Brostrom, C.O., Corbin, J.D., King, C.A., y KREBS, E.G. (1971). Separation of regulatory and catalytic subunits of the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase(s) of rabbit skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *42*, 187-194.
115. Scott, J.D. (1991). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol. Ther.* *50*, 123-145.
116. Tasken, K., Skalhegg, B.S., Solberg, R., Andersson, K.B., Taylor, S.S., Lea, T., Blomhoff, H.K., Jahnsen, T., y Hansson, V. (1993). Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J. Biol. Chem.* *268*, 21276-21283.
117. Kopperud, R., Christensen, A.E., Kjarland, E., Viste, K., Kleivdal, H., y Doskeland, S.O. (2002). Formation of inactive cAMP-saturated holoenzyme of cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* *277*, 13443-13448.
118. Stokka, A.J., Mosenden, R., Ruppelt, A., Lygren, B., y Tasken, K. (2010). The adaptor protein EBP50 is important for localization of the protein kinase A-Ezrin complex in T-cells and the immunomodulating effect of cAMP. *Biochem. J* *425*, 381-388.

## Bibliografía

---

119. Zucchetti, A., Barosso, I., Boaglio, A., Ochoa, J., Davio, C., Roma, M., Crocenzi, F., y Sanchez Pozzi, E. (2012). Role of GPR30-adenylyl cyclase (AC)-PKA pathway in estradiol 17 $\beta$ -glucuronide (E17G)-induced cholestasis in isolated rat hepatocytes couplets (IRHC) and isolated perfused rat liver (IPRL). *J Hepatol* 56, S144.
120. Howe, C.J., Lahair, M.M., McCubrey, J.A., y Franklin, R.A. (2004). Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol. Chem.* 279, 44573-44581.
121. Zucchetti, A.E., Toledo, F.D., Barosso, I.R., Crocenzi, F.A., y Sanchez-Pozzi, E.J. (2010). Role of Calcium-calmoduline pathway in estradiol-17- $\beta$ -D-glucuronide induced impairment of canalicular secretion in isolated rat hepatocyte couplet. *J Hepatol* 52, 386.
122. Jensen, E.V. y Jacobsen, H.I. (1962). Basic Guides to the Mechanism of Estrogen Action. In: *Rec Prog Horm Res* 387-414.
123. Chamness, G.C. y McGuire, W.L. (1972). Estrogen receptor in the rat uterus. Physiological forms and artifacts. *Biochemistry* 11, 2466-2472.
124. Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., y Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154.
125. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., y Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 5925-5930.
126. Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., y Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870.
127. Bolger, R., Wiese, T.E., Ervin, K., Nestich, S., y Checovich, W. (1998). Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ. Health Perspect.* 106, 551-557.
128. Jordan, V.C., Mittal, S., Gosden, B., Koch, R., y Lieberman, M.E. (1985). Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health Perspect.* 61, 97-110.
129. Deecher, D.C., Swiggard, P., Frail, D.E., y O'Connor, L.T. (2003). Characterization of a membrane-associated estrogen receptor in a rat hypothalamic cell line (D12). *Endocrine.* 22, 211-223.
130. Deecher, D.C., Daoud, P., Bhat, R.A., y O'Connor, L.T. (2005). Endogenously expressed estrogen receptors mediate neuroprotection in hippocampal cells (HT22). *J Cell Biochem.* 95, 302-312.
131. Harrington, W.R., Sengupta, S., y Katzenellenbogen, B.S. (2006). Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Endocrinology* 147, 3843-3850.

## Bibliografía

---

132. Keay,J., Bridgham,J.T., y Thornton,J.W. (2006). The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinology* 147, 3861-3869.
133. Acconcia,F., Barnes,C.J., y Kumar,R. (2006). Estrogen and tamoxifen induce cytoskeletal remodeling and migration in endometrial cancer cells. *Endocrinology* 147, 1203-1212.
134. Acconcia,F. y Kumar,R. (2006). Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett.* 238, 1-14.
135. Marino,M., Ascenzi,P., y Acconcia,F. (2006). S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids* 71, 298-303.
136. Guo,R.X., Wei,L.H., Tu,Z., Sun,P.M., Wang,J.L., Zhao,D., Li,X.P., y Tang,J.M. (2006). 17 beta-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99, 9-18.
137. Marino,M., Distefano,E., Caporali,S., Ceracchi,G., Pallottini,V., y Trentalance,A. (2001). beta-estradiol stimulation of DNA synthesis requires different PKC isoforms in HepG2 and MCF7 cells. *J Cell Physiol* 188, 170-177.
138. Lannigan,D.A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68, 1-9.
139. Ravasi,T. y *col.* (2010). An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* 140, 744-752.
140. Medunjanin,S., Hermani,A., De,S.B., Grisouard,J., Rincke,G., y Mayer,D. (2005). Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol. Chem.* 280, 33006-33014.
141. Atanaskova,N., Keshamouni,V.G., Krueger,J.S., Schwartz,J.A., Miller,F., y Reddy,K.B. (2002). MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* 21, 4000-4008.
142. Brzozowski,A.M., Pike,A.C., Dauter,Z., Hubbard,R.E., Bonn,T., Engstrom,O., Ohman,L., Greene,G.L., Gustafsson,J.A., y Carlquist,M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
143. Tollefsen,K.E., Mathisen,R., y Stenersen,J. (2002). Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp Endocrinol.* 126, 14-22.
144. Tollefsen,K.E., Meys,J.F., Frydenlund,J., y Stenersen,J. (2002). Environmental estrogens interact with and modulate the properties of plasma sex steroid-binding proteins in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Environ. Res.* 54, 697-701.

## Bibliografía

---

145. Wakeling,A.E., Dukes,M., y Bowler,J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* 51, 3867-3873.
146. Wang,Y.J., Liu,H.L., Guo,H.T., Wen,H.W., y Liu,J. (2004). Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *World J Gastroenterol* 10, 699-702.
147. Coleman,R. y Roma,M.G. (2000). Hepatocyte couplets. *Biochem Soc. Trans.* 28, 136-140.
148. Talamini,M.A., Kappus,B., y Hubbard,A. (1997). Repolarization of hepatocytes in culture. *Hepatology* 25, 167-172.
149. LeCluyse,E., Madan,A., Hamilton,G., Carroll,K., DeHaan,R., y Parkinson,A. (2000). Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 177-188.
150. Liu,X., LeCluyse,E.L., Brouwer,K.R., Gan,L.S., Lemasters,J.J., Stieger,B., Meier,P.J., y Brouwer,K.L. (1999). Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am. J Physiol* 277, G12-G21.
151. Williams,B.R., Gelman,R.A., Poppke,D.C., y Piez,K.A. (1978). Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *J Biol. Chem.* 253, 6578-6585.
152. Berry,M.N. y Friend,D.S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
153. Baur,H., Kasperek,S., y Pfaff,E. (1975). Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 356, 827-838.
154. Wilton,J.C., Williams,D.E., Strain,A.J., Parslow,R.A., Chipman,J.K., y Coleman,R. (1991). Purification of hepatocyte couplets by centrifugal elutriation. *Hepatology* 14, 180-183.
155. Gratzl,R., Lassacher,R., Majcen,A., y Graf,J. (1997). Redistribution of canalicular cell membrane enzyme in hepatocytes following their isolation and during early cell culture. *Hepatology* 25, 502-504.
156. Sanders,M.J. y Soll,A.H. (1989). Cell separation by elutriation: major and minor cell types from complex tissues. *Methods Enzymol.* 171, 482-497.
157. Wilton,J.C., Coleman,R., Lankester,D.J., y Chipman,J.K. (1993). Stability and optimization of canalicular function in hepatocyte couplets. *Cell. Biochem. Funct.* 11, 179-185.
158. Carreras,F.I., Gradilone,S.A., Mazzone,A., Garcia,F., Huang,B.Q., Ochoa,J.E., Tietz,P.S., LaRusso,N.F., Calamita,G., y Marinelli,R.A. (2003). Rat hepatocyte aquaporin-8 water channels are down-regulated in extrahepatic cholestasis. *Hepatology* 37, 1026-1033.
159. LOWRY,O.H., ROSEBROUGH,N.J., FARR,A.L., y RANDALL,R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193, 265-275.



## Bibliografía

---

160. Maglova,L.M., Jackson,A.M., Meng,X.J., Carruth,M.W., Schteingart,C.D., Ton-Nu,H.T., Hofmann,A.F., y Weinman,S.A. (1995). Transport characteristics of three fluorescent conjugated bile acid analogs in isolated rat hepatocytes and couplets. *Hepatology* 22, 637-647.
161. Wang,L. y *col.* (2002). Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev. Cell* 2, 721-731.
162. Yuan,B., Latek,R., Hossbach,M., Tuschl,T., y Lewitter,F. (2004). siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res.* 32, W130-W134.
163. Kemp,D.C. y Brouwer,K.L. (2004). Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure. *Toxicol. in Vitro* 18, 869-877.
164. Berthelot,P., Erlinger,S., Dhumeaux,D., y Preaux,A.M. (1970). Mechanism of phenobarbital-induced hypercholerisis in the rat. *Am. J. Physiol* 219, 809-813.
165. Hinchman,C.A., Matsumoto,H., Simmons,T.W., y Ballatori,N. (1991). Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.* 266, 22179-22185.
166. Mottino,A.D., Hoffman,T., Crocenzi,F.A., Sanchez Pozzi,E.J., Roma,M.G., y Vore,M. (2007). Disruption of function and localization of tight junctional structures and Mrp2 in sustained estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 293, G391-G402.
167. Beuers,U., Denk,G.U., Soroka,C.J., Wimmer,R., Rust,C., Paumgartner,G., y Boyer,J.L. (2003). Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets. *J Biol. Chem.* 278, 17810-17818.
168. Boaglio,A.C., Zucchetti,A.E., Toledo,F.D., Barosso,I.R., Sanchez Pozzi,E.J., Crocenzi,F.A., y Roma,M.G. (2012). ERK1/2 and p38 MAPKs Are Complementarily Involved in Estradiol 17ss-d-Glucuronide-Induced Cholestasis: Crosstalk with cPKC and PI3K. *PLoS. One.* 7, e49255.
169. Gruden,G., Zonca,S., Hayward,A., Thomas,S., Maestrini,S., Gnudi,L., y Viberti,G.C. (2000). Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes* 49, 655-661.
170. Nagarkatti,D.S. y Sha'afi,R.I. (1998). Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mol. Cell Cardiol.* 30, 1651-1664.
171. Romanelli,A. y van de Werve,G. (1997). Activation of mitogen-activated protein kinase in freshly isolated rat hepatocytes by both a calcium- and a protein kinase C-dependent pathway. *Metabolism* 46, 548-555.



## Bibliografía

---

172. Marino,M., Pallottini,V., y Trentalance,A. (1998). Estrogens cause rapid activation of IP3-PKC-alpha signal transduction pathway in HEPG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 254-258.
173. Kuipers,F., Hardonk,M.J., Vonk,R.J., y van der,M.R. (1992). Bile secretion of sulfated glycolithocholic acid is required for its cholestatic action in rats. *Am J Physiol* **262**, G267-G273.
174. Fu,D., Wakabayashi,Y., Lippincott-Schwartz,J., y Arias,I.M. (2011). Bile acid stimulates hepatocyte polarization through a cAMP-Epac-MEK-LKB1-AMPK pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 1403-1408.
175. Ignar-Trowbridge,D.M., Nelson,K.G., Bidwell,M.C., Curtis,S.W., Washburn,T.F., McLachlan,J.A., y Korach,K.S. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 4658-4662.
176. Power,R.F., Mani,S.K., Codina,J., Conneely,O.M., y O'Malley,B.W. (1991). Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* **254**, 1636-1639.
177. Chen,D., Pace,P.E., Coombes,R.C., y Ali,S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1002-1015.
178. Carascossa,S., Dudek,P., Cenni,B., Briand,P.A., y Picard,D. (2010). CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev.* **24**, 708-719.
179. Tan,B., Long,X., Nakshatri,H., Nephew,K.P., y Bigsby,R.M. (2008). Striatin-3 gamma inhibits estrogen receptor activity by recruiting a protein phosphatase. *J Mol. Endocrinol.* **40**, 199-210.
180. He,Z. y *col.* (2012). Shp2 controls female body weight and energy balance by integrating leptin and estrogen signals. *Mol. Cell Biol.* **32**, 1867-1878.
181. Hu,X., Wu,X., Xu,J., Zhou,J., Han,X., y Guo,J. (2009). Src kinase up-regulates the ERK cascade through inactivation of protein phosphatase 2A following cerebral ischemia. *BMC. Neurosci.* **10**, 74.
182. Boonyaratanakornkit,V. (2011). Scaffolding proteins mediating membrane-initiated extra-nuclear actions of estrogen receptor. *Steroids* **76**, 877-884.
183. le,G.P., Montano,M.M., Schodin,D.J., y Katzenellenbogen,B.S. (1994). Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol. Chem.* **269**, 4458-4466.
184. Goode,N., Hughes,K., Woodgett,J.R., y Parker,P.J. (1992). Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms. *J Biol. Chem.* **267**, 16878-16882.

## Bibliografía

---

185. Likhite,V.S., Stossi,F., Kim,K., Katzenellenbogen,B.S., y Katzenellenbogen,J.A. (2006). Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol. Endocrinol.* *20*, 3120-3132.
186. Kim,K.H. y Bender,J.R. (2009). Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. *Mol. Cell Endocrinol.* *308*, 3-8.
187. Newton,A.C. (1996). Protein kinase C: ports of anchor in the cell. *Curr. Biol.* *6*, 806-809.
188. Lee,H. y Bai,W. (2002). Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* *22*, 5835-5845.
189. Alzamora,R. y Harvey,B.J. (2008). Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by steroid hormones. *Steroids* *73*, 885-888.

## **Agradecimientos.**

Quiero expresar mi agradecimiento a mi Director de Tesis el Dr. Enrique Sánchez Pozzi (Quiquín) por haberme dirigido todo este tiempo, por haberme podido transmitir todo sus conocimientos y dado la posibilidad de desarrollarme en esta profesión y además para agradecerle la posibilidad que me dio para formar parte de su Grupo.

Quiero agradecer a mi co-Director el Dr. Fernando Crocenzi (Tato) por haberme dado la posibilidad de trabajar junto a él y haber brindado todo su conocimiento.

Agradezco tanto a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnología como al CONICET por haberme otorgado las becas para desarrollar este trabajo de Tesis.

Quiero agradecer a mis compañeros de Grupo, tanto a mi "hermano" Andrés Zucchetti como a mis "primas" Andrea, Ceci y Flavia por haberme brindado toda la ayuda y colaboración necesaria en este tiempo.

Agradezco también a la colaboración intelectual recibida por Ceci L., Dani y Leandro.

Quiero agradecer a toda la gente del IFISE por haberme abierto la puerta y dejarme formar parte de esta Gran Familia.

Agradezco la colaboración técnica brindada por Elena, Diego y Marcelo.

También quiero agradecer el haber compartido todo este tiempo junto a gente tan querida (Leandro, Dani, Fla, Lau, Agos, Luigi, JPP, Pau, Ana, Andre, Juancho, Noe, Julia, Julieta, Virgi, Tere, Silvi, Luján) y por los buenos tiempos compartidos en el trabajo de mesada.

Agradezco haber podido hacer buenos amigos en este ámbito laboral (Andrés, Leandro, Dani, Juancho).

También quiero agradecer a PAULA  porque me ha acompañado en todo momento en esta última etapa de esta Tesis.

Y por último quisiera agradecer a mi familia (SUSANA, RUBÉN, ANA, MICA) por el aguante recibido todo este tiempo.