

**Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa**



Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a nivel intestinal en un modelo murino de colestasis química inducida por  $\alpha$ -Naftilisotiocianato (ANIT)

**TESIS:**

**Que para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental**

**Presenta:**

**Jocelyn López Ramírez**

**COMITÉ TUTORAL**

Directora: Dra. Leticia Bucio Ortiz

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma  
Metropolitana Iztapalapa

Asesora: Dra. Natalia Nuño Lámbarri

Unidad de Investigación Traslacional, Fundación Clínica Médica Sur

Asesora: Dra. Elsy Soraya Salas Silva

Departamento de Cirugía, Universidad de Hanyang, Corea del Sur

Ciudad de México, 30 de marzo del 2022

**“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Internacional Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.**

**Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 766336**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El (La) que suscribe Jocelyn López Ramírez, alumno (a) del posgrado Maestría en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a nivel intestinal en un modelo murino de colestasis química inducida por  $\alpha$ -Naftilisotiocianato (ANIT)”.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestra en Biología Experimental es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 30 de Marzo del 2022.

Atentamente



**Jocelyn López Ramírez**

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 30 de Marzo de 2022

Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental  
Presente

El(La) que suscribe Jocelyn López Ramírez alumno(a) con número de matrícula 2193803488, del posgrado Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación “Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a nivel intestinal en un modelo murino de colestasis química inducida por  $\alpha$ -Naftilisotiocianato (ANIT)” a desarrollar en Universidad Autónoma Metropolitana, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado. En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



---

**Jocelyn López Ramírez**

## **El presente trabajo fue realizado en**

Laboratorio de Medicina Experimental y carcinogénesis, del departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Laboratorio de Medicina Experimental del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH).

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el nivel internacional y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020. Número de registro de la beca otorgada 766336.

Este trabajo estuvo apoyado por el proyecto CONACYT CB-A1-S-38154, bajo la responsabilidad de la Dra. Leticia Bucio Ortiz; del proyecto CB-252942, y Fronteras de la Ciencia-1320, bajo la responsabilidad del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz. Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura 2013-205941 y 2017-280788 a nombre de la Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz y la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo Firmantes, aprobando la tesis titulada: "Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a nivel intestinal en un modelo murino de colestasis química inducida por  $\alpha$ -Naftilisotiocianato (ANIT)" con fecha 30 de Marzo del 2022

 PRESIDENTE Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz	 SECRETARIO Dra. Natalia Nuño Lámbarri
 VOCAL Dr. Benjamín Pérez Aguilar	 VOCAL Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

**COMITE TUTORIAL**

**DIRECTORA**

**Dra. Leticia Bucio Ortiz**

Investigador Nacional Nivel I

Laboratorio de Medicina Experimental y Carcinogénesis

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

**Asesora**

**Dra. Elsy Soraya Salas Silva**

Departamento de Cirugía

Universidad de Hanyang

Seúl, Corea del Sur

**Asesora**

**Dra. Natalia Nuño Lámbarri**

Unidad de Investigación Traslacional, Fundación Clínica Médica Sur

Ciudad de México, México

## Resumen

La colestasis es una condición del hígado en la que el flujo de la bilis se ve interrumpido por diversos factores. Actualmente existen una serie de modelos para el estudio de esta enfermedad, como el inducido por ANIT. El daño causado por ANIT se incrementa por una producción elevada de especies reactivas de oxígeno. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) ha demostrado tener propiedades reguladoras sobre la producción de ROS, y gracias a esto, se ha sugerido como una molécula protectora en enfermedades donde el estrés oxidante es determinante para el daño. El estrés oxidante es regulado por HGF ya que puede desencadenar la transcripción de genes blancos regulados por Nrf2. Lo que observamos en el presente estudio fue que HGF pudo contrarrestar el daño en el intestino inducido por ANIT, principalmente la colestasis característica del modelo. En nuestros resultados, HGF mostró proteger la obstrucción intestinal. Así mismo, se demostró que el tratamiento con HGF protegió las zonas más susceptibles del intestino. A nivel de íleon y colon se observó el incremento del tamaño de criptas y vellosidades, como un evento de proliferación y diferenciación desencadenados por HGF. Estos eventos favorecieron la actividad y protección del íleon y colon, principalmente por el incremento de la secreción de mucinas, disminuyendo la muerte celular. De igual manera, HGF reguló la respuesta inflamatoria entre el colon y el intestino, ya que por un lado disminuyó la inflamación de íleon, y por otro lado incrementó la respuesta reparadora en el colon, principalmente a nivel de translocación de bacterias. Finalmente, HGF mostró tener regulación de ROS en los ratones tratados previamente con ANIT, fenómeno caracterizado por el incremento de proteínas antioxidantes y disminución de presencia de anión superóxido en el tejido observado por la tinción por dihidroetidio. En conclusión, los resultados demostraron que HGF ejerce protección a nivel intestinal en la enfermedad colestásica inducido por ANIT.



## Abstract

Cholestasis is a condition of the liver in which the flow of bile is interrupted by various factors. Currently there are several models for the study of this disease, such as the one induced by ANIT. The damage caused by ANIT is increased by an explosion of reactive oxygen species. Hepatocyte growth factor has been shown to have regulatory properties of ROS and thanks to this it has been presented as a protective molecule in diseases where oxidative stress is decisive for damage. Oxidative stress is regulated by HGF as it can trigger the transcription of Nrf2 target genes. What we observed in the present study was that HGF was able to sustain the damage to the gut caused by ANIT-induced cholestasis. In our results, HGF was shown to protect the jejunum from intestinal obstruction. Later it was shown that treatment with HGF protected the most susceptible areas of the intestine. At the level of the ileum and colon, the increase in the size of crypts and villi was observed as an event of proliferation and differentiation triggered by HGF. These events favored the activity and protection of the ileum and colon seen by increasing mucin secretion and decreasing cell death in A+H treatments. Similarly, HGF regulated in an interesting way the inflammatory response between the colon and the intestine, on the one hand, decreasing the inflammation of the ileum and on the other, increasing the reparative response in the colon where the translocation of bacteria could increase the damage. Finally, HGF was shown to upregulate ROS in ANIT-pretreated mice seen by increased antioxidant proteins and decreased dihydroethidium staining. In conclusion, the results demonstrated that HGF exerted protection at the intestinal level in cholestatic disease induced by ANIT.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 GENERALIDADES DEL HÍGADO .....	1
1.2 CANALÍCULO BILIAR .....	2
1.3 BIOTRANSFORMACIÓN .....	3
1.4 ÁCIDOS BILIARES Y CIRCULACIÓN .....	4
1.5 ENFERMEDAD COLESTÁSICA .....	7
1.6 EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS Y SU RECEPTOR C-MET .....	9
1.7 MECANISMO DE DAÑO COLESTÁSICO POR ANIT .....	10
1.8 EJE HÍGADO E INTESTINO .....	11
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>15</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	15
7.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA .....	17
7.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (QRT-PCR) .....	18
7.4 CONTENIDO PROTEICO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	19
7.5 INMUNOFLUORESCENCIAS (IF) .....	20
7.6 INMUNOHISTOQUÍMICAS (IHC) .....	20
7.7 TINCIÓN DE AZUL ALCIANO .....	21
7.8 DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) .....	21
7.9 PRUEBAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA .....	22
7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
8.1 EL MODELO DE COLESTASIS AGUDA CON ANIT INDUCE DAÑO A NIVEL INTESTINAL Y HGF LO PROTEGE .....	24
8.2 HGF PRESERVA EL ESTADO DEL TEJIDO INTESTINAL A NIVEL ÍLEON Y COLON POSTERIOR A UNA COLESTASIS AGUDA .....	27
8.3 HGF REGULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE ACUERDO CON LOS REQUERIMIENTOS DEL TEJIDO .....	31
8.4 EL MANEJO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO POR HGF JUEGAN UN ROL IMPORTANTE PARA LA PROTECCIÓN DEL EPITELIO .....	34
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>10. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
<b>11. REFERENCIAS</b> .....	<b>43</b>

## 1. Introducción

### 1.1 Generalidades del hígado

El hígado es el órgano interno más grande en los mamíferos. Representa el 2% del peso corporal en los adultos humanos. Se encuentra ubicado en la cavidad superior derecha, detrás de las costillas inferiores. En algunos mamíferos el hígado es un órgano multilobulado; en los humanos se distinguen dos lóbulos principales, derecho e izquierdo, separados físicamente por el ligamento falciforme (Arias & Wiley, 2020).

La unidad funcional en el hígado se conoce como el acino o lobulillo hepático definido como una masa de parénquima rodeando el tracto portal o triada portal donde también se encuentra el ducto biliar y la arteria hepática, y de lado contrario, diversas vénulas hepáticas. El acino hepático se encuentra subdividido en tres zonas (zona 1, 2 y 3) según la distancia de la vena portal (Figura 1) (Arias & Wiley, 2020).

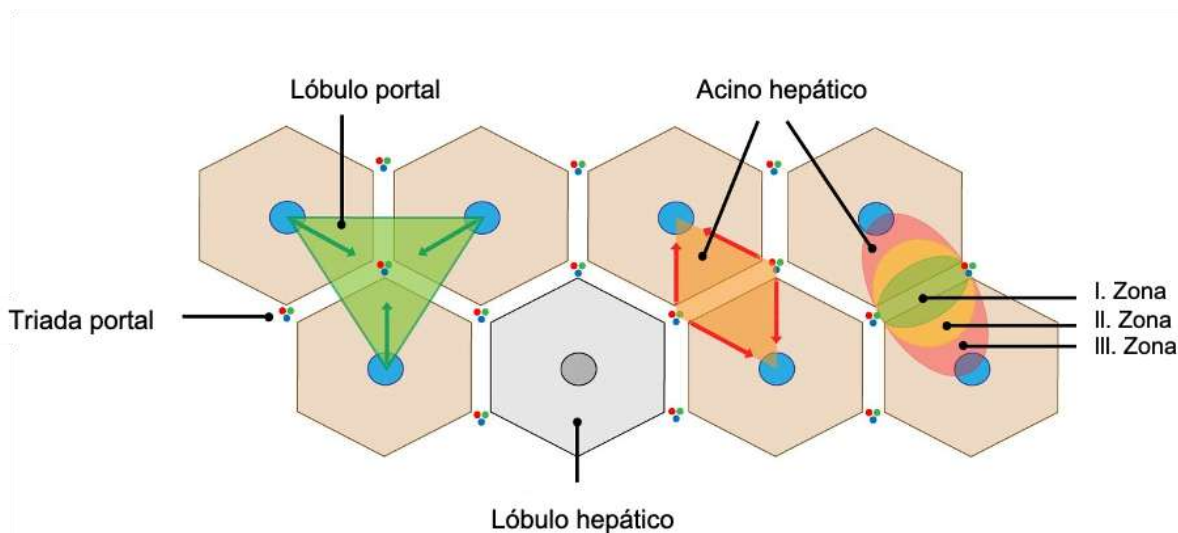


Figura 1. Ilustración de las unidades funcionales del hígado y su organización. El acino hepático es una elipse en la que se involucran la triadas portales, conformada por el ducto biliar, la arteria y la vena hepática y se unen entre dos venas centrales, cada lóbulo hepático tiene 3 a 6 triadas hepáticas. Tomado de “*Funciones de la células y el cuerpo Humano*” <http://fbt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>.

El hígado es un importante “biofiltro” ya que éste contiene cerca de 12% de la sangre total del cuerpo y a través de él pasan cerca de 1500-2000 mL de sangre por minuto.

Además, de las más de 500 funciones que lleva a cabo este órgano, las más sobresalientes son: el catabolismo de glucosa y diferentes tipos de lípidos para la obtención de energía en forma de ATP, la biotransformación de sustancias y desechos tóxicos y la biosíntesis de ácidos biliares, componentes fundamentales de la bilis (Arias & Wiley, 2020; Kuntz et al., 2006).

## 1.2 Canalículo biliar

El hígado está compuesto por diferentes células de las cuales los hepatocitos representan el 60% de todas las células. Los hepatocitos son células complejas pero su peculiaridad es su polarización por la que adquieren tres superficies bien especializadas.

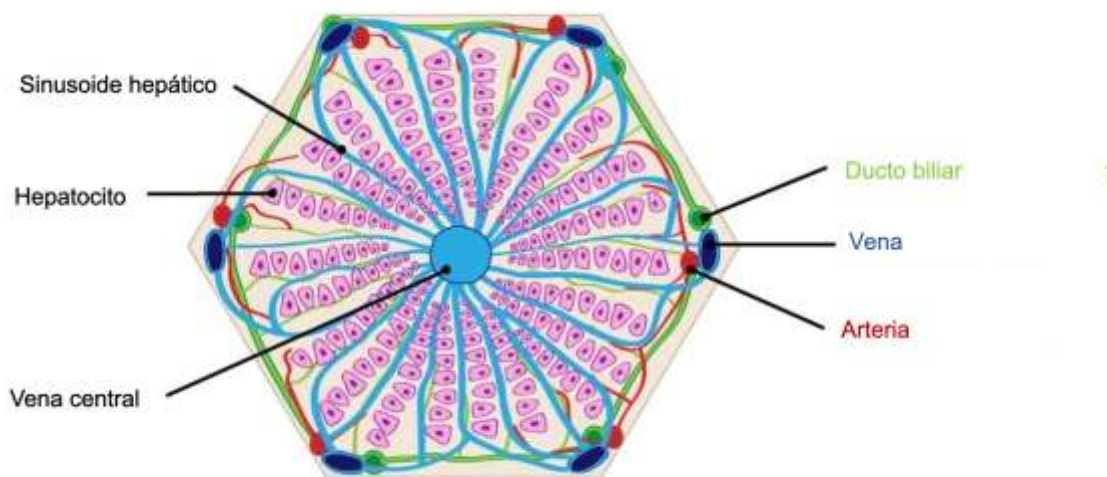


Figura 2. Organización de hepatocitos en el lóbulo hepático separados por un espacio sinusoidal. Distribuidos radialmente de la vena central hacia la triada hepática. La forma en la que se encuentra la irrigación es determinante para la polaridad del hepatocito. Tomado de “*Funciones de la células y el cuerpo Humano*” <http://fbt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>.

Por un lado, su membrana basolateral o sinusoidal que representa el 35 % de la superficie del hepatocito. En esta membrana se forman microvellosidades que dan cara al espacio de Disse, lugar donde alberga el plasma sanguíneo, y que el hepatocito ocupa para extracción o secreción de moléculas (Arias & Wiley, 2020).

Además de la membrana basolateral, también el hepatocito cuenta con su cara lateral, una superficie que forma una barrera permeable y la cual se encarga de la adhesión intercelular, aquí podemos encontrar diferentes complejos como uniones estrechas, uniones intermedias, desmosomas y uniones “gap” para la comunicación con los hepatocitos vecinos.

Y la tercera es la membrana canalicular, que pertenece a la cara apical del hepatocito. Esta formada por un espacio entre 1-2  $\mu\text{m}$  que en unión con otro hepatocito adyacente y sellado por uniones estrechas forman el canaliculo biliar.

El canaliculo biliar está delimitado por uniones como “zonula occludens” 1/2/3, ocludinas, claudinas y E-caderinas que se anclan al citoesqueleto de actina (Kuntz et al., 2006).

Esta región es especializada para la formación de un tubo interconectado para la secreción de bilis al árbol biliar. Para la secreción biliar el hepatocito expresa transportadores especializados en el canaliculo. Estos transportadores son BSEP (bomba de exportación de sales biliares) como su nombre lo indica especializado en la salida de sales biliares conjugadas, los transportadores relacionados a resistencia a fármacos Mrp2, Mdr1 y Mrp3 encargados de la salida de compuestos conjugados con fosfolípidos y glutatión; y finalmente los transportadores de la familia ABC para el transporte de colesterol (Arias & Wiley, 2020; David et al., 2012).

Mantener toda la formación e integridad del canaliculo biliar es sumamente importante ya que coloca una serie de elementos con los que se realizan diversas funciones hepáticas esenciales.

### **1.3 Biotransformación**

Una de las funciones principales del hígado es la biotransformación; el objetivo de este proceso es la conversión de xenobióticos en metabolitos que sean fácil de eliminar. Dicho de otra manera, el hígado es el encargado de la destoxificación, incrementando la polaridad de moléculas para facilitar su excreción del cuerpo.

La biotransformación de xenobióticos tiene lugar predominantemente en el retículo endoplasmático rugoso, pero también puede realizarse en la mitocondria, lisosomas y el citosol de los hepatocitos (Klaassen, 2019).

De acuerdo con sus características químicas, los xenobióticos podemos clasificarlos como polares y no polares. Los polares son aquellos que tienen una alta capacidad de solubilidad en agua y su transporte es facilitado por canales o transportadores en la célula. También pueden transportarse libremente por sangre para ser excretados por la orina. Los no polares, por el contrario, son poco o insolubles en agua. Su transporte en la sangre requiere de la unión con otras proteínas y esto complica su eliminación (Klaassen, 2019).

Los compuestos no polares son el principal blanco de la biotransformación, la cual ocurre en diferentes fases.

En la primer fase, a la molécula se le insertan nuevos grupos funcionales que tienen por objetivo 1) incrementar la solubilidad del xenobiótico y 2) establecer en la molécula sitios en los que sea posible la conjugación. Las reacciones pueden ser diversas, pero dentro de las más reconocidas en esta fase son: la hidrólisis, la oxidación, la reducción, la alquilación, la desalquilación, la desulfuración y la metilación.

Una de las formas más frecuentes de biotransformación es mediante la oxidación por parte de enzimas oxigenasas como el citocromo P450 NADPH reductasa, hemoproteínas pertenecientes a la familia del citocromo P450 y la fosfatidilcolina (Sevior et al., 2012).

En la segunda fase de conversión de xenobióticos se realizan las conjugaciones a componentes endógenos entre los que se utilizan: ácido glucurónico (glucuronidación), grupos sulfato (sulfatación o esterificación), acetyl CoA (acetilaciones), glutatión, metionina y glicina (amidación).

Existe una tercera fase encargada del transporte de los nuevos metabolitos en la que se ven implicados diferentes transportadores que confieren a la célula selectividad (Klaassen, 2019).

#### **1.4 Ácidos biliares y circulación**

Una de las principales funciones del hígado es la síntesis de la bilis. La bilis es aproximadamente 95% agua y en el 5% restante se encuentran ácidos biliares, fosfolípidos, colesterol, proteínas, bilirrubinas además de electrolitos inorgánicos (Di Ciaula et al., 2017).

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas sintetizadas a partir del colesterol en los hepatocitos (Ikpa et al., 2020) con la finalidad de convertir el colesterol, de una molécula poco soluble en hidrosoluble y así poder facilitar su eliminación. Además de facilitar la salida de colesterol, a su paso la presencia de ácidos biliares cumple con otras funciones como: ser moléculas de señalización para hormonas, procesos inflamatorios, regulación metabólica, respuesta inmune, proliferación epitelial, regulación de la microbiota intestinal y expresión de transportadores (Arias & Wiley, 2020).

Estas moléculas se caracterizan por tener un anillo esteroideo central y una cola con un grupo carboxilo (Figura 3), producto de la hidroxilación del colesterol por la enzima CYP7A1 de manera canónica y CYP27A1 de forma alternativa. Los grupos hidroxilo y carboxilo con los que se biotransforman el colesterol en su primer fase, confieren a la molécula una cara hidrofílica, mientras que el esqueleto de carbonos representa la cara hidrófoba de los ácidos biliares (Figura 3B). Las modificaciones por la esteroil 12 $\alpha$ -hidrolasa (CYP8B1) convierte intermediarios hacia ácidos biliares primarios: ácido cólico (CA) o en su ausencia, ácido quenodesoxicólico (CDCA) (Arias & Wiley, 2020; McGlone & Bloom, 2019).

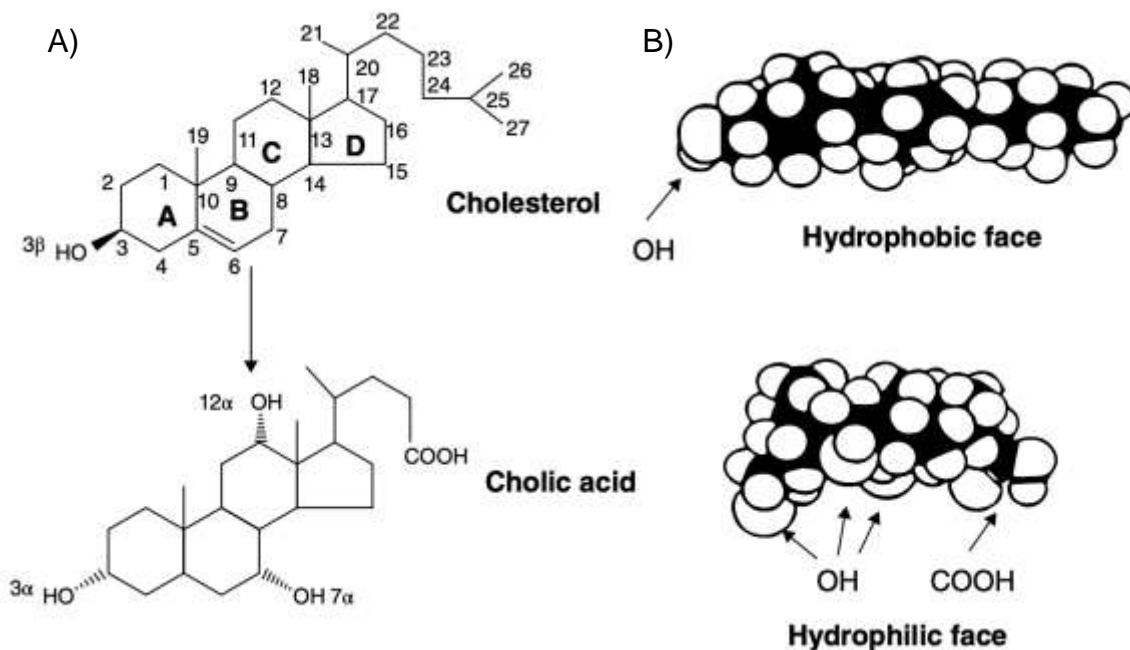


Figura 3. Estructura básica de los ácidos biliares. A) muestra el anillo esteroideo central y la cola carboxilada característica del colesterol mientras que la parte de abajo se presenta el ácido biliar



primario con la hidroxilación por el citocromo en el carbono siete. B) Muestra la cara hidrofóbica determinada por la cadena de carbonos y la cara hidrofílica por las modificaciones en la molécula de colesterol. Imagen tomada de (Arias & Wiley, 2020).

Una vez sintetizados los ácidos biliares primarios, existen cinco tipos de conjugaciones que pueden ocurrir en el núcleo esteroideo o bien, en la cadena lateral antes de la liberación de ácidos biliares al canalículo biliar (Arias & Wiley, 2020).

De esta manera, los ácidos biliares pueden ser movilizados por medio de transportadores del canalículo hacia el árbol biliar.

El árbol biliar es una estructura altamente dinámica compuesta por las células hepáticas denominadas colangiocitos que representan del 3-5% de todas las células del hígado. Los colangiocitos son células epiteliales alineadas para formar la primer barrera de protección contra los componentes biliares. Son provistos de un cilio primario en su cara apical el cual cuenta con receptores y canales encargados de censar la calidad de la bilis y poder regularla por la secreción de iones y agua (Salas-Silva et al., 2021).

Esta modulación de la bilis es importante para su almacenamiento en la vesícula biliar, y más tarde, en presencia de alimentos y por estimulación de la hormona colecistoquinina (CCK8) y motilina, se libera su contenido dentro del duodeno (Di Ciaula et al., 2017).

Dentro del intestino los ácidos biliares llevan a cabo su función como emulsificante de grasas y componentes lipídicos favoreciendo la absorción de nutrientes en el intestino. Posteriormente aquellos ácidos biliares primarios que se encuentran en circulación pueden pasar por el colon y sufrir otras transformaciones que incluyen la remoción, oxidación o epimerización de grupos hidroxilo por parte de la microbiota. Este proceso los convierte en ácidos biliares secundarios (Arias & Wiley, 2020; McGlone & Bloom, 2019).

El 95% de las sales biliares en circulación pueden retornar al hígado por absorción en el íleon ubicado en la parte terminal del intestino delgado, y algunos remanentes se reabsorben por el colon ya sea por transportadores o mediante difusión pasiva (Ikpa et al., 2020), de tal forma que en el hepatocito pueden volver a modificarse. Lo que



algunos autores denominan ácidos biliares terciarios (Di Ciaula et al., 2017). Este proceso de movimiento de ácidos biliares es conocido como circulación enterohepática. Como hemos descrito, poner en circulación los ácidos biliares es un proceso complejo el cual depende de varios puntos de regulación que garantizan que se cumplan las funciones que estos tienen en el hígado y a lo largo del intestino, principalmente. Sin embargo, existen diversos factores que pueden alterar el correcto funcionamiento en la formación de la bilis, su función, circulación y hasta su reciclamiento.

### **1.5 Enfermedad colestásica**

Las enfermedades hepáticas siguen representando un serio problema de salud pública, esto en gran medida relacionado con el estilo de vida moderno caracterizado por el consumo de alcohol, enfermedades virales hepáticas, consumo elevado de alimentos ricos en grasas y sin olvidar el consumo de drogas, productos herbolarios y suplementos alimenticios que hacen del hígado un órgano susceptible al daño por su actividad biotransformante (García-Cortes et al., 2020; Salas-Silva et al., 2021).

Todos estos factores pueden llevar a desórdenes progresivos condicionando al daño hepático, presentándose enfermedades que pueden afectar el árbol biliar como principal alteración o secundaria, es decir, como consecuencia de alguna otra hepatopatía como son la esteatosis, fibrosis, cirrosis y cáncer.

#### **Colestasis**

Cuando el sistema biliar es afectado puede aparecer un síndrome colestásico. La colestasis es un desorden hepático que ocurre cuando el flujo biliar normal se encuentra afectado lo que provoca un decremento de la bilis que se libera al duodeno. (Isaacs-Ten et al., 2020). Las causas de la colestasis pueden ser alteraciones en la habilidad de hepatocitos o colangiocitos para la formación de la bilis clasificada como colestasis funcional o por inflamación fibrosa de los ductos biliares y la obstrucción mecánica del flujo biliar clasificadas como colestasis obstructiva (Salas-Silva et al., 2021; Slijepcevic et al., 2018).

#### **Factores de riesgo**

Todas ellas pueden ser consecuencia de la presencia de tumores o cálculos biliares, reacciones autoinmunes, embarazo, hepatotoxicidad inducida por drogas (DILI), o infecciones virales, bacterianas o parasitarias del hígado (Wammers et al., 2018).

La principal causa de la enfermedad colestásica es la desregulación en la formación y/o secreción de la bilis, pero además se presenta un exceso en la acumulación de sales biliares en el hígado y en suero (Fickert et al., 2013; Wu et al., 2018), que pueden provocar el daño hepático y progresar a cirrosis, carcinoma hepatocelular o colangiocarcinoma (Qiu et al., 2021; Slijepcevic et al., 2018).

#### Prevalencia e incidencia

La prevalencia de esta patología ha incrementado globalmente en los recientes años, representando el 10.26 % de los pacientes que presentan alguna enfermedad crónica del hígado debido a que es una enfermedad poco estudiada a diferencia de otras enfermedades hepáticas y por tanto se ha convertido en uno de principales problemas de salud pública (Li et al., 2019).

#### Tratamiento

No es casualidad que actualmente vaya a la alza los casos de esta patología ya que las opciones terapéuticas para la enfermedad colestásica siguen siendo limitadas. Hasta el día de hoy el uso del ácido ursodesoxicólico (AUDC) en combinación con algunos agentes inmunosupresores y antiinflamatorios es el tratamiento de primera línea en pacientes con colangitis biliar primaria (PBS) y en colestasis intrahepáticas del embarazo (Salas-Silva et al., 2019; Smith & Rood, 2020).

El AUDC es un ácido biliar secundario con características hidrofílicas. Al incrementar sus concentraciones se desencadenan tres principales mecanismos de acción, uno de ellos es la modulación de la estructura y composición de micelas ricas en fosfolípidos, mismos que previenen el daño a membranas de colangiocitos por la presencia de ácidos biliares hidrófobos. Se ha observado de igual manera, que el AUDC estimula la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  favoreciendo la formación de mucosa a lo largo del árbol biliar.

También el uso clínico del AUDC estimula la secreción de bilis y la expresión de transportadores canaliculares que terminan disminuyendo la acumulación hepática de ácidos biliares. Finalmente mantiene la integridad del tejido ya que disminuye la muerte celular por apoptosis por activación de Fas (Paumgartner & Beuers, 2002).

A pesar de esto, es necesario continuar con la evaluación de moléculas que tengan efectos parecidos a los que presenta el tratamiento con AUDC o bien, que nos ayuden a contrarrestar los daños por colestasis desde diferentes perspectivas y de esta forma ampliar las opciones farmacológicas para personas con este padecimiento.

### **1.6 El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor c-Met**

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) fue descubierto en suero de ratas sometidas a hepatectomía parcial por lo que fue descrita como una proteína mitogénica. Esta proteína se sintetiza en una forma inactiva, la cual sufre proteólisis mediante miembros de la familia de proteasas ADAM para dar lugar a un polipéptido de 697 residuos de aminoácidos, unido por un enlace disulfuro (Gómez-Quiroz, 2012).

El HGF es producido por células mesenquimales, tales como células estelares (fibroblastos hepáticos), su principal blanco es el receptor celular de transición epitelio-mesénquima (c-Met) presente en células epiteliales y endoteliales, en el que el sitio de unión a HGF se encuentra en su dominio SEMA, dominio de la región extracelular de semaforinas y sus receptores plexinas (Gómez-Quiroz, 2012).

El receptor c-Met es una proteína transmembranal con un dominio extracelular heterodímero e hidrofóbico. Es un receptor con actividad de tirosina cinasa en su parte intracelular, las fosforilaciones en Tyr1234 y Tyr1235 incrementan la actividad del receptor, mientras aquellas en Ser975 o Tyr1003 lo inhiben (Muriel & ScienceDirect, 2017).

Se ha documentado que distintos los factores de crecimiento son los principales reguladores de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como: el Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), Factor de crecimiento epitelial (EGF) y el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Muriel & ScienceDirect, 2017).

Otras fosforilaciones importantes son Tyr1349 y 1356, ya que actúan como sitio de anclaje para el reclutamiento de proteínas adaptadoras como la proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2), homología src/colágeno (SHC), proteína adaptadora asociada a Grb2 (Gab1) y CT10 (virus del tumor de pollo No. 10)

regulador de quinasa/similar a Crk (Crk/CRKL) con transductores de señal fosfatidilinositol-3-OH quinasa (PI3K), transductor de señal y activador de la transcripción-3 (Stat3), fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), factor de intercambio de nucleótidos de guanina Ras siete (SOS), Src cinasa, y Src región de homología-2 que contiene proteína tirosina fosfatasa 2 (SHP2) para la transducción de señales (Arnold et al., 2017).

Se ha observado que HGF/c-Met regula el estado redox celular debido a que incrementa el contenido de enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa 1 y 2, y las relacionadas con el glutatión. El mecanismo desencadenado en presencia de HGF induce activación de la cinasa PKC, quien de manera dual fosforila al factor nuclear Nrf2 y a la subunidad p47 de la NADPH oxidasa para su activación (Clavijo-Cornejo et al., 2013; Gómez-Quiroz, 2012). También se ha observado que la presencia de HGF incide sobre la regulación de la subunidad pro-oxidante p22 del complejo de oxidasas (Simoni-Nieves et al., 2021) para dirigir señalización por ROS y modular procesos apoptóticos. La actividad de la NADPH oxidasa libera a Nrf2 de su proteína represora Keap1 que es una proteína sensor del estado redox y a su vez media la degradación vía proteosomal por la oxidación de sus residuos de cisteína. La liberación de Keap1 junto con la fosforilación de Nrf2 permiten su translocación al núcleo y por consiguiente la transcripción de proteínas antioxidantes (Muriel & ScienceDirect, 2017).

La respuesta antioxidante por parte de HGF resulta relevante en el estudio de patologías, como la colestasis, en las que la generación de ROS se manifiesta en el daño al epitelio.

### **1.7 Mecanismo de daño colestásico por ANIT**

Para el estudio de las enfermedades colestásicas se requieren de modelos experimentales que propicien información mecanística. Existen diversos modelos de colestasis que nos permiten el estudio de esta enfermedad, uno de los más usados es el inducido por la administración de  $\alpha$ -Naftilisotiocianato (ANIT), compuesto químico altamente tóxico. El ANIT es capaz de inducir colestasis de daño agudo o crónico y el

modelo derivado del tratamiento con ANIT favorece condiciones para estudiar los mecanismos moleculares de dicha colangiopatía.

El mecanismo de daño por ANIT se debe a la capacidad de excreción de xenobióticos del hepatocito, ya que ANIT al ser asociado al glutatión (GSH) por la actividad de la *GSH S-transferasa*, es transportado vía el transportador MRP2 a la bilis, donde por pH alcalino se disocia dejando ANIT y GSH libres. Dentro de los ductos biliares el ANIT se somete a ciclos de absorción y biotransformación, lo que dirige a aumentar sus concentraciones biliares y por lo tanto su toxicidad (Mariotti et al., 2018). La toxicidad por ANIT se desencadena por un incremento de la apoptosis por estrés oxidante en los colangiocitos, una tasa de muerte celular que no puede ser compensada por la proliferación estimulada por el daño colangiocelular (Salas-Silva et al., 2019). Además, la agresión a los ductos lleva a la activación de neutrófilos que finalmente terminan colaborando al deterioro del hígado (L. Yu et al., 2017).

El modelo agudo provocado por ANIT interrumpe el flujo biliar por necrosis y descamación del epitelio en ductos interlobulares, por lo que la colestasis que se induce es resultado de una obstrucción biliar. Algunos de los efectos del tratamiento con ANIT son el incremento de la permeabilidad de las uniones estrechas entre hepatocitos y, con ello, la baja capacidad de excretar sustancias, como los mismos ácidos biliares, bilirrubinas y conjugados (Dahm, 2010). Por otra parte, el modelo de ANIT es un modelo de colestasis que, por ende, la mayoría de los estudios se han dirigido a evaluar que sucede en el hígado y buscar alternativas enfocadas a la protección de este órgano. Sin embargo, el hígado no es un órgano aislado y las afectaciones a otros sistemas han sido de poco interés.

### **1.8 Eje hígado e intestino**

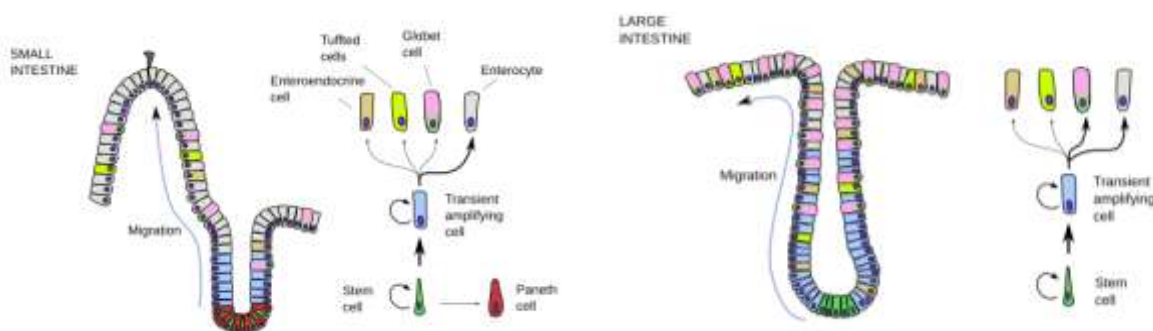
El intestino es un órgano conectado directamente con el hígado por el ducto común biliar que descarga la bilis en el duodeno. El hígado e intestino trabajan coordinadamente, por lo tanto, durante el desarrollo de alguna enfermedad ambos órganos pueden encontrarse comprometidos (Pandak & Kakiyama, 2019). En una colestasis, es perturbada la circulación enterohepática de los ácidos biliares, lo que

provoca una disminución de la cantidad de ácidos biliares en el lumen intestinal (Modica et al., 2012) lo que en consecuencia genera la pérdida de la barrera intestinal y que finalmente termina contribuyendo a la progresión de la enfermedad hepática (Lui et al., 2018; Isaacs-Ten et al., 2020).

El intestino es un órgano complejo y compuesto por cuatro diferentes secciones, en primer lugar, el duodeno, yeyuno e íleon forman parte del intestino delgado el cual se organiza en microvellosidades y criptas intestinales que incrementan la superficie de contacto. La diferencia entre estas dos es que en las vellosidades encontramos tipos celulares bien diferenciados, mientras que las criptas contienen primordialmente a las células madre (Zhang et al., 2019).

Al final del íleon inmediatamente comienza el intestino grueso o colon que a diferencia del intestino delgado este solo presenta criptas intestinales en las que se facilita principalmente la secreción de mucosa para albergar una gran cantidad de bacterias.

De manera general este órgano cuenta con diferentes tipos celulares que contribuyen a su funcionalidad (Figura 4). Los enterocitos o células absorbentes son el principal tipo celular en el intestino, estos son encargados del transporte y selección de moléculas a través de ellos; las células goblet se ubican intercaladas entre los enterocitos y tienen una importante función secretora de moco encargado de proteger el intestino de agentes patógenos. Principalmente en las criptas se encuentran las células endocrinas que contienen gránulos eosinófilos que previenen la invasión de organismos ajenos al epitelio y finalmente tenemos las células paneth activas para la secreción de diversos factores para la diferenciación y crecimiento de células madre, así como gránulos antimicrobianos para la protección de la región (Zhang et al., 2019)



**Figura 4.** Disposición de tipos celulares en el intestino delgado e intestino grueso. En la imagen se muestra del lado izquierdo la vellosidad y cripta, así como la distribución de los tipos celulares en intestinales. Del lado derecho se muestra la cripta intestinal típica del colon. Adaptado de Baker, 2014.

## 2. Antecedentes

La circulación de los ácidos biliares implica la participación y coordinación del hígado con otros órganos, por lo que en años recientes se ha visto que las enfermedades colestásicas no afectan exclusivamente al hígado (Fickert et al., 2013; Ollo et al., 2019; Salas-Silva et al., 2020). En un modelo murino con ligadura del ducto biliar común, se demostró que, para evitar la sucesiva acumulación de ácidos biliares en el hígado, estos se eliminan por vía basolateral y como consecuencia afectan el epitelio renal (Fickert et al., 2013), esto mismo se ha reportado en respuesta al tratamiento con ANIT (Salas-Silva et al., 2020). El páncreas es otro órgano que se relaciona con el daño por enfermedades colestásicas; sin embargo, este ha sido un mecanismo poco estudiado (Ollo et al., 2019).

En cuanto al eje hígado-intestino, se ha encontrado que la colestasis afecta la permeabilidad del intestino (Isaacs-Ten et al., 2020) a causa de la pérdida de las uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales (Isaacs-Ten et al., 2020; Liu et al., 2018; Modica et al., 2012). La pérdida de las uniones estrechas está fuertemente ligada a la sobreexpresión del TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , así como al reclutamiento de neutrófilos y macrófagos (Ido et al., 2005; Ikpa et al., 2020; Isaacs-Ten et al., 2020; Liu et al., 2018; Modica et al., 2012; Thompson et al., 2018). Isaacs-Ten et al. (2020), reportan que el colon es la zona del intestino más permeable y de mayor inflamación durante la colestasis, seguida por el íleon. Ante el aumento en la permeabilidad del intestino también se desencadena muerte celular por apoptosis a lo largo del intestino delgado y el colon, hallazgo observado en un modelo de ratones con ligadura del ducto biliar (Liu et al., 2018).

El modelo agudo de colestasis inducido por ANIT reportado por Salas-Silva et al., (2020) no ha reportado evaluaciones en el intestino, sin embargo Sukhotnik y colaboradores (2012) observaron algunos cambios fisiológicos en un modelo murino con tratamiento agudo de ANIT, pérdida de la mucosa intestinal, disminución del

tamaño de las vellosidades así como la profundidad de las criptas intestinales, están afectadas por la disminución en la proliferación y el incremento de la apoptosis.

Ante el daño intestinal se pueden desencadenar factores que revierten el daño como HGF/c-Met. Se ha reportado que HGF/c-Met tiene relevancia experimentalmente en cultivos de criptas intestinales murinas como un análogo de la actividad del EGF el cual es importante para la proliferación, sobrevivencia y diferenciación celular (Joosten et al., 2017b). De igual forma, se ha descrito la relevancia del HGF en la regeneración de la mucosa intestinal y proliferación celular en modelos experimentales de colitis (Ido et al., 2005). El impacto directo del HGF sobre la inflamación no ha sido demostrado, no obstante, se considera que es consecuencia de la recuperación de la barrera intestinal (Ido et al., 2005).

Con base a lo anterior es importante conocer la relación que existe entre el daño colestásico y la integridad y función intestinal en todos sus segmentos, así como determinar si el HGF es capaz de inducir efectos protectores como se ha observado en otros órganos.

### **3. Justificación**

Las enfermedades colestasicas a diferencia de otras patologías hepáticas reciben una menor importancia y debido a esto, son pocos los trabajos dedicados a conocer y proponer nuevas estrategias para el tratamiento de la colestasis.

A pesar de esto, actualmente se sabe que las enfermedades colestasicas se encuentran asociadas a otras patologías intra y extra hepáticas entre ellas, enfermedades virales como la hepatitis B y C, enfermedad del hígado alcohólico, enfermedades infecciosas, efectos hormonales del embarazo, síndrome de intestino corto, disbiosis intestinal, la coledocolitiasis, pancreatitis y cáncer de páncreas; mismas en las que la colestasis podría estar siendo la principal causante o bien contribuyendo al agravamiento de la enfermedad.

Por esta razón y con los estudios anteriormente mencionados el presente trabajo pretende analizar los efectos del HGF en un modelo agudo de colestasis inducido por ANIT mismos que nos ayudarían a obtener mas información sobre las afectaciones a



nivel intestinal y posteriormente poder proponer elemento del mecanismo de HGF para el tratamiento de la enfermedad colestasica.

#### **4. Hipótesis**

El factor de crecimiento de hepatocitos ejercerá protección intestinal ante el daño colestásico inducido por el ANIT en ratones.

#### **5. Objetivo general**

Caracterizar el efecto protector del HGF en el intestino de ratones sometidos al daño colestásico inducido por ANIT.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Determinar el daño colestásico inducido por ANIT en ratones.
2. Caracterizar el impacto del daño colestásico inducido por ANIT en el Intestino y el efecto protector del HGF.
3. Evaluar la inflamación del intestino ante el efecto colestásico y el efecto del HGF.
4. Cuantificar la muerte por apoptosis en el modelo de daño con ANIT y el efecto protector del HGF
5. Determinar el estado oxidante que mantiene el epitelio intestinal en respuesta al tratamiento con ANIT y el efecto del HGF en el estado redox.

#### **7. Material y métodos**

##### **7.1 Diseño experimental**

El desarrollo de este estudio se llevó a cabo basándonos en el modelo de colestasis en ratones reportado en el grupo por Salas-Silva, (2020). Para trabajar este modelo se usaron ratones macho de la cepa CD-1, entre 10-12 semanas de edad. Todo el estudio estuvo apegado a la guía de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH) para el cuidado y uso de Animales de laboratorio y a la Norma Oficial Mexicana (NOM,) NOM-062-ZOO-1999. Se trabajó con 20 animales que se dividieron

aleatoriamente en cuatro grupos de acuerdo con los tratamientos (NT, ANIT, ANIT+HGF y HGF).

Los ratones fueron sometidos a un tratamiento de 48 h (Figura 5). Se trataron con una dosis de ANIT intragástrica (ig) de 60 mg/kg (Sigma Aldrich, USA, #N4525), diluido en aceite vegetal. Después de 24 h de iniciado el tratamiento con ANIT se administró el HGF 10  $\mu$ g/kg intravenoso (iv) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA, #100-39). A los ratones control se le administró la misma dosis únicamente con el vehículo, finalmente, cada ratón se alojó en jaulas metabólicas en las ultimas 12 h de tratamiento con agua *ad libitum* con el fin de la obtención de materia fecal y orina. Posterior a las 48 h se llevó a cabo la eutanasia bajo anestesia con isoflurano (2% isoflurano y 2 L/min de oxígeno). Se obtuvo sangre, tejido hepático e intestinal.

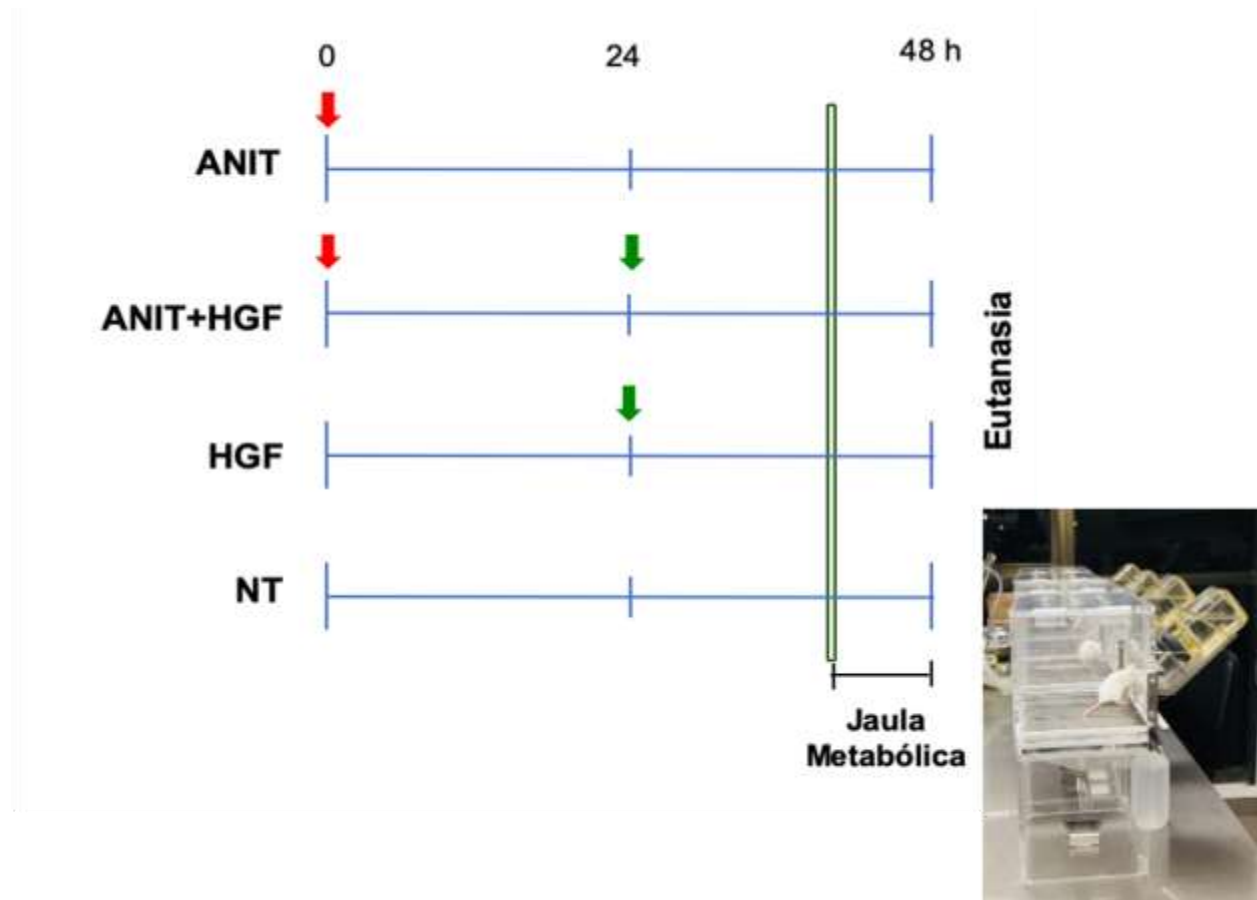


Figura 5. Diseño experimental del estudio. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) se usó a una dosis de 10  $\mu$ g/Kg (iv) y el ANIT se administro a una dosis de 60 mg/kg (ig).

El tejido intestinal se diseccionó en 4 secciones: duodeno, yeyuno, íleon y colón. Para que la recolección del tejido intestinal se hiciera de manera adecuada se tomó en cuenta la guía reportada por (Ruehl-Fehlert et al., 2003), quien resume las diferentes localizaciones del intestino murino (Figura 6).

- Localizations:
- 1) Duodenum: 1 cm distal to the pyloric sphincter
  - 2) Jejunum: central section
  - 3) Ileum: 1 cm proximal to cecum
  - 4) Cecum
  - 5) Colon: central section
  - 6) Rectum: 2 cm proximal to the anus

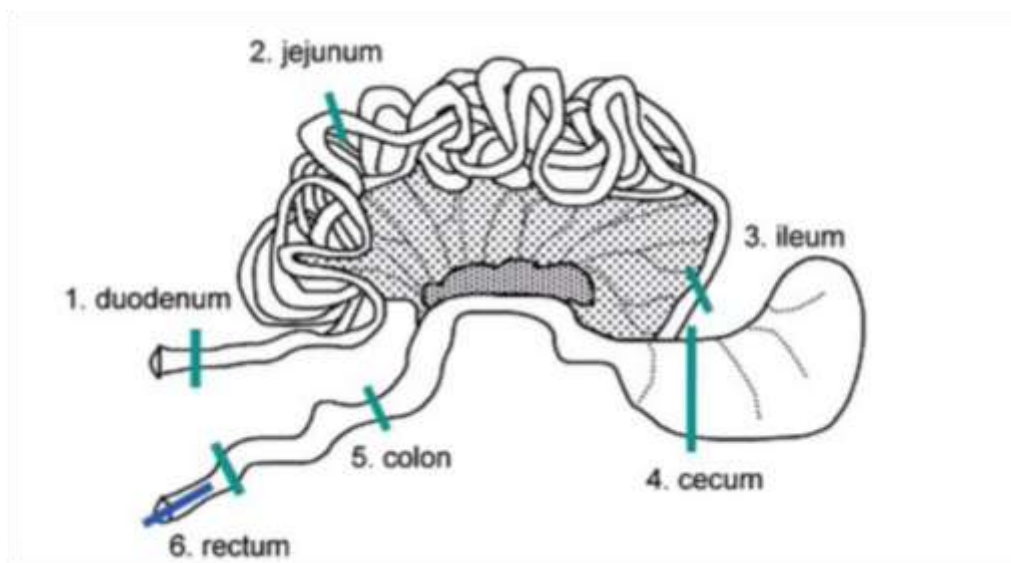


Figura 6. Tejido intestinal seccionado en sus diferentes áreas. Tomado y modificado de Ruehl-Fehlert C, et al. 2003.

## 7.2 Evaluación histológica.

La evaluación histológica se llevó a cabo recuperando el intestino y lavándolo con solución salina isotónica (NaCl 0.9%), inmediatamente el tejido fue almacenado en formaldehído al 4%. Las muestras se embebieron en parafina y se obtuvieron los cortes en un portaobjetos. Para las tinciones, los portaobjetos con el tejido se mantuvieron

durante 10 minutos a 60°C y se desparafinaron con xilol por 10 minutos. Para rehidratar el tejido se sumergieron los cortes en un tren de alcoholes que fue del 100 % al 70 % para finalmente hidratar en agua, cada uno por 5 minutos.

El tejido se tiñó con hematoxilina de Harris por 5 minutos y se enjuagó con agua por otros 5 min. Para observar la coloración azul se sumergió el portaobjetos en HCl-EtOH al 96 % y en agua amoniacal, preparada con 200 mL de agua destilada con 3-4 gotas de amoníaco. En seguida se enjuagó con agua corriente y destilada, por 2 min cada una. Para proseguir se añadió eosina alcohólica durante 2 minutos. Para deshidratar el tejido se utilizó una serie de alcoholes de manera reversa (70 %-100 %) hasta finalizar con xilol. Los cortes deshidratados se montaron con Dako Cytomation (Salas-Silva, 2016).

### 7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)

Para la cuantificación de la expresión de ARNm, se llevó a cabo el aislamiento de ARN total usando el reactivo TRIzol (# 15596018, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) como indica el proveedor.

La retro-transcripción se realizó usando el kit de síntesis de cDNA iScript (# 1708891 Bio-Rad) mezclando 1 µg de ARN total, 4µL del Mix 5x iScript y 1 µL de la transcriptasa reversa iScript en 20 µL de volumen de reacción. Una vez obtenido el cDNA se realizó el análisis de RT-qPCR en tiempo real.

Para la reacción RT-qPCR se preparó una reacción de 10 µL de volumen total la cual incluía 1µg de cDNA, 2 µL de primers sentido y anti-sentido, así como 5 µL de SYBR Green 2x supermix (# 172-5016 Bio-Rad Laboratories, EE. UU.).

De acuerdo con el protocolo de reacción se incubó las muestras durante 10 min a 95°C, después se mantuvo por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 60 segundos a la temperatura específica según el cebador. Como control de la amplificación se usó el nivel de expresión de la proteína ribosómica S18 y se calculó la expresión absoluta por el método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Para todas las reacciones se utilizó un termociclador CFX96 Touch (Bio-Rad).

**Tabla 1.** Secuencia de primers utilizados para evaluación de la inflamación a nivel ARNm.

Nombre	Forward	Reverse
--------	---------	---------

<i>il-6</i>	<i>AGTTGCCTTCTTGGGACTGA</i>	<i>TCCACGATTTCCCAGAGAAC</i>
<i>il1-beta</i>	<i>GGGCCTCAAAGGAAAGAATC</i>	<i>TACCAGTTGGGGA ACTCTGC</i>
<i>tnf-alfa</i>	<i>GCTGAGCTCAAACCCTGGTA</i>	<i>CGGACTCCGCAAAGTCTAAG</i>

#### 7.4 Contenido proteico de enzimas antioxidantes

La extracción de proteínas del tejido intestinal se realizó mediante sonicación en frío. Posteriormente se centrifugó a 8900 X g durante 1 min a 4°C. La pastilla obtenida se re-suspendió con 200µl de buffer de lisis T-PER (#78510 Pierce Chemical, EUA) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (#11836145001 Roche, Francia).

Las muestras se sometieron a agitación en un vortex y se incubaron por intervalos de 10 min para volver a centrifugar a 17000 X g por 10 min a 4°C.

Para la cuantificación de la proteína se utilizó un kit de BCA (Pierce Chemical, E.U.A.) y se calculó la cantidad de proteína tomando como referencia una curva de albumina.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 15% en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1% a un voltaje de 120V por 90 min. Posteriormente se realizó una transferencia húmeda en la que se utilizaron membranas de PVDF (#10600021 Life Science, Alemania) activadas con metanol frío. La transferencia se dejó a un voltaje de 120V por 90 min.

Una vez que las proteínas fueran transferidas a la membrana, se realizó un bloqueo de zonas inespecíficas con leche descremada al 5% disuelta en un buffer de Tris-salino con Tween 20 (TBST) y se incubó la membrana durante 1h en agitación. Por último, se incubaron los anticuerpos (Tabla 2) toda la noche a 4°C en movimiento.

**Tabla 2.** Lista de anticuerpos utilizados para la evaluación del contenido proteico.

Anticuerpo	Catálogo	Marca	Dilución
Glutación peroxidasa 4 GPx4	#sc-166570	Santa Cruz	1:1000
Superóxido dismutasa 1 SOD-1	#sc-17767	Santa Cruz	1:1000
Superóxido dismutasa 2 SOD-2	#sc-133134	Santa Cruz	1:1000
Catalasa	#C0979	Sigma-Aldrich	1:1000
Caspasa 3	#9661	Cell signaling	1:200

CD163	#ab182422	Abcam	1:200
F4/80	#ab60343	Abcam	1:200

Después del tiempo de incubación el anticuerpo secundario correspondiente se deja por 90 min, una vez transcurrido el tiempo la membrana se lavó 3 veces con TBST por 10 min. Las membranas se revelaron con una mezcla de peróxido de hidrogeno y luminol en una relación 10:1000 y se obtuvieron imágenes en un fotodocumentador GelLogic 1500 (Biostad, E.U).

### **7.5 Inmunofluorescencias (IF)**

La detección de la proteína F4/80 marcador para macrófagos se realizó con cortes histológicos embebidos en parafina, de tejido intestinal proveniente de ratones y pacientes. El tejido fue calentado a 60 °C por 5 min además se pasó por un tren de xilol e isopropanol para eliminar los restos de parafina e hidratar los cortes. Para la recuperación de antígeno, la muestra fue sumergida en un buffer de citratos durante 1h en baño maría y permeabilizada en 0.1% de Triton X-100 en PBS por 5 min en temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con 5% de suero de cabra o suero fetal bovino en PBS por 30 min.

Terminando el bloqueo la muestra se dejó en incubación a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario (Tabla 2). Al siguiente día se dieron 3 lavados de 10 min en PBS frio para eliminar excesos y en caso de que el anticuerpo lo requiriera, se incubó el anticuerpo secundario por 90 min a temperatura ambiente. Se dieron 3 lavados de 10 min en PBS y se añadió medio de montaje con DAPI (#H-1200 Vector Laboratories, U.S.A)

### **7.6 Inmunohistoquímicas (IHC)**

Los cortes histológicos de los tejidos pasaron por un proceso de desparafinación como previamente se ha indicado, se pasó por un tren de xilol e isopropanol. Una vez hidratados se delimitaron los tejidos con plumón hidrofóbico Pad-pen y se sumergieron en un buffer de citratos para exposición de antígeno por 1h a baño maría para dejar posteriormente dejar enfriar por 30 min. Los tejidos se permeabilizaron con 0.1% de

Triton X-100 en PBS o TBS por 10 min y con PBS o TBS por 5 min. Para desactivación de la peroxidasa endógena se trataron las muestras con peróxido de hidrogeno al 3% en metanol por 10 min y 3 con 1X PBS o TBS por 5min. Continuando el procedimiento, se incubaron las muestras por 1h en buffer de bloqueo preparado con suero de caballo al 2%, PBS 1X, 1% BSA, 0.01% Tritón-X diluido en agua destilada.

Para la detección del anticuerpo-antígeno primero se dejó en incubación el anticuerpo primario (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C, posterior al bloqueo. Al siguiente día se realizaron 3 lavados por 3 min con TBS-Tritón y se usó el Kit de detección (#ab64264 Abcam, US). Para contrastar la tinción se usó hematoxilina incubando en la muestra por 5 min y se hicieron lavados sumergiéndolas por tres ocasiones en agua destilada. Para fijar la muestra se pasó por el tren de isopropanol y xilol y se usó medio de montaje (#06522 Sigma-Aldrich, Alemania).

### **7.7 Tinción de Azul alciano**

Se preparó ácido acético glacial al 3 % en agua destilada para posteriormente diluir azul alciano 8GX (#A3157 Sigma, Alemania) al 1%. Para el procedimiento de tinción las muestras fueron desparafinadas sumergiéndolas en xilol y etanol al 100 %, 95 % y 70 %. Una vez hidratado se cubrió con ácido acético 3% por 3 min e inmediatamente se sumerge el tejido en la solución 1% azul alciano 3% ácido acético a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó el tejido en agua corriente por 5 min y se incubó con hematoxilina. La muestra se sumergió rápidamente en etanol absoluto y se dejó secar, previo al montaje y observación microscópica. Todas las observaciones al microscopio se realizaron con un microscopio invertido Carl Zeiss 780 LSM-NLO (Gena, Alemania).

### **7.8 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Para determinar la generación de ROS se realizó el ensayo de detección de la fluorescencia del dihidroetidio (DHE). La técnica fue realizada obteniendo tejido fresco embebido en OCT (#4583 Sakura Finetek, USA). Se hicieron criocortes histológicos inmediatamente y en el portaobjetos se dejó incubando con la sonda de DHE (DHE, 5 µM # D11347, Invitrogen, CA, EE. UU.) por 15 min en oscuridad y a temperatura

ambiente. Los tejidos se evaluaron por microscopia confocal (Carl Zeiss 780 LSM-NLO) a longitudes de onda de excitación de 485 nm y 570 nm de emisión.

### **7.9 Pruebas de función hepática**

La determinación de la alanina aminotransferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (ALP) y gama glutamil transpeptidasa (GGT) se realizó por medio de SpotChem (SpotChem EZ, ARKRAY, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **7.10 Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para el análisis de datos se utilizó el software Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.) para Mac iOS. La prueba de análisis de varianza (ANOVA) se usó para comparar los valores medios entre grupos. Todos los experimentos se realizaron con al menos tres repeticiones biológicas y tres repeticiones técnicas. La diferencia estadística se tomó con al menos un valor de  $p \leq 0.05$ .

## **8. Resultados**

Se decidió validar el modelo de colestasis intrahepática química inducida por ANIT a pesar de que nuestro grupo ha reportado previamente el modelo (Salas-Silva et al., 2020). La figura 7 muestra el aspecto macroscópico del hígado y la vesícula biliar. El hígado se muestra con un ligero cambio en su coloración en el tratamiento con ANIT, efecto restablecido con el tratamiento con HGF. Interesantemente, la vesícula biliar presentó cambios destacados el color de la bilis, pasando de un color ámbar a un color verde oscuro, indicando concentración de bilis y sugiriendo una disminución en su contenido.



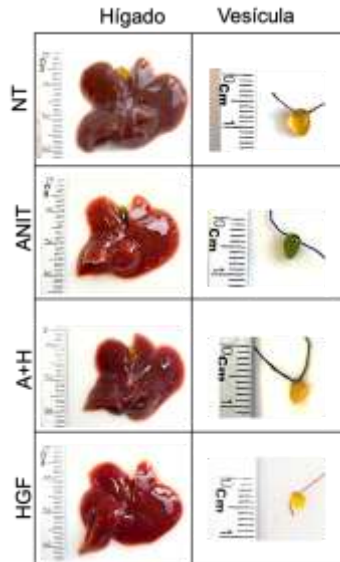


Figura 7. Efectos macroscópicos del daño colestásico del ANIT y el efecto protector del HGF. Imágenes representativas de al menos 3 ratones.

Con la finalidad de confirmar la colestasis, se midieron por métodos automatizados, las actividades séricas de la alanina aminotransferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (ALP) y gama glutamil transpeptidasa (GGT), siendo la primera prueba un marcador de daño hepatocelular, y las dos últimas de daño colangiocelular, indicando un compromiso de todo el sistema hepático (Figura 8).

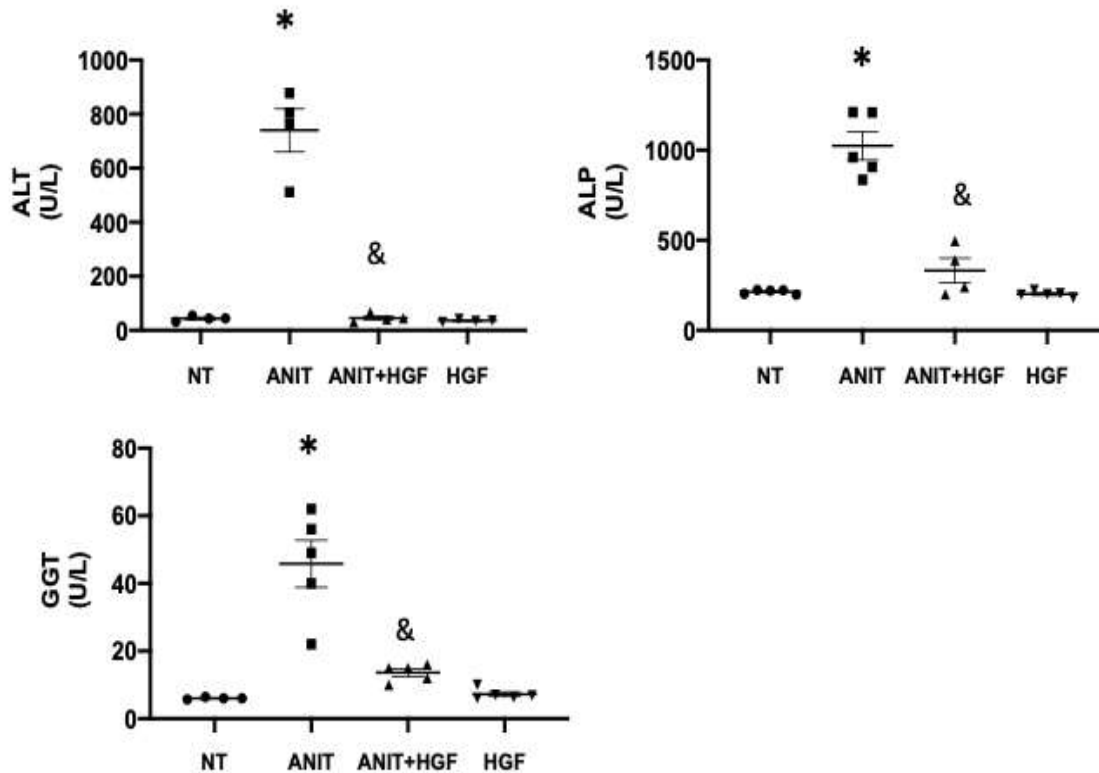


Figura 8. Marcadores de daño hepático y colestásico. Alanina aminotrasferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y gama glutamil transpeptidasa (GGT). Se muestra la media de al menos 4 animales de experimentación. \*  $p \leq 0.05$  vs NT. &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.

### 8.1 El modelo de colestasis aguda con ANIT induce daño a nivel intestinal y HGF lo protege.

Como parte de estudiar si el modelo de colestasis agudo reportado por Salas Silva (2020) comprometía la integridad del tejido intestinal, nos propusimos observar cambios indicadores de daño a nivel macroscópico. El intestino no mostró cambios significativos macroscópicamente (Figura 9).

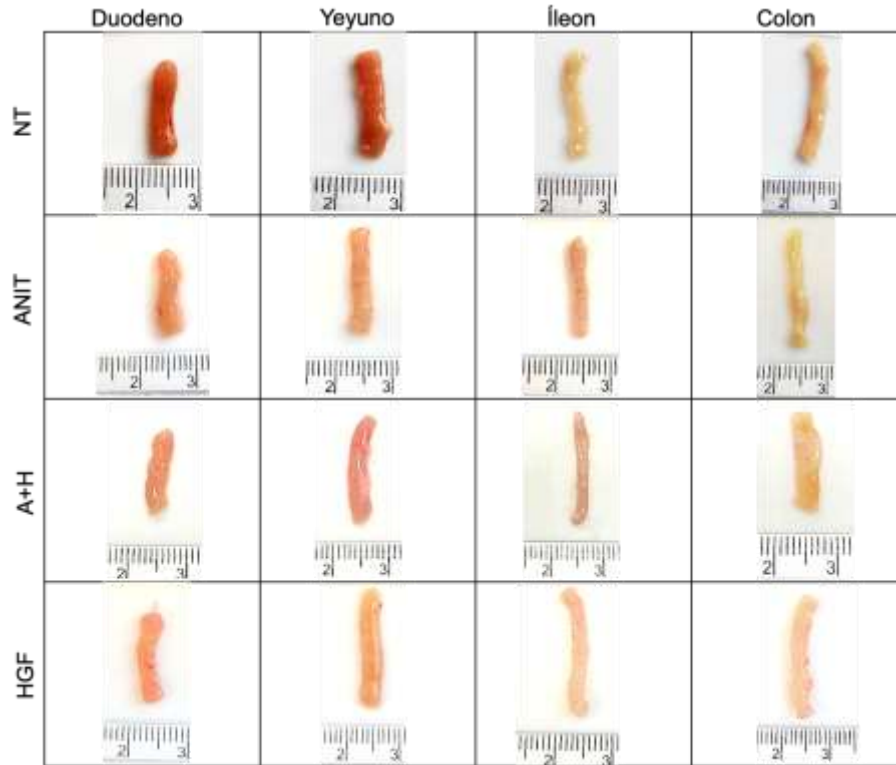


Figura 9. Visualización macroscópica del tejido intestinal en sus diferentes secciones (Duodeno, yeyuno, íleon y colon). En cada recuadro se observa el tejido extraído de ratones sometidos al tratamiento con sus respectivos controles. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación.

Las primeras valoraciones en el intestino delgado se realizaron a partir de observar cambios en la excreción de materia fecal en cada uno de los grupos. En la figura 10 se muestra la disminución de la cantidad de heces en aquellos ratones colestásicos (Figura 10), lo cual sugiere un cambio en la funcionalidad intestinal inducido por ANIT. Para evaluar microscópicamente los cambios en el tejido del intestino delgado se hicieron tinciones por H&E, las cuales indicaron una disminución del diámetro en el lumen y del engrosamiento de la pared intestinal al tratar a los animales con ANIT (Figura 11).

Este estrechamiento del intestino posiblemente sea la razón por la que se compromete el paso de la materia fecal a través del yeyuno.

De igual manera, los ratones que se trataron con ANIT y el HGF fueron evaluados para determinar el efecto del factor de crecimiento en el intestino. En donde no se determinó

un cambio significativo en la cantidad de heces excretadas en los ratones tratados con HGF, comparado a los ratones control y además el diámetro del lumen y el engrosamiento de la pared intestinal recuperaron la estructura similar a la de los ratones no tratados.

A)

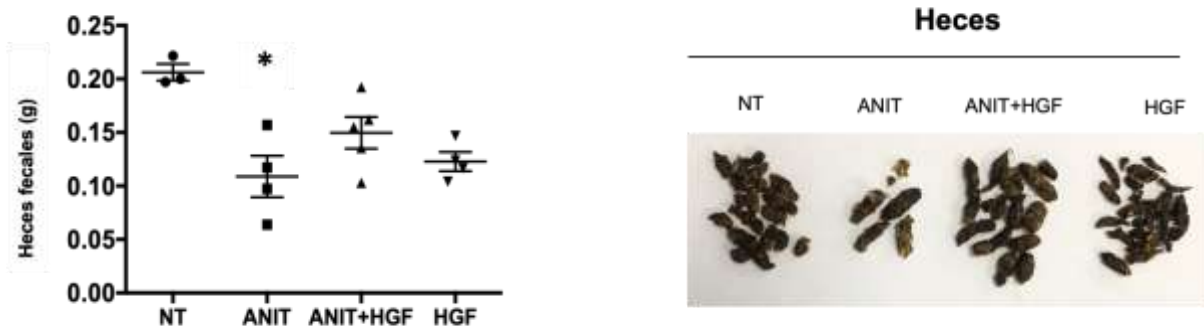


Figura 10. Disminución de heces excretadas en ratones sometidos al tratamiento agudo de ANIT. A) Recolección y cuantificación de heces fecales por ratón. Se recolectó heces fecales durante las 12 h finales del estudio. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. La gráfica muestra la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT.

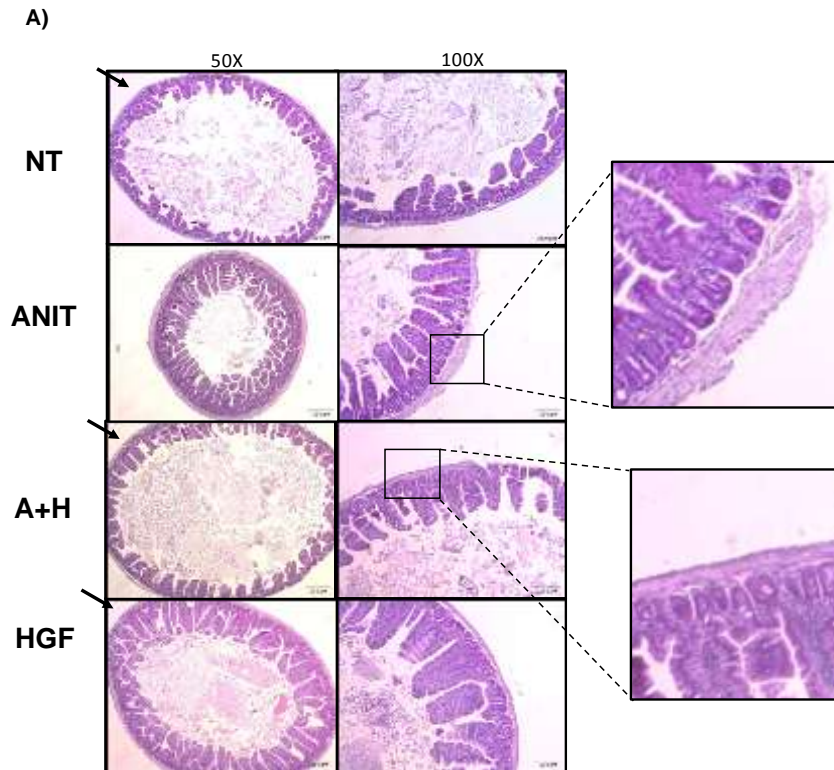


Figura 11. Arquitectura del yeyuno de ratones tratados con ANIT (60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), HGF (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o ambas dosis. A) Muestra tinciones H&E. Las flechas muestran el lumen de un tamaño similar al del NT. En el acercamiento se observa el grosor de la pared intestinal. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación.

## 8.2 HGF preserva el estado del tejido intestinal a nivel íleon y colon posterior a una colestasis aguda.

Durante la circulación enterohepática los ácidos biliares poseen un sistema de reciclamiento donde la expresión específica de transportadores ASBT y OST $\alpha/\beta$ , los cuales son encargados del reciclamiento de ácidos biliares en el íleon, hacen de este una zona de estudio de importancia en la enfermedad colestásica.

Por consiguiente, analizamos histologías de íleon (Figura 12A), el tamaño de la vellosidad (Figura 12B) y profundidad de la cripta (Figura 12C). Los resultados muestran que el íleon se afecta por el tratamiento con el ANIT; con diferencia de lo que ocurrió en los ratones con colestasis, los ratones co-tratados con HGF presentan valores normales de la profundidad de sus criptas y también se vieron favorecidos al incrementar el tamaño de su vellosidad como se observa en las figura 12.

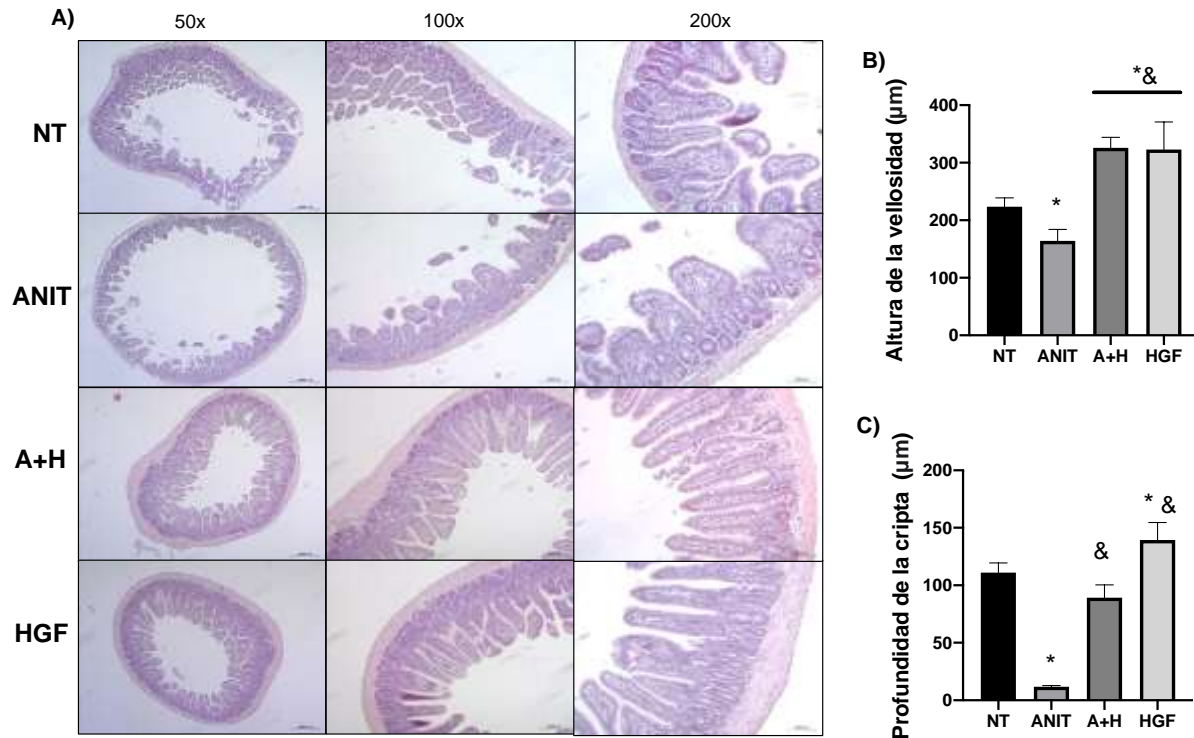


Figura 12. Restablecimiento del tejido intestinal en la administración de HGF a nivel íleon. A) muestra H&E a diferentes aumentos de la parte terminal del intestino delgado. B) tamaño de la vellosidad medido en micras a un aumento de 200x. c) profundidad de la cripta tomada en cuenta desde la base de la vellosidad medido en micras a un aumento de 200X. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT; &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.

Tanto el íleon como el colon compartieron eventos similares, se observó en el colon que las criptas incrementaron su profundidad como respuesta a la administración de HGF, con diferencia de los ratones de los grupos NT y ANIT (Figura 13).

Posteriormente nos enfocamos en conocer si el tejido estaba siendo funcional en cada uno de los tratamientos. El colon es una sección del intestino que depende fuertemente de su función secretora que va a prevenir la translocación de una gran cantidad de bacterias que se alojan dentro del lumen. Esto nos llevó a observar la secreción de mucinas como factor protector del colon y conocer si el HGF también afecto de manera directa o indirecta en este proceso. Lo que se observó fue un ligero pero significativo incremento en la secreción de mucinas en el colon como efecto de reparación por parte del HGF posterior al daño con el ANIT (Figura 14).

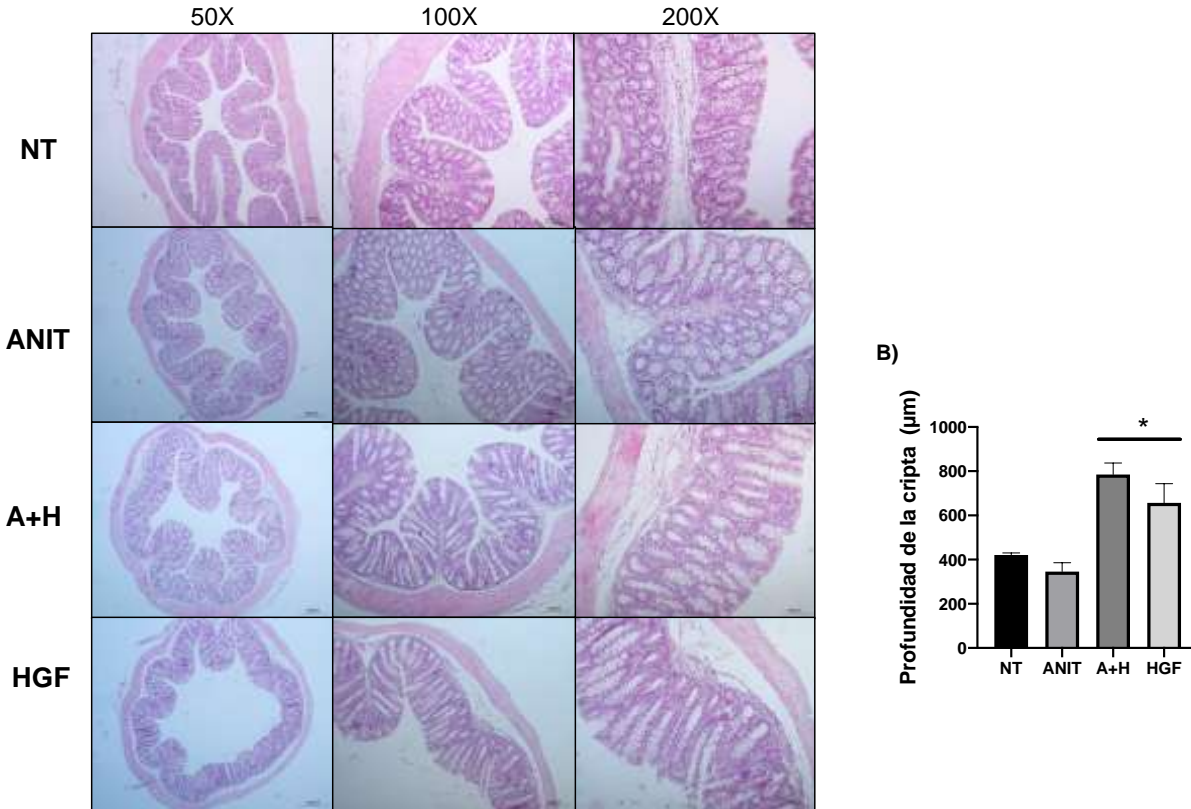


Figura 13. Protección en el colon por HGF por incremento en el tamaño de las criptas intestinales. A) muestra las tinciones con H&E en donde se pueden observar los cambios morfológicos en los 4 tratamientos. B) muestra el tamaño en micras de criptas modificadas por el tratamiento con ANIT y HGF evaluado a un aumento 200X. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT.



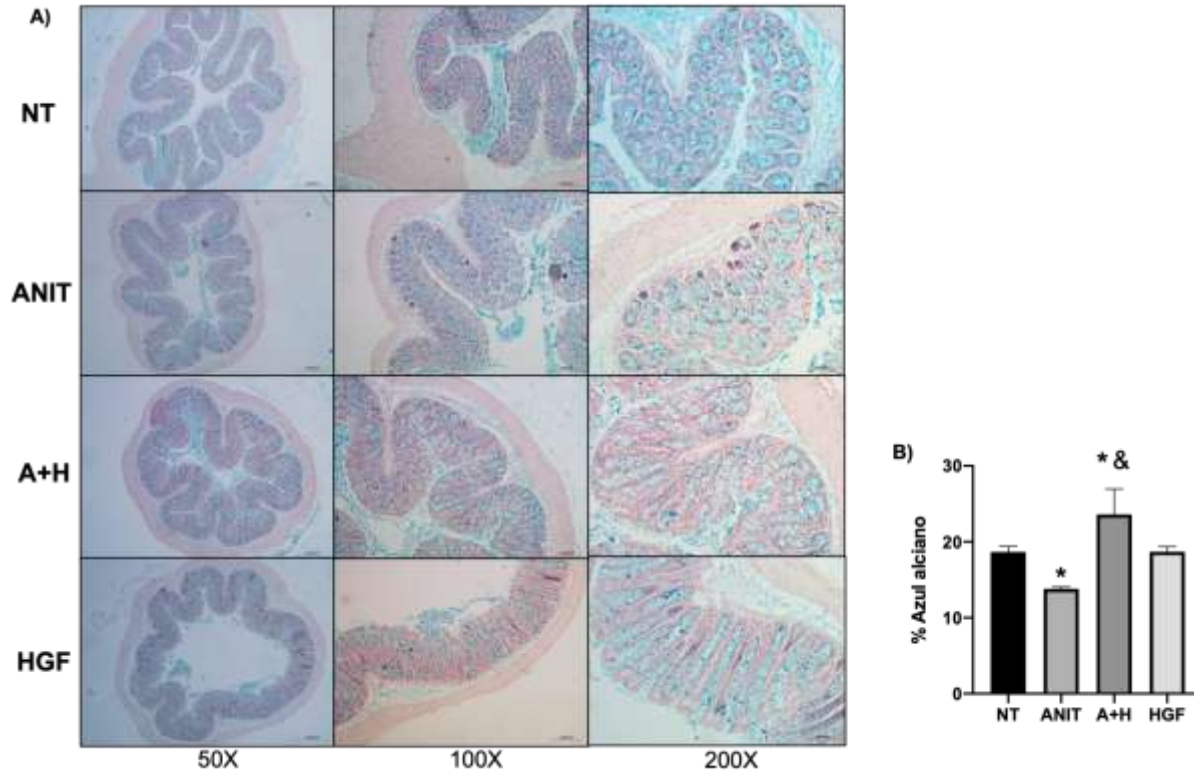


Figura 14. Contenido de mucinas determinado por tinción de azul alciano en el colon. A) Contenido de mucinas en el colon. B) Cuantificación de la tinción por el software Image J a un aumento de 200X. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT; &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.

Además de esto para saber si esta pérdida en la función secretora se debe a una supuesta muerte de las células que forman las criptas, se realizó una IHC para la determinación de la caspasa 3 activa, como marcador de muerte por apoptosis. La figura 15 muestra un incremento en la apoptosis de las células intestinales determinado por la caspasa 3 (flechas), lo que corrobora que en el tratamiento con el ANIT incrementa la pérdida de criptas. De manera favorable la administración de HGF evitó esta pérdida de criptas visto por la ausencia de la tinción (Figura 15) y además carencia de caspasa 3 activa en la IHC.



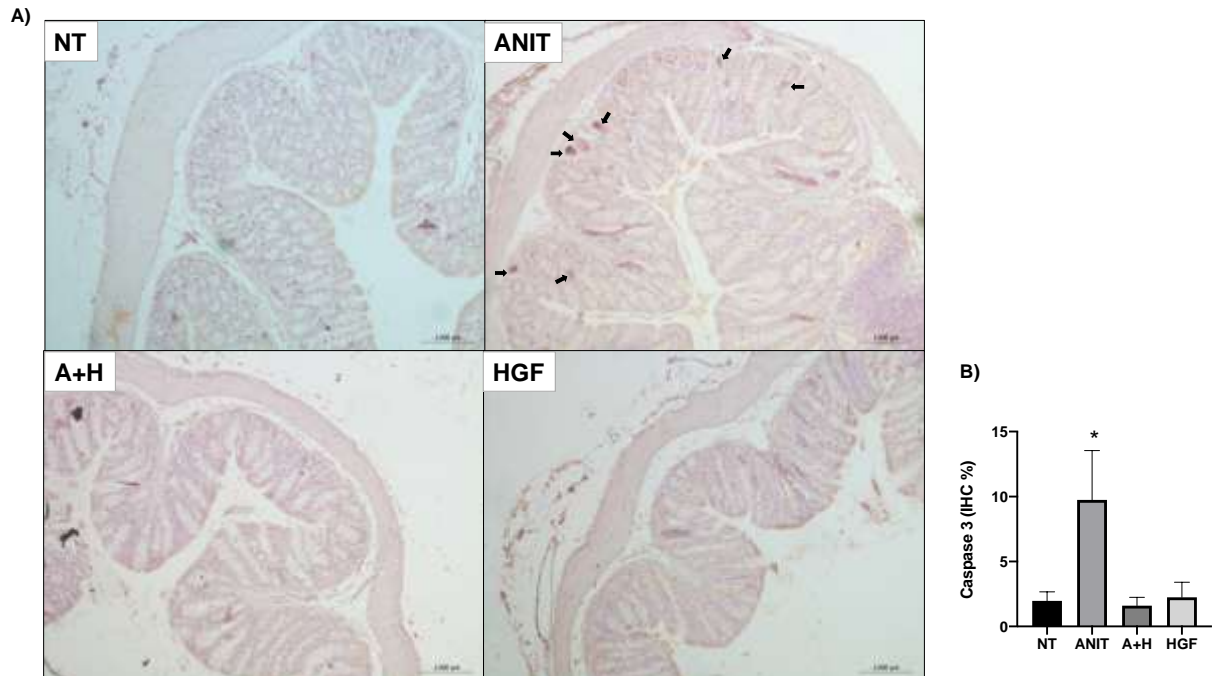


Figura 15. Apoptosis en el colon determinada por el contenido de caspasa 3 activa. La caspasa 3 activa disminuye como respuesta a la protección ejercida por el HGF. A) Muestra presencia de caspasa 3 en su forma activa por IHC en tejido de colon donde las flechas nos indican células apoptóticas. Imágenes representativas de al menos 3 ratones. Aumento original 100x

### 8.3 HGF regula la respuesta inflamatoria de acuerdo con los requerimientos del tejido.

Los ácidos biliares además de ser moléculas con propiedades para la emulsificación y solubilización de lípidos en el duodeno, pero también son moléculas en parte importantes en la señalización en el intestino, particularmente en el íleon y el colon. Los ácidos biliares son reguladores de la inflamación (Arias & Wiley, 2020). Por lo que decidimos evaluar parámetros de inflamación, así como el infiltrado inflamatorio en estos tejidos.

Se cuantificó la expresión, por qRT-PCR, de diferentes citosinas pro-inflamatorias como el *TNF- $\alpha$* , *IL-6* e *IL-1 $\beta$* . A nivel RNA mensajero a pesar de observar diferentes comportamientos no se obtuvo diferencia significativa.

Para indagar mas sobre el evento inflamatorio en el íleon, se realizaron inmunofluorescencias (IF) para detectar la presencia de células pro-inflamatorias figura 16 y 17. Los datos muestran que la cantidad de células positivas para el marcador

F4/80 incrementó en el tejido de íleon proveniente de ratones tratados con ANIT. De la misma forma, se demostró que los tratamientos con HGF devuelven a valores control el número de células inflamatorias (Figura 16).

A diferencia de lo que ocurrió en el íleon la presencia de células positivas para F4/80 incrementaron en el colon al tratamiento con HGF (Figura 17), sin embargo, para aclarar este comportamiento, como un marcado más específico determinamos por IHC la presencia de células positivas a CD163, un marcador de macrófagos M2.

El incremento de macrófagos con presencia de CD163, con actividad reparadora en el tejido fue evidente al tratamiento con HGF (Figura 18, cabeza de flechas).

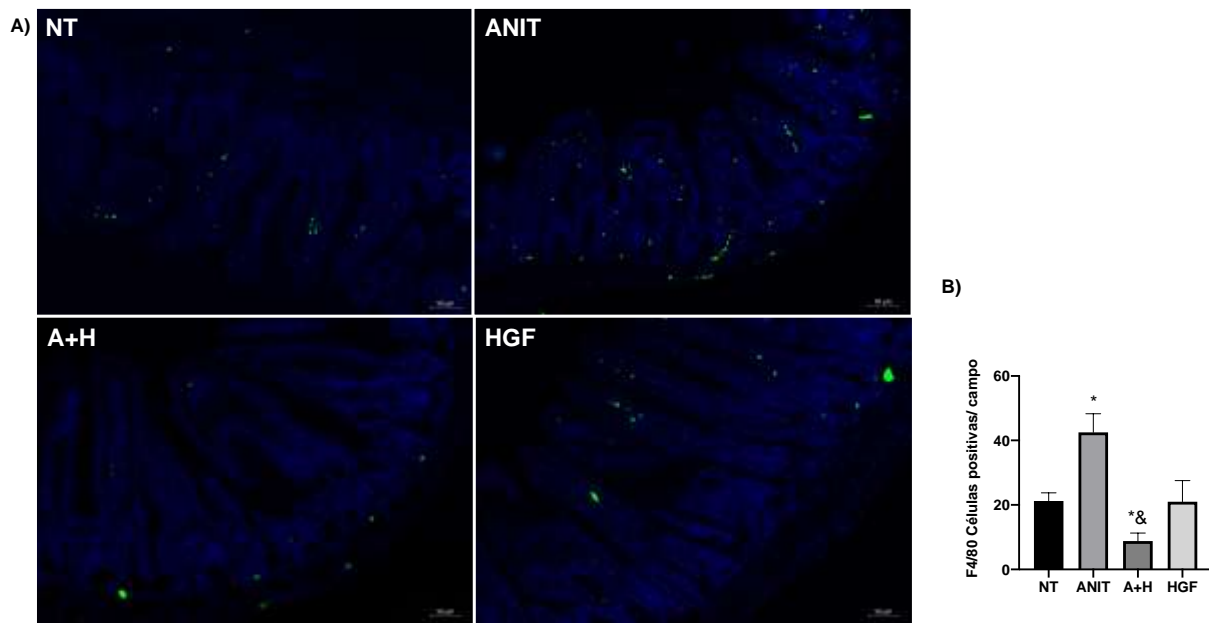


Figura 16. El HGF disminuye la inflamación en el íleon de ratones con colestasis. A) IF para F4/80 (verde) Dapi (azul). B) Gráfico de células positivas observadas por campo. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT; &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.

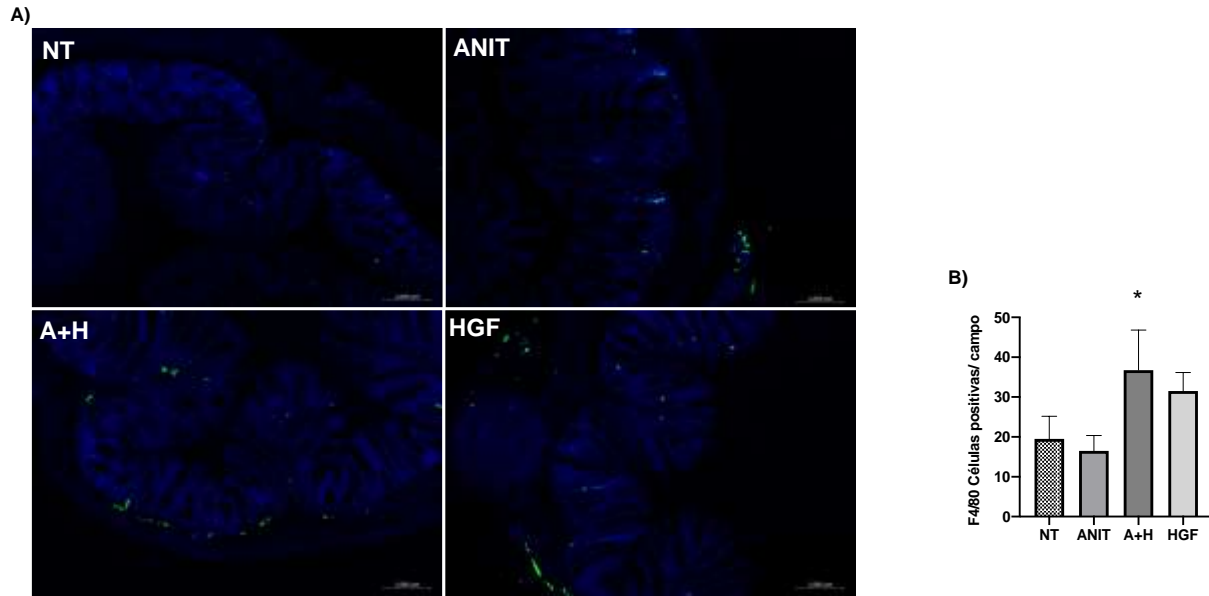


Figura 17. Incremento de la presencia de macrófagos en el colon. A) IF para F4/80 (verde) Dapi (azul). B) Gráfico de células positivas observadas por campo, se observa el incremento de respuesta por macrófagos en el colon. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT; &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.

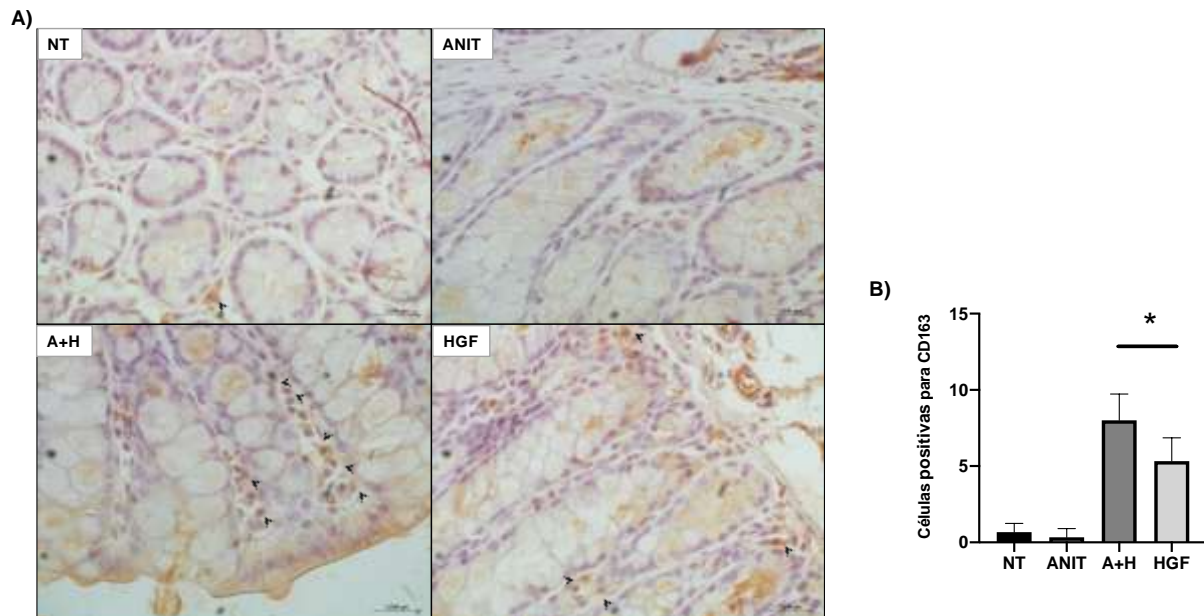


Figura 18. Presencia de macrófagos con actividad reparadora positivos para CD163 en colon, incrementan con el tratamiento de HGF. A) Muestra IHC con marcado con cabezas de flechas las células positivas para el marcador. B) Número de células marcadas por CD163. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación.

Después de las evaluaciones en ratones hasta este punto, pudimos obtener algunas muestras de pacientes con enfermedad colestásica para determinar si de igual manera el intestino estaba condicionado al daño como ocurrió en los ratones.

Se hicieron tinciones por H&E que nos permitieron observar características del tejido, de igual manera como anteriormente en los ratones con daño por ANIT, los pacientes presentaban acortamiento de vellosidades, además algunas de las muestras presentaban pérdida de criptas intestinales y en un acercamiento también se observó presencia de neutrófilos y eosinofilos (Figura 19).

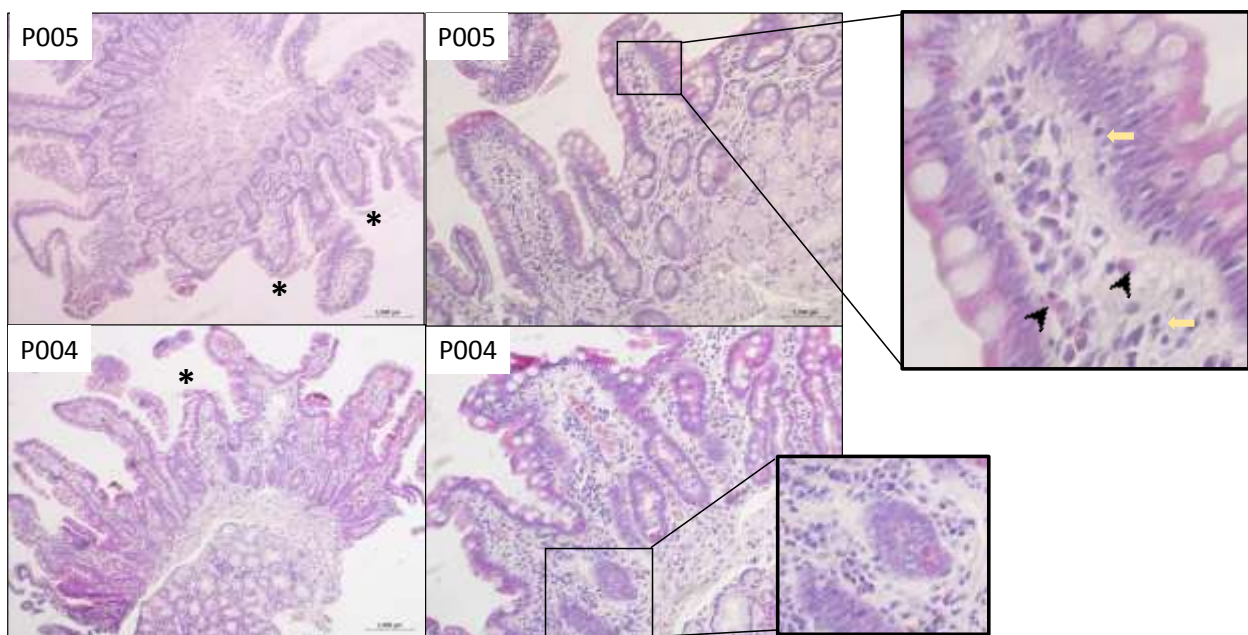


Figura 19. Evaluación de duodeno de pacientes con enfermedad colestásica. A) Muestra imágenes del tejido de pacientes. Las imágenes muestran acortamiento de vellosidades (\*). Del lado derecho se muestra acercamiento en el que se observa presencia de neutrófilos (flechas amarillas) y eosinofilos (cabezas de flecha). De la misma forma, en el acercamiento de la parte baja se observa la pérdida de criptas. Las imágenes son representativas de 6 pacientes evaluados de 16 obtenidos.

#### **8.4 El manejo de las especies reactivas de oxígeno por HGF juegan un rol importante para la protección del epitelio.**

Para dilucidar los mecanismos por los que HGF estaba protegiendo al intestino, procedimos a estimar como se encontraba la regulación redox en estas dos secciones de estudio. Primero se determinó el contenido proteico de la superóxido dismutasa 1 y

2 (SOD1-SOD2) ya que son la primer respuesta ante la generación de anión superóxido para transformarlo en peróxido de hidrogeno en los pasos de la respuesta antioxidante.

Lo que obtuvimos fue el incremento de SOD1 y SOD2 ante la presencia de HGF en el íleon y colon, sin embargo, el incremento en la tasa de formación de anión superóxido o peróxido de hidrogeno aun representan un peligro a nivel celular (Figura 20A).

Por lo tanto, para demostrar que el incremento de SOD era realmente para dirigir a una respuesta antioxidante en el intestino, evaluamos el contenido de glutatión peroxidasa 4 (Gpx4) la cual dirige en su último paso la formación de peróxido de hidrogeno en agua. Lo que observamos fue que posterior al daño con ANIT, el HGF incrementó el contenido de Gpx4 para responder al incremento de ROS tanto en el íleon como en el colon. Interesantemente la cuantificación proteica de catalasa no tuvo cambio significativo (Figura 20A).

Mas adelante, para corroborar la presencia de ROS en el epitelio y dar mayor sustento se decidió llevar a cabo la cuantificación de anión superóxido por medio de DHE.

Consistentemente, la generación de ROS en los ratones tratados con HGF posterior al daño con ANIT disminuyó significativamente la presencia de anión superóxido. A diferencia de los ratones administrados con ANIT en los que observamos un claro incremento del ROS (Figura 20B-C).

El mismo ensayo por DHE fue realizado en tejido fresco correspondiente al colon, en la Figura 21 se puede observar que de manera similar a lo que obtuvimos en el íleon, los tratamientos en los que se administró HGF hubo una disminución de generación de anión superóxido mientras que los tratamientos con el ANIT incrementaron la fluorescencia por DHE.

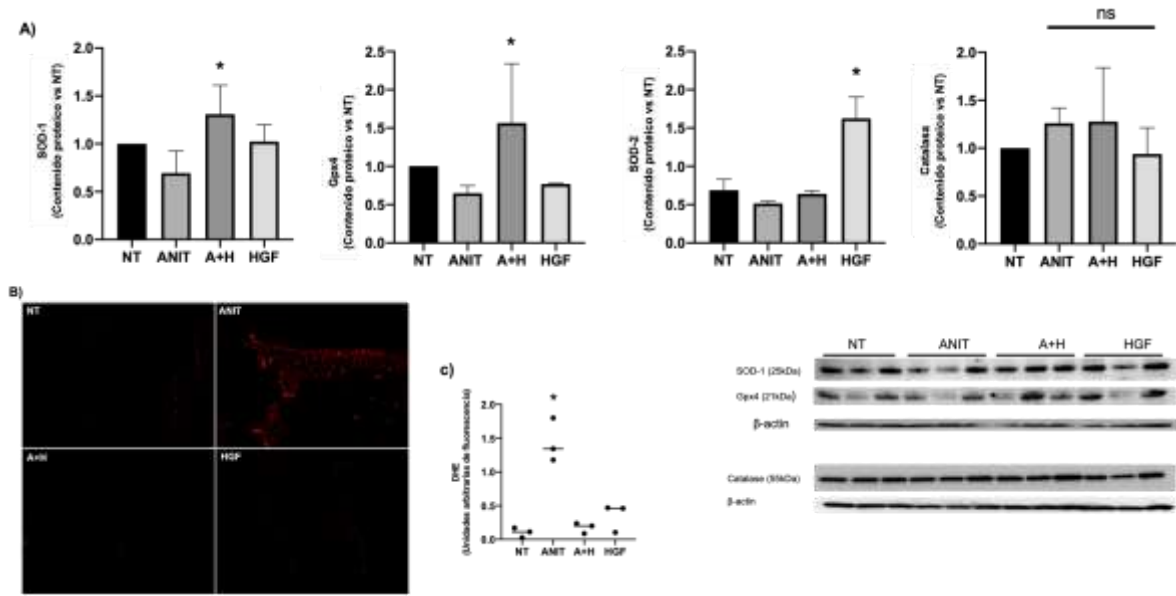


Figura 20. Regulación redox como parte de la protección de HGF al íleon. A) contenido proteico de enzimas antioxidantes en cada tratamiento. B) muestra un panel representativo de la tinción por dihidroetidio. C) cuantificación de ROS generadas por anión superóxido. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT; &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.



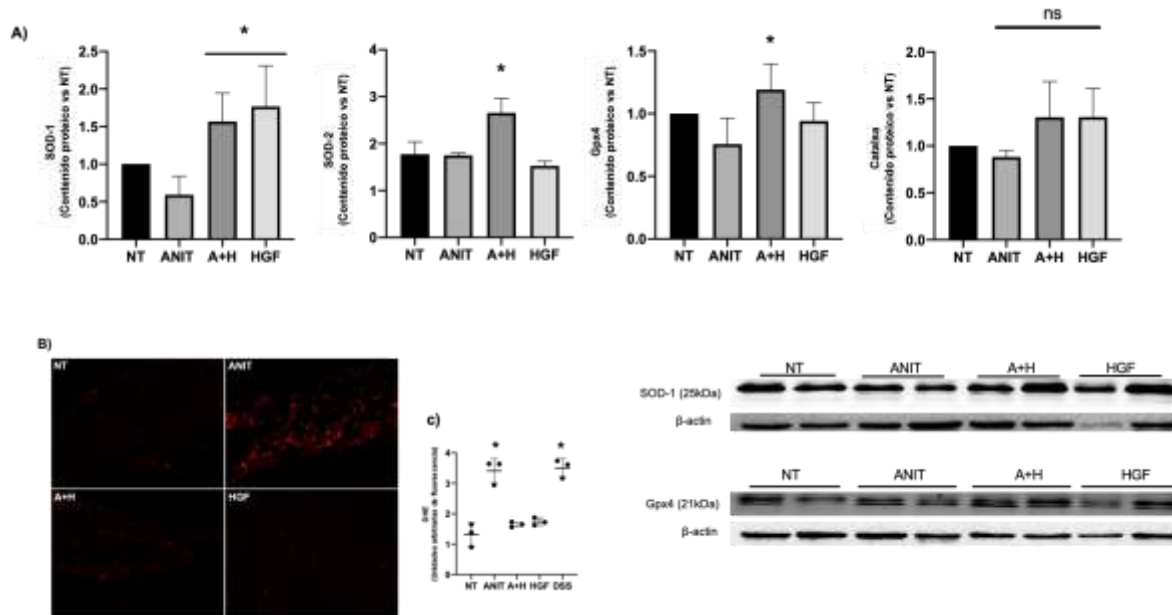


Figura 21. Regulación de ROS en el colon. A) muestra el contenido proteico de enzimas antioxidantes mediante Western blot. B) Panel representativo del ensayo por dihidroetidio. C) cuantificación de la tinción derivada de la presencia de ROS en el tejido. Las imágenes son representativas de al menos 3 animales de experimentación. Los histogramas muestran el promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). \*  $p \leq 0.05$  vs NT; &  $p \leq 0.05$  vs ANIT.

## 9. Discusión

En diferentes estudios se ha reportado que los ácidos biliares son importantes reguladores metabólicos, y debido a ello es que son objeto de investigación en diversas patologías como el NASH (Gillard et al., 2022), el NAFLD (Dai et al., 2021), la diabetes (Ballan & Saad, 2021), la obesidad (Lin et al., 2019) y la pancreatitis (Muili et al., 2013), por mencionar algunas. Encontrar blancos terapéuticos dirigidos a regular la homeostasis de ácidos biliares o bien, disminuir los daños causados por estos en la patología es de suma importancia para la atención clínica. Ya que aproximadamente un 30% de los casos de DILI se convierten en una complicación colestásica (Y. C. Yu et al., 2017), porcentaje que probablemente es sobreestimado en la realidad (García-Cortés et al., 2020).

Una de las características en la enfermedad colestásica es la consecuente falla de otros órganos. De manera implícita el daño hepático, pero también se ha reportado la deficiencia renal e intestinal en esta patología. En diferentes publicaciones del grupo de

investigación, se ha reportado sobre los mecanismos de una colestasis aguda inducida por ANIT. Un modelo en el que se ha observado daño hepático, aparición de zonas necróticas e incremento de infiltrado inflamatorio; sin embargo, en investigaciones previas se demostró también el daño a nivel renal (Salas-Silva et al., 2020).

En ambos casos, para disminuir o contrarrestar los efectos ocasionados por el ANIT se ha propuesto la administración del HGF, ya que este es una proteína que se ha presentado como un importante regulador de ROS, de reparación y supervivencia, además que sus efectos protectores no solo se limitan al daño colestásico, sino que también se han observado efectos positivos en otros modelos de daño hepático (Domínguez-Pérez et al., 2016), de pancreatitis (Palestino-Domínguez et al., 2018) y en tuberculosis (Bello-Monroy et al., 2020).

Las afectaciones generadas por la acumulación de ácidos biliares generan una explosión de ROS por el efecto tóxico en las células hepáticas. Mismo efecto que se controla en presencia de HGF por medio de la activación del factor de transcripción Nrf2 y sus genes blanco, muchos de ellos relacionados con proteínas antioxidantes, anti-apoptóticas y de reparación, y particularmente en la expresión de transportadores que pueden favorecer el flujo biliar.

Interesantemente, los efectos reportados en colestasis por Salas-Silva (2020) sugieren fuertemente efectos coleréticos, lo que abre la posibilidad potencial de su impacto en la resolución de la enfermedad, no solo controlando estrés oxidante, sino también haciendo más eficiente el flujo biliar.

En consecuencia, los resultados obtenidos en hígado se extrapolaron al riñón, donde HGF controló el estrés oxidante en ambos órganos mejorando su estado y funcionalidad, como lo muestra la tesis de Salas-Silva (datos no publicados, Salas-Silva, 2022, en progreso).

Dado que el intestino es otro de los órganos con alteraciones por la desregulación de ácidos biliares, el objetivo de este estudio fue determinar si el efecto protector de HGF se extendía de la misma forma hasta el intestino de ratones sometidos al daño.

En las primeras observaciones del intestino como se describe en la figura 11, se observó un evento de engrosamiento de la pared del intestino, así como un evidente estrechamiento del lumen en yeyuno de ratones tratados con ANIT. Este evento se ha



reportado en pacientes con la enfermedad intestinal de Crohn y se asocia al incremento en la inflamación y fibrosis (Alfredsson & Wick, 2020; Rieder et al., 2018). Tanto la fibrosis como el engrosamiento de las paredes de músculo liso dirigen a una constricción del intestino asociado a síntomas de obstrucción en pacientes (Alfredsson & Wick, 2020).

Como podemos observar en la figura 10, los ratones tratados con ANIT mostraron tener una deficiencia en la excreción de materia fecal lo que podemos relacionar con un evento de obstrucción intestinal que nos ayudó a corroborar el daño del tejido. Por el contrario, cuando los ratones fueron co-tratados con HGF el tejido conservó el lumen intestinal además de evitar el engrosamiento de las paredes intestinales, es decir, regulando la inflamación y fibrosis que podría estar desencadenando el modelo de colestasis.

De forma paralela, Isaacs y colaboradores (2020) reportaron que una colestasis inducida por ANIT provoca una mayor permeabilidad del colon por la disminución de la expresión de sus uniones estrechas.

Por otra parte, la reabsorción de sales biliares en el íleon por circulación enterohepática provoca que sea una de las áreas más estudiadas en las enfermedades colestásicas. Se ha observado que cuando se reduce la cantidad de ácidos biliares liberados al intestino por una ligadura del ducto biliar esto se acompaña de una disminución en el transporte de ácidos biliares ileal (Dumaswala et al., 1996). Cabe mencionar que la reducción en la expresión de los transportadores responsables del movimiento de ácidos biliares favorece la permeabilidad y por supuesto el daño intestinal (Zhang et al., 2011)

Si bien nosotros observamos un efecto positivo del tratamiento con HGF a nivel yeyuno, debido a lo anteriormente descrito fue que dirigimos nuestra investigación a estas dos áreas en particular para conocer si HGF pudiera proteger de manera más eficiente al epitelio susceptible al daño.

En el tratamiento que se observó el daño al íleon Figura 12, la presencia de HGF promovió la regeneración del epitelio afectado por el tratamiento con ANIT generando vellosidades con un mayor tamaño, además los ratones control para HGF demostraron el mismo efecto lo que se traduce como una mejor funcionalidad del epitelio.

De hecho, se ha reportado que la señalización por RTKs regula la homeostasis y regeneración intestinal por medio de receptores como EGFR y MET (Joosten et al., 2017). En nuestro modelo bajo condiciones de estrés el tratamiento de HGF podría estar jugando un rol protector por diferentes blancos, sugiriendo que la renovación, disminución de la muerte celular en el epitelio y la diferenciación son algunos de los mecanismos de protección.

Interesantemente en el colon se repitió el incremento de la profundidad en las criptas Figura 13, acorde con lo reportado anteriormente, donde HGF incrementa la proliferación para la reparación de criptas y recupera la secreción de mucosa en el daño agudo intestinal en ratas (Choda et al., 2004).

Dentro de la lámina propia intestinal, la formación de criptas conlleva la funcionalidad de diferentes tipos celulares, una de las observaciones en las histologías fueron algunas zonas donde se mostró la pérdida de criptas intestinales. Especialmente el colon es un área que depende mucho de la presencia de estas criptas y de que estas estén funcionales ya que no se encuentra dotado de vellosidades. Lo que se demostró fue que un incremento en la presencia de la caspasa 3 en su forma activa indicó que hay una mayor tasa de muerte celular por el daño causado por ANIT, y contrario a esto pudimos observar y fortalecer la hipótesis de que los ratones que fueron co-tratados con HGF dirige la disminución en la muerte celular programada a nivel intestinal.

Las células caliciformes y Paneth secretan mucosa y péptidos antimicrobianos, respectivamente, lo que hace que la secreción de mucinas regule el paso de agentes patógenos y sean iniciadores de procesos inflamatorios (Peterson & Artis, 2014).

Para indagar si HGF tiene impacto en el proceso de secreción de mucosa visto como un factor de protección, realizamos la tinción de azul alciano, la cual nos permitió observar la presencia de mucinas ácidas secretadas por células caliciformes presentes en las criptas. Nuestros resultados muestran el incremento de la secreción de mucina en los ratones A+H, que pudimos observar de manera más detallada en un aumento de 200x, el cual fue mayormente estimulada como una consecuencia del daño previo con ANIT y en respuesta al co-tratamiento con HGF.

Para el colon es muy importante mantener la integridad de la secreción de mucosas, ya que aquí se encuentran una gran cantidad de bacterias y este proceso le confiere una primer barrera contra la translocación bacteriana (Johansson et al., 2008). Corroborar la translocación en el intestino es uno de los eventos que sin duda debe ser evaluado para fortalecer nuestro resultado.

Como se mencionó anteriormente, la mucosa está estrechamente relacionada con la respuesta inmunológica y por lo que sugieren nuestros resultados la presencia de HGF afecta el proceso inflamatorio. Por una parte, en el íleon HGF disminuyó el número de células positivas para el marcador F4/80, mientras que extrañamente en el colon estas células incrementaron al tratar con el factor de crecimiento. Para corroborar lo que extrañamente observamos en el colon por medio de una inmunohistoquímica pudimos observar que la presencia del marcador para CD163 incremento en los ratones tratados con HGF por lo que determinamos que después del daño, HGF es capaz de mejorar el estado del intestino grueso por un reclutamiento de macrófagos de reparación de manera similar a lo que se ha observado en tejido renal (Yoshimine et al., 2021) además HGF tuvo una respuesta diferencial ya que, una mayor presencia de macrófagos M2 (Landis et al., 2018) nos induce una respuesta antibacteriana vital para evitar el daño en el colon, que como se mencionó anteriormente resulta susceptible por la gran cantidad de bacterias que almacena.

Este último punto nos ofrece un panorama poco explorado del HGF como agente inmunomodulador en el intestino, aspecto que ya habíamos reportado en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, donde vimos que el HGF inmunomodula de manera diferencial al pulmón y al hígado (Bello-Monroy et al., 2020). Nuestros datos apuntan a un efecto similar en el intestino, lo que hace un aporte sumamente relevante a lo reportado en este trabajo.

En este estudio también se evaluaron muestras de duodeno de pacientes con un patrón colestásico, el duodeno es una zona caracterizada por tener vellosidades largas para realizar sus funciones de movimiento y absorción del quimo, en Figura 19 se observó que la disminución del tamaño de la vellosidades además acompañado de daño en la criptas, de las que depende sumamente la integridad del intestino, ya que al

ser un tejido altamente expuesto a diferentes agentes de daño la renovación de enterocitos y por lo tanto de células madre se lleva a cabo continuamente.

También encontramos infiltrado inflamatorio confirmándonos los patrones de daño por colestásis observados en ratones y sus similitudes en pacientes.

Finalmente observamos que parte del cuidado del epitelio intestinal se debió a la regulación del estrés oxidante desencadenado por la administración de ANIT. Estos resultados demostraron una vez más que HGF disminuye el daño en el intestino por regulación de ROS que se desatan por el daño, además que esto lo hace mediante la acción de proteínas implicadas con el glutatión. De igual manera la regulación de ROS en el intestino en ratones inyectados con HGF nos indica fuertemente de igual manera que hay una activación del factor nuclear Nrf2 mediante su fosforilación y la de su proteína regulador “keep” en el intestino; sin embargo, es algo que más adelante deberá de ser evaluado. Lo anterior nos indica que la condición del intestino no solo mejora posiblemente por la disminución en el daño del hígado y todo lo que se arroja a nivel sistémico, sino que HGF directamente prepara al intestino para activar su propia maquinaria de protección y de esta manera contribuir a la defensa del hígado.

## **10. Conclusión**

En nuestro trabajo demostramos que la acción reparadora del HGF no solo lleva a cabo su acción en el hígado, también en el intestino, en donde se hace una fuerte retroalimentación positiva al hígado.

HGF demostró incrementar la proliferación y reparación de criptas y vellosidades intestinales, además de favorecer la respuesta inmune ante el daño colestásico y mejorar la secreción de mucosa que representa una de las principales barreras contra patógenos. Finalmente, se verificó que el HGF controla el estallido de ROS en el intestino, que es uno de los principales mecanismos de daño por una colestasis. Los mecanismos por los que HGF desencadena todos estos procesos de protección intestinal, siguen siendo un punto importante para futuras investigaciones.

## 11. Referencias

- Alfredsson, J., & Wick, M. J. (2020). Mechanism of fibrosis and stricture formation in Crohn's disease. *Scand J Immunol*, 92(6), e12990. <https://doi.org/10.1111/sji.12990>
- Arias, I. M., & Wiley, I. (2020). *The liver : biology and pathobiology* (Sixth edition. ed.). Wiley-Blackwell.
- Arnold, L., Enders, J., & Thomas, S. M. (2017). Activated HGF-c-Met Axis in Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cancers9120169>
- Ballan, R., & Saad, S. M. I. (2021). Characteristics of the Gut Microbiota and Potential Effects of Probiotic Supplements in Individuals with Type 2 Diabetes. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112528>
- Bello-Monroy, O., Mata-Espinosa, D., Enríquez-Cortina, C., Souza, V., Miranda, R. U., Bucio, L., . . . Gomez-Quiroz, L. E. (2020). Hepatocyte growth factor enhances the clearance of a multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strain by high doses of conventional chemotherapy, preserving liver function. *J Cell Physiol*, 235(2), 1637-1648. <https://doi.org/10.1002/jcp.29082>
- Choda, Y., Morimoto, Y., Miyaso, H., Shinoura, S., Saito, S., Yagi, T., . . . Tanaka, N. (2004). Failure of the gut barrier system enhances liver injury in rats: protection of hepatocytes by gut-derived hepatocyte growth factor. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 16(10), 1017-1025. <https://doi.org/10.1097/00042737-200410000-00011>
- Clavijo-Cornejo, D., Enriquez-Cortina, C., López-Reyes, A., Domínguez-Pérez, M., Nuño, N., Domínguez-Meraz, M., . . . Gómez-Quiroz, L. E. (2013). Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*, 95(6), 1177-1184. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.01.005>
- Dai, X., He, L., Hu, N., Guo, C., Zhou, M., Zhao, X., . . . Li, Y. (2021). Ethanol Extract Exerts a Protective Effect Against High-Fat Diet Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice by Remodeling Intestinal Microbial Structure and Maintaining Metabolic Homeostasis of Bile Acids. *Front Pharmacol*, 12, 734670. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.734670>
- David, Z., Boyer, T. D., Manns, M. P., Sanyal, A. J., Zakim, D., & ScienceDirect. (2012). *Zakim and Boyer's hepatology : a textbook of liver disease* (Sixth edition ed.). Saunders/Elsevier.
- Di Ciaula, A., Garruti, G., Lunardi Baccetto, R., Molina-Molina, E., Bonfrate, L., Wang, D. Q., & Portincasa, P. (2017). Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol*, 16 Suppl 1, S4-S14. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5493>
- Domínguez-Pérez, M., Nuño-Lámbarri, N., Clavijo-Cornejo, D., Luna-López, A., Souza, V., Bucio, L., . . . Gutiérrez-Ruiz, M. C. (2016). Hepatocyte Growth Factor Reduces Free Cholesterol-Mediated Lipotoxicity in Primary Hepatocytes by Countering Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 7960386. <https://doi.org/10.1155/2016/7960386>
- Dumaswala, R., Berkowitz, D., & Heubi, J. E. (1996). Adaptive response of the enterohepatic circulation of bile acids to extrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 23(3), 623-629. <https://doi.org/10.1002/hep.510230330>

- Fickert, P., Krones, E., Pollheimer, M. J., Thueringer, A., Moustafa, T., Silbert, D., . . . Trauner, M. (2013). Bile acids trigger cholemic nephropathy in common bile-duct-ligated mice. *Hepatology*, 58(6), 2056-2069. <https://doi.org/10.1002/hep.26599>
- Garcia-Cortes, M., Robles-Diaz, M., Stephens, C., Ortega-Alonso, A., Lucena, M. I., & Andrade, R. J. (2020). Drug induced liver injury: an update. *Arch Toxicol*, 94(10), 3381-3407. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02885-1>
- Gillard, J., Clerbaux, L. A., Nachit, M., Sempoux, C., Staels, B., Bindels, L. B., . . . Leclercq, I. A. (2022). Bile acids contribute to the development of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *JHEP Rep*, 4(1), 100387. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100387>
- Gómez-Quiroz, L. E. (2012). *Alcoholic Liver Disease and the Survival Response of the Hepatocyte Growth Factor*. IntechOpen.
- Ikpa, P. T., Doktorova, M., Meijsen, K. F., Nieuwenhuijze, N. D. A., Verkade, H. J., Jonker, J. W., . . . Bijvelds, M. J. C. (2020). Impaired Intestinal Farnesoid X Receptor Signaling in Cystic Fibrosis Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 9(1), 47-60. <https://doi.org/10.1016/j.icmgh.2019.08.006>
- Isaacs-Ten, A., Echeandia, M., Moreno-Gonzalez, M., Brion, A., Goldson, A., Philo, M., . . . Beraza, N. (2020). Intestinal microbiome-macrophage crosstalk contributes to cholestatic liver disease by promoting intestinal permeability. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.31228>
- Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(39), 15064-15069. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803124105>
- Joosten, S. P. J., Zeilstra, J., van Andel, H., Mijnsals, R. C., Zaunbrecher, J., Duivenvoorden, A. A. M., . . . Pals, S. T. (2017). MET Signaling Mediates Intestinal Crypt-Villus Development, Regeneration, and Adenoma Formation and Is Promoted by Stem Cell CD44 Isoforms. *Gastroenterology*, 153(4), 1040-1053.e1044. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.008>
- Klaassen, C. D. (2019). *Casarett & Doull's toxicology : the basic science of poisons* (Ninth edition. ed.). McGraw-Hill Education.
- Kuntz, E., Kuntz, H.-D. b., & SpringerLink. (2006). *Hepatology : principles and practice : history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy* (2nd ed.). Springer.
- Landis, R. C., Quimby, K. R., & Greenidge, A. R. (2018). M1/M2 Macrophages in Diabetic Nephropathy: Nrf2/HO-1 as Therapeutic Targets. *Curr Pharm Des*, 24(20), 2241-2249. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180716163845>
- Li, Y., Yu, H., Xu, Z., Shi, S., Wang, D., Shi, X., . . . Zhong, X. (2019). Melatonin ameliorates ANIT-induced cholestasis by activating Nrf2 through a PI3K/Akt-dependent pathway in rats. *Mol Med Rep*, 19(2), 1185-1193. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9746>
- Lin, H., An, Y., Tang, H., & Wang, Y. (2019). Alterations of Bile Acids and Gut Microbiota in Obesity Induced by High Fat Diet in Rat Model. *J Agric Food Chem*, 67(13), 3624-3632. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00249>



- Mariotti, V., Strazzabosco, M., Fabris, L., & Calvisi, D. F. (2018). Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864(4 Pt B), 1254-1261. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.027>
- McGlone, E. R., & Bloom, S. R. (2019). Bile acids and the metabolic syndrome. *Ann Clin Biochem*, 56(3), 326-337. <https://doi.org/10.1177/0004563218817798>
- Modica, S., Petruzzelli, M., Bellafante, E., Murzilli, S., Salvatore, L., Celli, N., . . . Moschetta, A. (2012). Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis. *Gastroenterology*, 142(2), 355-365 e351-354. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.028>
- Muili, K. A., Wang, D., Orabi, A. I., Sarwar, S., Luo, Y., Javed, T. A., . . . Husain, S. Z. (2013). Bile acids induce pancreatic acinar cell injury and pancreatitis by activating calcineurin. *J Biol Chem*, 288(1), 570-580. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.428896>
- Muriel, P., & ScienceDirect. (2017). *Liver pathophysiology : therapies and antioxidants*. Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Palestino-Dominguez, M., Pelaez-Luna, M., Lazzarini-Lechuga, R., Rodriguez-Ochoa, I., Souza, V., Miranda, R. U., . . . Gutierrez-Ruiz, M. C. (2018). Recombinant human hepatocyte growth factor provides protective effects in cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *J Cell Physiol*, 233(12), 9354-9364. <https://doi.org/10.1002/jcp.26444>
- Pandak, W. M., & Kakiyama, G. (2019). The acidic pathway of bile acid synthesis: Not just an alternative pathway(). *Liver Res*, 3(2), 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.05.001>
- Paumgartner, G., & Beuers, U. (2002). Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology*, 36(3), 525-531. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36088>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(3), 141-153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Qiu, J., Yan, J., Liu, W., Liu, X., Lin, J., Du, Z., . . . Wang, X. (2021). Metabolomics analysis delineates the therapeutic effects of Huangqi decoction and astragalosides on  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) -induced cholestasis in rats. *J Ethnopharmacol*, 268, 113658. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113658>
- Rieder, F., Bettenworth, D., Ma, C., Parker, C. E., Williamson, L. A., Nelson, S. A., . . . Jairath, V. (2018). An expert consensus to standardise definitions, diagnosis and treatment targets for anti-fibrotic stricture therapies in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 48(3), 347-357. <https://doi.org/10.1111/apt.14853>
- Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C. R., . . . Group, N. (2003). Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol*, 55(2-3), 91-106.
- Salas-Silva, S., Simoni-Nieves, A., Chávez-Rodríguez, L., Gutiérrez-Ruiz, M. C., Bucio, L., & Quiroz, L. E. G. (2021). Mechanism of cholangiocellular damage and repair during cholestasis. *Ann Hepatol*, 26, 100530. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100530>
- Salas-Silva, S., Simoni-Nieves, A., Lopez-Ramirez, J., Bucio, L., Gomez-Quiroz, L. E., Gutierrez-Ruiz, M. C., & Roma, M. G. (2019). Cholangiocyte death in ductopenic

- cholestatic cholangiopathies: Mechanistic basis and emerging therapeutic strategies. *Life Sci*, 218, 324-339. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.044>
- Salas-Silva, S., Simoni-Nieves, A., Razori, M. V., Lopez-Ramirez, J., Barrera-Chimal, J., Lazzarini, R., . . . Bucio-Ortiz, L. (2020). HGF induces protective effects in alpha-naphthylisothiocyanate-induced intrahepatic cholestasis by counteracting oxidative stress. *Biochem Pharmacol*, 174, 113812. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113812>
- Sevior, D. K., Pelkonen, O., & Ahokas, J. T. (2012). Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(2), 257-261. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.11.011>
- Smith, D. D., & Rood, K. M. (2020). Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, 63(1), 134-151. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000495>
- Simoni-Nieves, A., Clavijo-Cornejo, D., Salas-Silva, S., Escobedo-Calvario, A., Bucio, L., Souza, V., . . . Gomez-Quiroz, L. E. (2021). HGF/c-Met regulates p22. *Ann Hepatol*, 25, 100339. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100339>
- Slijepcevic, D., Roscam Abbing, R. L. P., Fuchs, C. D., Haazen, L. C. M., Beuers, U., Trauner, M., . . . van de Graaf, S. F. J. (2018). Na(+) -taurocholate cotransporting polypeptide inhibition has hepatoprotective effects in cholestasis in mice. *Hepatology*, 68(3), 1057-1069. <https://doi.org/10.1002/hep.29888>
- Wammers, M., Schupp, A. K., Bode, J. G., Ehling, C., Wolf, S., Deenen, R., . . . Graf, D. (2018). Reprogramming of pro-inflammatory human macrophages to an anti-inflammatory phenotype by bile acids. *Sci Rep*, 8(1), 255. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18305-x>
- Wu, S. Y., Cui, S. C., Wang, L., Zhang, Y. T., Yan, X. X., Lu, H. L., . . . Gong, L. K. (2018). 18beta-Glycyrrhetic acid protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through activation of the Sirt1/FXR signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 39(12), 1865-1873. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0110-y>
- Yoshimine, H., Tanoue, S., Ibi, Y., Minami, M., Nakahara, M., Tokunaga, K., . . . Ido, A. (2021). Hepatocyte growth factor ameliorates methylglyoxal-induced peritoneal inflammation and fibrosis in mouse model. *Clin Exp Nephrol*, 25(9), 935-943. <https://doi.org/10.1007/s10157-021-02067-y>
- Yu, L., Liu, X., Yuan, Z., Li, X., Yang, H., Sun, L., . . . Jiang, Z. (2017). SRT1720 Alleviates ANIT-Induced Cholestasis in a Mouse Model. *Front Pharmacol*, 8, 256. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00256>
- Yu, Y. C., Mao, Y. M., Chen, C. W., Chen, J. J., Chen, J., Cong, W. M., . . . (CMA), C. M. A. (2017). CSH guidelines for the diagnosis and treatment of drug-induced liver injury. *Hepatol Int*, 11(3), 221-241. <https://doi.org/10.1007/s12072-017-9793-2>
- Zhang, L., Chandan, V. S., Wu, T.-T., & SpringerLink. (2019). *Surgical Pathology of Non-neoplastic Gastrointestinal Diseases* (1st 2019. ed.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Zhang, Y., Csanaky, I. L., Lehman-McKeeman, L. D., & Klaassen, C. D. (2011). Loss of organic anion transporting polypeptide 1a1 increases deoxycholic acid absorption in mice by increasing intestinal permeability. *Toxicol Sci*, 124(2), 251-260. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr236>





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00742

Matrícula: 2193803488

Efecto protector del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) a nivel intestinal en un modelo murino de colestasis química inducida por  $\alpha$ -Naftilisotiocianato (ANIT)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 30 del mes de marzo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PÉREZ  
DR. BENJAMÍN PÉREZ AGUILAR  
DRA. NATALIA NUÑO LAMBARRI

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

DE: JOCELYN LOPEZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GÓMEZ QUIROZ

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PÉREZ

VOCAL

DR. BENJAMÍN PÉREZ AGUILAR

SECRETARIA

DRA. NATALIA NUÑO LAMBARRI