



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y
FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

**Transferencia génica de aquaporinas al hígado de
rata: Modulación de los mecanismos de secreción
biliar en colestasis**

Presentada por Julieta Marrone

Rosario, Argentina

2016

Transferencia génica de aquaporinas al hígado de rata: Modulación de los mecanismos de secreción biliar en colestasis

Julieta Marrone

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE – CONICET), Area Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1° de abril de 2011 y el 31 de marzo de 2016, bajo la dirección del Dr. Raúl A. Marinelli.

Dr. Raúl A. Marinelli, Director

Dra. Laura Trumper, Jurado de Tesis

Dra. Liliana Bianciotti, Jurado de Tesis

Dra. Claudia Capurro, Jurado de Tesis

Defendida:

Parte de los resultados que se describen en el presente trabajo de Tesis fueron publicados en los artículos y reuniones científicas que se detallan a continuación.

Publicaciones:

“Hepatic Gene Transfer of Human Aquaporin-1 Improves Bile Salt Secretory Failure in Rats with Estrogen-Induced Cholestasis”

Marrone J, Soria LR, Danielli M, Lehmann GL, Cecilia Larocca M, Marinelli RA.
Hepatology. En prensa, 2016.

“Adenoviral transfer of human aquaporin-1 gene to rat liver improves bile flow in estrogen-induced cholestasis”

Marrone J, Lehmann GL, Soria LR, Pellegrino JM, Molinas S and Marinelli RA.
Gene Ther, 21:1058-64, 2014.

Presentaciones a Congresos:

“La transferencia génica hepática de Aquaporina-1 humana (hAQP1) a ratas con colestasis inducida por etinilestradiol (EE) mejora la distribución en microdominios rafts del transportador canalicular de sales biliares (Bsep)”

Marrone J, Danielli M, Larocca MC, Marinelli RA.
Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata. 2015.

“La transferencia génica de Aquaporina-1 humana (hAQP1) atenúa la colestasis en ratas tratadas con etinilestradiol”

Marrone J, Lehmann GL, Soria LR, Marinelli RA.
Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Buenos Aires. 2014.

“La transferencia génica de Aquaporina-1 humana (hAQP1) a hígado de rata atenúa la colestasis inducida por estrógenos”

Marrone J, Lehmann GL, Soria LR, Molinas S, Marinelli RA.
Reunión Anual de Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata. 2013.

“Transferencia génica de Aquaporina-1 humana (hAQP1) a animales con colestasis hepatocelular”.

Marrone J, Lehmann GL, Soria LR, Marinelli RA.

Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Rosario. 2012.

“Transferencia *in vivo* del gen de Aquaporina-1 humana (hAQP1) al hígado de rata”

Lehmann GL, Marrone J, Malvicini M, Mazzolini G, Marinelli RA.

Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Mar del Plata. 2011.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	ABREVIATURAS	VII
<hr/>		
	RESUMEN	IX
<hr/>		
1.	INTRODUCCIÓN	1
<hr/>		
1.1.	Aquaporinas	1
1.1.1.	Pasaje de agua a través de las membranas biológicas	1
1.1.2.	Aquaporinas: estructura molecular y expresión en el organismo	2
1.1.3.	AQPs del hepatocito	5
1.1.3.1.	AQP8 canalicular	9
1.1.3.2.	AQP8 mitocondrial	10
1.2.	Secreción biliar	11
1.2.1.	Importancia de las aquaporinas en la fisiología biliar	11
1.2.2.	Transportadores de solutos relevantes para la formación de la bilis en el hepatocito	12
1.2.3.	Colestasis: disfunción secretora biliar	15
1.2.3.1.	Colestasis hepatocelular inducida por estrógenos	15
1.2.3.1.1	AQP8 en colestasis inducida por EE	16
1.2.3.1.2	Transportadores de solutos en colestasis inducida por EE	16
1.3.	Adenovirus como vectores virales	17
1.3.1.	Estructura y organización genómica de la partícula adenoviral	18
1.3.2.	Vectores Adenovirales de Primera Generación	20
1.3.2.1	Vector Adenoviral que codifica para aquaporina-1 humana: AdhAQP1	20
1.3.3.	Administración de adenovectores al hígado	20
2.	OBJETIVOS	22
<hr/>		
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	23
<hr/>		
3.1.	Tratamientos y diseños experimentales	23
3.1.1.	Animales	23
3.1.2.	Vectores Adenovirales	23

3.1.2.1.	AdhAQP1	23
3.1.2.2.	Vector control	24
3.1.3.	Tratamiento con EE: modelo de colestasis hepatocelular	24
3.1.4.	Administración del vector	24
	<i>Modelo experimental de Administración Retrobiliar vía Transduodenal</i>	
3.1.5.	Estudios de secreción biliar y obtención de muestras	25
3.2.	Determinaciones serológicas	26
3.2.1.	Fosfatasa alcalina	26
3.2.2.	Lactato Deshidrogenasa	26
3.2.3.	Alanina aminotransferasa	27
3.2.4.	Aspartato aminotransferasa	27
3.2.5.	Sales biliares séricas	27
3.3.	Sales biliares en bilis	27
3.4.	Eficiencia colerética de las sales biliares endógenas	28
3.5.	Composición biliar de sales biliares	28
3.6.	Secreción biliar de [³ H]TC	28
3.7.	Fraccionamiento subcelular	28
3.7.1.	Preparación de membranas plasmáticas hepáticas	28
3.7.2.	Preparación de membranas plasmáticas canaliculares	29
3.7.2.1.	Actividad 5'-nucleotidasa	29
3.7.2.2.	Pureza y enriquecimiento de las membranas plasmáticas canaliculares	30
3.8.	Transporte osmótico de agua en membranas canaliculares: espectrofotometría de flujo detenido (stopped flow light scattering)	31
3.9.	Transporte de TC en vesículas de membranas canaliculares hepáticas	32
3.10.	Preparación de microdominios canaliculares solubles/insolubles en detergente	33
3.10.1.	Determinación del colesterol total en microdominios de membrana	34
3.11.	Inmunobloting	34
3.12.	Estudios inmunohistológicos	35
3.12.1.	Inmunohistoquímica	35
3.12.2.	Inmunofluorescencia confocal	35
3.13.	Medición de la concentración de proteínas	36
3.14.	Análisis estadístico	36
4.	RESULTADOS	37

4.1.	Estudios iniciales de las condiciones óptimas de administración del vector AdhAQP1	37
------	---	----

4.2.	La transferencia génica de AdhAQP1 a ratas induce la expresión de hAQP1 funcional en membrana canalicular	39
4.2.1.	Expresión de hAQP1 en hepatocitos de ratas normales y colestásicas	39
4.2.2.	Permeabilidad osmótica al agua de membranas canaliculares de hepatocitos sometidos a transferencia génica mediante el adenovector AdhAQP1	43
4.3.	La expresión hepática de hAQP1 en ratas con colestasis por etinilestradiol aumentó significativamente el flujo biliar basal y el estimulado por sales biliares.	46
4.3.1.	Flujo biliar en ratas transducidas con AdhAQP1	46
4.4.	La expresión de hAQP1 en ratas con colestasis por EE aumenta la eficiencia colerética de las sales biliares.	48
4.4.1.	Eficiencia colerética de las sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	48
4.5.	La transferencia génica de hAQP1 aumenta la excreción biliar de sales biliares en ratas con colestasis por etinilestradiol	50
4.5.1.	Excreción biliar de sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	50
4.5.2.	Niveles séricos de sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	54
4.5.3.	Expresión y actividad de BSEP/ABCB11 en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	55
4.5.4.	Localización de BSEP en microdominios de membrana canalicular en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	58
5.	DISCUSIÓN	62
6.	CONCLUSIONES	68
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ÍNDICE DE FIGURAS	79
	ÍNDICE DE TABLAS	81
	AGRADECIMIENTOS	82

ABREVIATURAS

(por orden alfabético)

α -MC	alfa-muricolato
Ad2	adenovirus serotipo 2
Ad5	adenovirus serotipo 5
Adc	adenovector control
AdhAQP1	vector adenoviral que codifica para hAQP1
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AE2	isoforma 2 del intercambiador de aniones $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$
ALT/GPT	alanina aminotransferasa
AMP	adenosina 3',5'-monofosfato
AMPc	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AST/GOT	aspartato aminotransferasa
AQP	aquaporina
ATP	adenosina trifosfato
β -MC	beta-muricolato
BLPM	membrana plasmática basolateral
BSEP/ABCB11	bomba exportadora de sales biliares
C	colato
CDC	quenodesoxicolato
DC	desoxicolato
cpm	cuentas por minuto
CPM	membrana plasmática canalicular
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EE	17 α -etinilestradiol
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	ácido etilenglicol bis (aminoetil éter) tetraacético
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
hAQP1	AQP1 humana
HDC	hidesoxicolato
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
LDH	lactato deshidrogenasa
MC	muricolato
MDR3	bomba exportadora de fosfolípidos
MRP	proteínas asociadas a resistencia a multidrogas
MRP2	proteína asociada a resistencia a multidrogas 2
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NTCP	polipéptido co-transportador de Na^+ /taurocolato
OATP	proteína transportadora de aniones orgánicos
PBS	buffer fosfato salino
P_f	coeficiente de permeabilidad osmótica al agua
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
PKA	proteína quinasa A
PM	membranas plasmáticas totales
PVDF	polivinil difluoruro

SB	sales biliares
SDS	dodecil sulfato de sodio
TC	taurocolato
TCA	ácido tricloroacético
Tris	N-tris (hidroximetil) aminometano
Tween	monooleato de polioxietileno sorbitan
UDC	ursodesoxicolato
ufp	unidades formadoras de placa

RESUMEN

Las aquaporinas (AQPs) conforman una familia de canales de membrana que facilitan el movimiento rápido de agua acoplado a gradientes osmóticos generados por el transporte de solutos. La primer AQP (i.e., AQP1) fue identificada en el año 1992 por el Dr. Peter Agre, quien fue galardonado con el Premio Nobel en Química 2003. Hasta el presente, se han identificado trece AQPs en mamíferos, distribuidas en una amplia variedad de células, incluyendo el hepatocito. Los hepatocitos son responsables de la formación de la secreción biliar primaria o canalicular. La generación de la bilis es un proceso osmótico impulsado por el transporte de solutos (principalmente sales biliares) y por el flujo obligado de agua. De esta manera, la secreción biliar depende del gradiente osmótico generado por el transporte activo de solutos en la membrana canalicular del hepatocito (polo secretorio biliar) y además, de la permeabilidad canalicular al agua determinada por el nivel de expresión de AQPs. Así, una defectiva expresión canalicular de AQPs y en consecuencia una reducida permeabilidad de membrana al agua, como hemos observado en animales con colestasis hepatocelular, se considera un importante factor contribuyente a la falla secretoria biliar.

Sobre esta base, el principal objetivo del presente trabajo de Tesis fue evaluar en un modelo animal de colestasis hepatocelular inducida por el estrógeno 17 α -etinilestradiol, si la normalización de la permeabilidad canalicular al agua vía transferencia génica *in vivo* de AQPs, incrementa el flujo biliar y atenúa el cuadro colestásico.

Los resultados aquí presentados muestran que la administración retrobiliar del vector adenoviral AdhAQP1, que codifica para la aquaporina-1 humana (hAQP1), a ratas colestásicas induce la expresión de hAQP1 en la membrana canalicular de los hepatocitos, el polo secretorio biliar. La expresión canalicular de hAQP1 indujo un aumento significativo de la permeabilidad osmótica al agua que se tradujo en una mayor eficiencia colerética de las sales biliares excretadas a bilis y por consiguiente en una corrección del flujo biliar canalicular en colestasis.

La hAQP1 canalicular también indujo una normalización de la excreción biliar de las sales biliares y de sus niveles séricos aumentados, que es considerado un marcador clave de colestasis hepatocelular. Demostramos que estos efectos serían debidos a un aumento significativo de la actividad del transportador canalicular de sales

biliares, transportador de sales biliares BSEP/ABCB11, la cual está deprimida en colestasis. La hAQP1 canalicular indujo la relocalización específica del BSEP en microdominios rafts ricos en colesterol que mantienen su actividad transportadora.

En conclusión, nuestros resultados reafirman el importante rol de las AQPs en el proceso de formación de la secreción biliar y sugiere a la transferencia adenoviral de hAQP1 como una posible estrategia terapéutica para cuadros de colestásicos hepatocelular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aquaporinas

1.1.1. Pasaje de agua a través de las membranas biológicas

Si bien todas las membranas biológicas exhiben cierto grado de permeabilidad al agua, una propiedad notable de la mayoría de las células y tejidos humanos es su capacidad para el rápido transporte de fluidos, lo cual es esencial en procesos fisiológicos tales como la concentración tubular de la orina (Marples y col., 1995) y la formación de las secreciones salival (Krane y col., 2001) y biliar (Marinelli y col., 2011; Marinelli y col., 2016), entre muchos otros.

El mecanismo por el cual el agua atraviesa las membranas biológicas fue un tema central de debate que adquirió notable importancia durante las últimas décadas del siglo XX. La existencia de proteínas que formaban canales específicos de membrana y permitían así el pasaje de agua se postuló durante décadas en base a evidencias biofísicas y fisiológicas mucho antes de que se descubriera la naturaleza del primer canal de agua. Hasta ese momento, la comunidad científica acordaba que el movimiento de agua a través de las células ocurría por difusión simple a través de la bicapa lipídica. Sin embargo, era notable la variabilidad en los valores de permeabilidad al agua obtenidos con membranas pertenecientes a distintos tejidos (Agre y col., 1998). Así, los eritrocitos o la vejiga de anfibio, transportaban el agua demasiado rápido como para que pueda explicarse únicamente por el mecanismo de difusión. Esto llevó a que los fisiólogos consideren la existencia de otro mecanismo subyacente: la existencia de poros especializados selectivos para el pasaje de agua (Finkelstein, 1987). Entre los pioneros que postularon la existencia de una vía específica para el pasaje de agua a través de las membranas celulares podemos citar a los Dres. Finkelstein, Whitttemburry y Parisi (Agre, 2004).

A pesar de múltiples estudios y consideraciones teóricas, no se conoció la naturaleza molecular de los canales de agua hasta la década del '90 cuando, en el laboratorio del Dr. Peter Agre, se aísla una proteína de membrana de los glóbulos rojos y se caracteriza luego como el primer canal de agua, actualmente denominado aquaporina-1 (AQP1) (Preston y Agre, 1991; Preston y col., 1992; Agre y Kozono, 2003). El descubrimiento de los canales de agua permitió finalmente explicar el movimiento del agua a través de las membranas biológicas y sentó las bases para el

estudio, a nivel molecular, de la fisiología del transporte de fluidos y de la fisiopatología de múltiples desórdenes en el balance del agua. Por este hallazgo, en el año 2003 el Dr. Peter Agre fue galardonado con el Premio Nobel de Química.

La presencia funcional de canales transportadores de agua en las membranas biológicas puede identificarse mediante la realización de un análisis biofísico (Verkman, 2000). El parámetro más útil para caracterizar las propiedades de transporte de agua a través de una barrera es el coeficiente de permeabilidad osmótica al agua, P_f ($\mu\text{m}/\text{sec}$). El P_f representa la capacidad de transporte de agua a través de una membrana impulsada por fuerzas osmóticas o hidrostáticas y está determinado por el producto del coeficiente de permeabilidad intrínseca al agua del canal y la densidad de AQPs en la membrana. En base a mediciones realizadas en bicapas lipídicas y sistemas celulares, un valor de P_f menor a $50 \mu\text{m}/\text{sec}$ determinado a $25\text{-}37^\circ\text{C}$ indica movimiento de agua por difusión, mientras que un valor de P_f mayor a $100 \mu\text{m}/\text{sec}$ sugiere la participación de AQPs (Verkman 2000). El P_f se puede determinar exponiendo vesículas selladas de membrana o liposomas, a un gradiente osmótico. Los cambios de volumen que suceden en respuesta al gradiente se pueden cuantificar midiendo la intensidad de la luz dispersada en función del tiempo por espectrofotometría de flujo detenido (*stopped-flow*) (Verkman, 2000; Madeira y col., 2016), y de la cinética de la curva obtenida se calcula el P_f .

1.1.2. Aquaporinas: estructura molecular y expresión en el organismo

Las aquaporinas (AQPs) conforman una familia de proteínas canal homólogas que se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos, plantas y organismos inferiores (Preston y col., 1992; Gomes y col., 2009). Las AQPs funcionan como canales de agua facilitando su movimiento transmembrana acoplado a gradientes osmóticos generados por el transporte de solutos. Algunas AQPs exhiben adicionalmente permeabilidad a ciertos solutos pequeños no cargados (Kitchen y col., 2015), tales como glicerol (Tsukaguchi y col., 1999), urea (Gerbeau y col., 1999; Liu y col., 2003), amoníaco (Jahn y col., 2004; Loque y col., 2005; Saporov y col., 2007) y peróxido de hidrógeno (Bienert y col., 2007; Dynowski y col., 2008).

Las AQPs de mamífero se expresan en las membranas plasmáticas e intracelulares de diversas células (Preston y col., 1992; Carbrey y Agre, 2009; Day y col., 2014) y han sido involucradas en numerosos procesos biológicos, así como en la

patogénesis molecular de algunas enfermedades (Agre y Kozono, 2003, Marinelli y col., 2016, Verkman, 2012) (**Figura 1.1**).

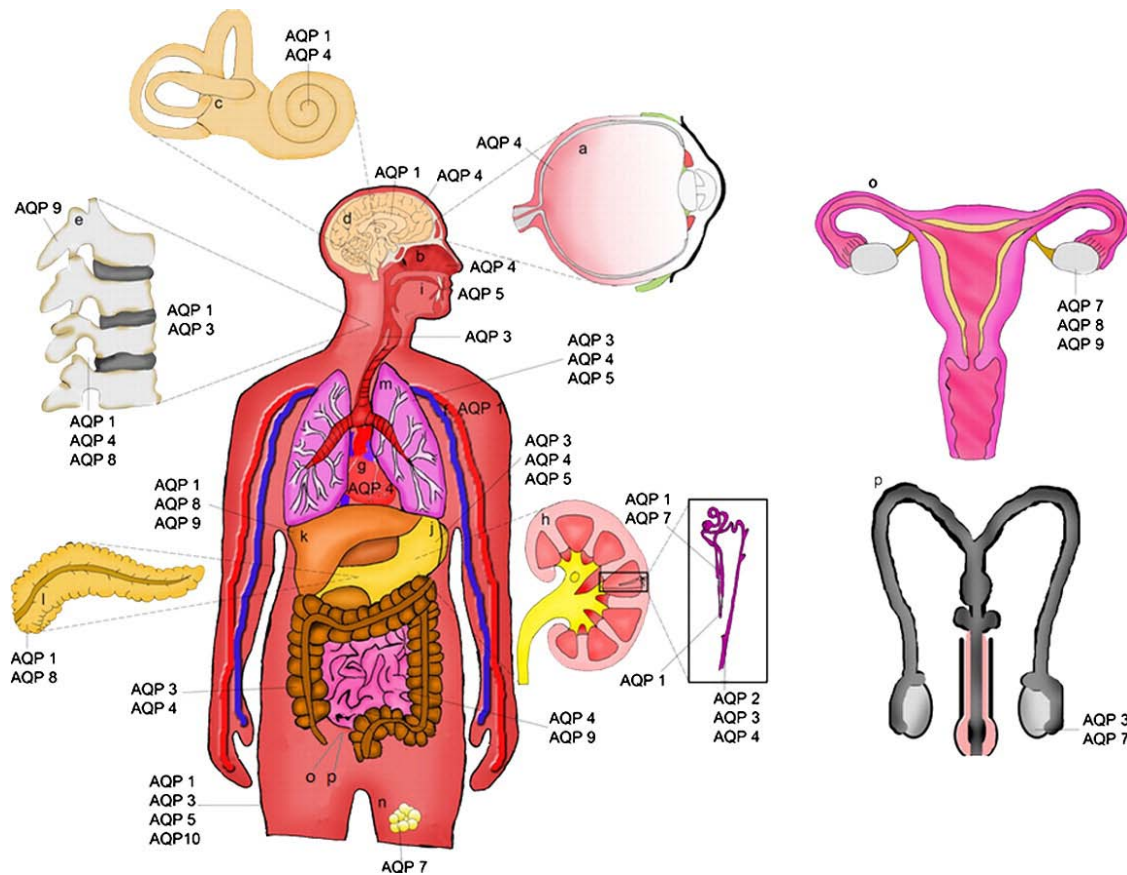


Figura 1.1: Expresión de AQPs en humanos. Se muestra la amplia distribución de las principales AQPs involucradas en el transporte de agua en el cuerpo humano: a) retina: AQP4; b) epitelio olfatorio: AQP4; c) oído interno: AQP4, AQP1; d) cerebro: AQP4 en astrocitos, AQP1 en plexo coroideo; e) médula espinal: AQP1, AQP4, AQP8; células del disco intervertebral: AQP1, AQP3; osteoclastos: AQP9; f) Venas: AQP1 en células endoteliales; g) corazón: AQP4; h) riñón: AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP7; i) glándulas salivales: AQP5; j) tracto gastrointestinal: AQP3, AQP4, AQP5, AQP9; k) hígado: AQP1, AQP8, AQP9; l) páncreas: AQP1, AQP8; m) pulmones: AQP3, AQP4, AQP5; n) adipocitos: AQP7; ñ) piel: AQP1, AQP3, AQP5, AQP10; o) aparato reproductor femenino: AQP7, AQP8, AQP9 en ovarios; p) aparato reproductor masculino: AQP3, AQP7 en células espermáticas (Day y col., 2014).

Las aquaporinas se organizan en seis segmentos de estructura α -hélice que atraviesan la membrana, unidos por cinco lazos conectores, con los extremos amino- y carboxi- terminales localizados en la cara citoplasmática de la membrana (Sales y col., 2013) (**Figura 1.2**). Dos de los lazos (uno extracelular y otro intracelular) se pliegan hacia la membrana, poniendo en contacto los tripletes asparagina–prolina–alanina

(NPA). Así se forma el sitio más estrecho del poro, constituyendo uno de los sitios de constricción del canal. Un segundo filtro de selectividad, la región de constricción llamada *a/R* (*aromatic/arginine*), se encuentra formado por cuatro aminoácidos y funciona como una barrera de exclusión por tamaño, siendo necesaria para el transporte eficiente del sustrato (Fujiyoshi y col., 2002; Beitz y col., 2006). La estructura resultante encierra una zona central estrecha que se ensancha abriéndose hacia ambos lados de la membrana, confiriéndole un plegamiento en forma de reloj de arena (Gonen y Walz, 2006). De modo de conformar una estructura con mayor estabilidad en el entorno lipídico, las aquaporinas *in vivo* forman homotetrámeros en las membranas celulares, donde cada monómero (26–34 kDa) actúa como un canal de agua independiente (Sui y col., 2001).

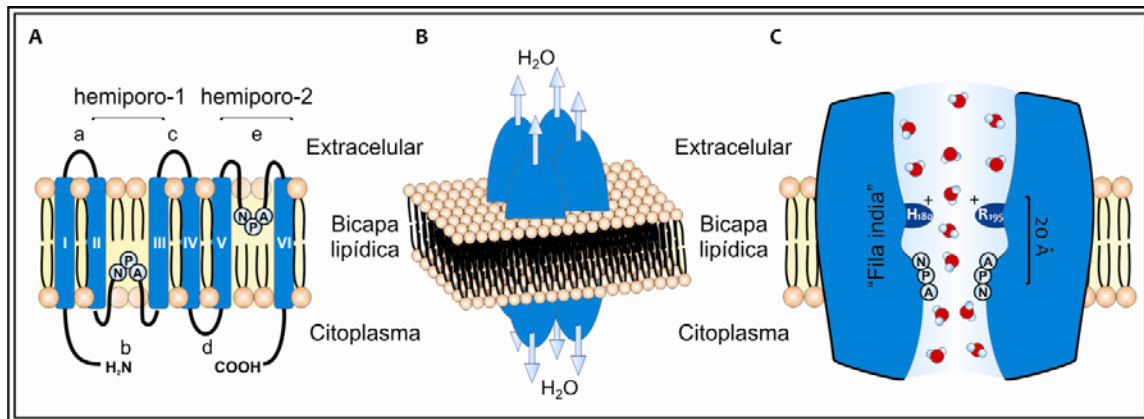


Figura 1.2. Topología, organización y funcionamiento de las aquaporinas. (A), Cada monómero de AQP está conformado por seis dominios transmembrana (I-VI) conectados por cinco “*loops*” conectores (*a-e*) con dos secuencias conservadas NPA que delimitan el poro de agua, y los extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia el citoplasma. (B), Las aquaporinas están organizadas en tetrámeros. El poro de agua no reside en el centro de la molécula, sino que está formado por los “*loops*” conectores *b* y *e* en cada subunidad. Cada una de ellas funciona individualmente como un poro permitiendo el paso de agua de forma bidireccional. (C), El canal de agua consiste en un vestíbulo intra y extracelular conteniendo agua libre en solución. En el centro, ambos vestíbulos se unen por una constricción central de 20 Å de longitud por donde pasan las moléculas de agua en fila india. La constricción *a/R* se forma por la arginina en la posición 195 (R195) y la histidina en la posición 180 (H180). Debido a su composición proporciona cargas positivas fijas e impide el paso de protones. La segunda constricción está delimitada por dos residuos de asparagina pertenecientes al motivo altamente conservado NPA. Las moléculas de agua pasan de a una por vez a lo largo de la constricción sin sufrir mayor resistencia ya que va formando enlaces hidrógeno transitorios con las asparaginas cercanas.

Existen tres características claves que contribuyen a la selectividad de las aquaporinas (Jung y col., 1994; Kitchen y col., 2015):

a) Restricción por tamaño. El poro se angosta hasta un diámetro de 2,8 Angstrom, similar al diámetro de la molécula de agua.

b) Repulsión electrostática. La constricción ar/R está compuesta por un residuo de arginina altamente conservado en la posición 195 y una histidina cercana, en la posición 180. Este filtro provee un criterio suplementario para la selección de solutos, ya que ambos residuos poseen una carga positiva muy alta capaz de repeler al agua protonada. En la región NPA, las interacciones agua-agua son distorsionadas de modo tal que las moléculas de agua se mantengan aisladas de su capa de solvatación en la masa de agua, un proceso que resulta esencial para la selectividad del filtro.

c) Reorientación del dipolo de agua. A medida que las moléculas de agua se aproximan a la constricción, el átomo de oxígeno rota hacia los residuos de asparagina de los motivos NPA (asparaginas 76 y 192), creándose así nuevos puentes de hidrógeno entre el oxígeno y los residuos de asparagina. Así se rompen los puentes hidrógeno entre moléculas de agua y se evita el pasaje de agua protonada. Las AQPs son inhibidas característicamente por compuestos de mercurio, siendo el sitio de inhibición la cisteína 189, próxima al motivo NPA en el *loop* E. (Preston y col., 1993). Sin embargo, algunas AQPs como la AQP4 no poseen cisteína en este sitio y, por lo tanto, no son inhibidas por mercuriales (Savage y Stroud, 2007).

Hasta el día de la fecha se han identificado 13 isoformas de AQPs en tejidos de mamíferos (AQP0-AQP12) y se sospecha la existencia de miembros adicionales de esta familia (King y col., 1996; King y col., 2004; Itoh y col., 2005; Gorelick y col., 2006; Kitchen y col., 2015). Las AQPs difieren en sus secuencias peptídicas, lo que resulta en variaciones en el tamaño de su poro y por ende en la selectividad de las moléculas que pueden atravesar el canal.

1.1.3. AQPs del hepatocito

Una de las funciones clave del sistema hepatobiliar es la formación de la bilis la cual consiste en más de un 95% de agua. Se ha demostrado que las células del tracto hepatobiliar, incluyendo los hepatocitos, los colangiocitos, las células epiteliales de la vesícula biliar y las células endoteliales no sinusoidales, expresan diferentes AQPs que participan en el transporte transcelular de agua y son importantes para el correcto

funcionamiento del tracto hepatobiliar (Masyuk y LaRusso, 2006; Portincasa y Calamita, 2012).

Trabajos de diversos laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que en hepatocitos de mamífero se expresan: AQP0 (Huebert y col., 2002), AQP8 (Calamita y col., 2001; Elkjaer y col., 2001; García y col., 2001; Huebert y col., 2002), AQP9 (Elkjaer y col., 2001; Nicchia y col., 2001; Huebert y col., 2002) y AQP11 (Gorelick y col., 2006) tanto a nivel del ARNm como de la proteína. Recientemente, también se ha informado la expresión de AQP7 en hepatocitos (Gregoire y col., 2015). Estas AQPs poseen diferentes localizaciones subcelulares y permeabilidades (ver Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Localización y permeabilidad de las AQPs del hepatocito		
Aquaporina	Localización Subcelular	Permeabilidad
AQP0	vesículas intracelulares	Agua
AQP9	membrana plasmática sinusoidal (basolateral)	Agua/glicerol/urea/moléculas pequeñas sin carga
AQP11	retículo endoplasmático?	Agua
AQP7	no determinada	Agua/glicerol
AQP8	vesículas intracelulares – membrana plasmática canalicular – Mitocondria	Agua/NH ₃ /H ₂ O ₂

En el hepatocito, las AQPs más estudiadas son la AQP9, localizada exclusivamente sobre la membrana plasmática sinusoidal (basolateral) (Elkjaer y col., 2000; Carbrey y col., 2003) y la AQP8, localizada en la membrana plasmática canalicular (apical), en vesículas intracelulares (Huebert y col., 2002; Calamita y col., 2005 a) y en la membrana mitocondrial interna (Ferri y col., 2003; Calamita y col., 2005 b).

La **AQP0** tiene la particularidad de poseer baja permeabilidad al agua (Mulders y col., 1995) y se expresa en hepatocitos de rata (Huebert y col., 2002) y en la línea celular híbrida derivada de hepatoma de rata/fibroblasto humano WIF-B (Gradilone y col., 2005 a), donde se localiza principalmente en compartimientos intracelulares. Sin embargo, la AQP0 no se expresaría en hepatocitos humanos, de acuerdo a resultados

obtenidos en la línea celular derivada de hepatoma humano HepG2 y en muestras de hígado humano (Larocca y col., 2009). Esta AQP no responde al estímulo por AMPc, lo que sugiere que no exhibe tráfico vesicular regulable (Huebert y col., 2002). Su rol en hepatocitos de rata no fue aún dilucidado (Gregoire y col., 2015).

La **AQP9** es un canal proteico de aproximadamente 32 kDa que permite el pasaje de agua y una amplia variedad de solutos neutros tales como urea, glicerol, purinas y pirimidinas (Tsukaguchi y col., 1998; Tsukaguchi y col., 1999). Ha sido identificada en hepatocitos de rata, ratón, cerdo y humano (Elkjaer y col., 2000; Carbrey y col., 2003; Talbot y col., 2003; Caperna y col., 2007; Padma y col., 2009) y se cree que permite la rápida entrada o liberación de metabolitos con mínima perturbación osmótica. Estudios de inmunolocalización realizados en roedores han revelado que la AQP9 se restringe exclusivamente al dominio de membrana sinusoidal del hepatocito (Elkjaer y col., 2000), con un patrón de expresión mayoritario alrededor de la zona perivenosa (Carbrey y col., 2003). Su localización en ratas no se ve afectada ante aumentos de AMPc intracelular (Huebert y col., 2002). A nivel transcripcional, se ha reportado en roedores que su expresión es regulada negativamente por los niveles circulantes de insulina (Kuriyama y col., 2002; Carbrey y col., 2003). Estas observaciones contrastan con las observadas en una línea celular hepática humana, donde su expresión es regulada positivamente por insulina y negativamente por leptina (Rodriguez y col., 2011). La expresión de AQP9 es también regulada positivamente por triiodotironina y por glucagon en cerdos (Caperna y col., 2007). Se ha demostrado la participación de AQP9 en el metabolismo del glicerol en ratones knockout (Rojek y col., 2007) los cuales muestran niveles plasmáticos de glicerol y triglicéridos aumentados, y una permeabilidad a glicerol en hepatocitos disminuida que no aumenta durante el ayuno con respecto al *wild-type* (Calamita y col., 2012). La expresión de AQP9 está regulada en respuesta a distintas condiciones metabólicas, así el ayuno, se ha demostrado incrementa los niveles de ARNm de AQP9 de rata y ratón (Kuriyama y col., 2002; Carbrey y col., 2003). Durante el ayuno, el glicerol liberado del tejido adiposo es captado por los hepatocitos a través de la AQP9 y utilizado para la gluconeogénesis (Maeda, 2012; Maeda y col., 2009). Además del transporte de agua, glicerol y pequeños solutos, la AQP9 también puede transportar arsenito y por lo tanto, inducir hepatotoxicidad (Liu y col., 2002; Shinkai y col., 2009). Esto último explicaría la acción carcinogénica y tóxica del arsenito en el hígado humano.

La reducción en la expresión de AQP9 en la esteatohepatitis no alcohólica y la enfermedad del hígado graso no alcohólica en individuos obesos, la cual es más pronunciada aún en individuos insulino resistentes, podría representar un mecanismo compensatorio para disminuir la síntesis hepática *de novo* de triglicéridos (Rodríguez y col., 2014). Además, la expresión disminuida de AQP9 que contribuye a disminuir la disponibilidad de glicerol para la gluconeogénesis podría constituir un mecanismo de defensa para impedir la hiperglucemia y la esteatosis en esos individuos (Rodríguez y col., 2014).

La **AQP11** fue identificada en hígado hace 10 años (Gorelick y col., 2006), pero su localización celular y subcelular aún no ha sido caracterizada. En estudios funcionales en ovocitos de *Xenopus* no se pudo verificar que AQP11 fuese permeable a agua, glicerol, urea o iones (Gorelick y col., 2006), pero al reconstituir esta AQP en liposomas se encontró una alta permeabilidad al agua (Yakata y col., 2007). En ratones *knock-out* para AQP11 se observó vacuolización de los hepatocitos (Morishita y col., 2005). AQP11 podría estar involucrada en la homeostasis del retículo endoplasmático rugoso y en la regeneración hepática (Rojek y col., 2013; Ishibashi y col., 2014).

En estudios recientes en hígado humano y murino, se identificó la expresión de **AQP7** tanto a nivel transcripcional como proteico, pero su localización celular y subcelular no fue estudiada (Gregoire y col., 2015). Estudios previos habían identificado AQP7 en el hígado de pacientes obesos, pero no investigaron su expresión en hígado normal (Rodríguez y col., 2011). El rol de AQP7 en el hígado se desconoce, pero al tratarse de una aquagliceroporina podría estar involucrada en el metabolismo del glicerol.

La **AQP8** se ha identificado en hepatocitos de rata, ratón y humanos (Calamita y col., 2001; Elkjaer y col., 2001; García y col., 2001; Tani y col., 2001; Huebert y col., 2002; Ferri y col., 2003; Larocca y col., 2009). En comparación con otras AQPs humanas, la AQP8 pertenece a una diferente subfamilia filogenética, distante de las AQPs que transportan específicamente agua (AQP0, 1, 2, 4, 5 y 6), que transportan agua y glicerol (las aquagliceroporinas AQP3, 7, 9 y 10) y la subfamilia de AQP11-12 (Agemark y col., 2012). Su organización génica y diferenciación evolutiva son únicas (Calamita y col., 1999; Zardoya y Villalba, 2001), lo que sugiere que la AQP8 evolucionó de manera independiente para poseer una especialización diferente al resto de las AQPs de mamífero (Ferri y col., 2003), ya que existen diferencias en la región de

constricción ar/R que, además del agua, permite el pasaje de otros solutos como amoníaco (Jahn y col., 2004) y H₂O₂ (Bienert y col. 2007), pero no urea ni glicerol (Koyama y col., 1998).

Utilizando ADNc de AQP8 de rata, Koyama y col. (1998) clonaron ADN genómico de AQP8 humano y pudieron predecir una secuencia de 261 aminoácidos para la proteína AQP8, conteniendo 6 dominios transmembrana, 2 motivos NPA altamente conservados y 3 sitios de glicosilación. La proteína de AQP8 humana es 76,0 % idéntica a la AQP8 de ratón, 74,9 % idéntica a AQP8 de rata, 40,4 % idéntica a la AQP vegetal gamma-TIP, y 28,9 % idéntica a la AQP3 humana.

Se expresa diferencialmente en hepatocitos de las regiones periportal y central del lobulillo hepático (Calamita y col., 2005 c). Intracelularmente, la AQP8 posee diversas localizaciones, probablemente debido a su participación en diferentes mecanismos fisiológicos. Estudios bioquímicos, sumados a inmunofluorescencia confocal e inmunoelectromicroscopía revelaron que en condiciones basales (no estimuladas) el 75 % de la AQP8 reside en estructuras intracelulares tales como, vesículas de transporte (Calamita y col., 2001; García y col., 2001), retículo endoplasmático liso (Ferri y col., 2003) y en la membrana interna de las mitocondrias (Calamita y col., 2005 b). El resto se encuentra localizado en la membrana plasmática (García y col., 2001, Huebert y col., 2002), específicamente en el dominio canalicular.

1.1.3.1. AQP8 canalicular

Esta es la forma de proteína N-glicosilada de aproximadamente 34 kDa que se encuentra localizada en el dominio de membrana canalicular de los hepatocitos y en vesículas pericanaliculares (García y col., 2001). Se encuentra involucrada en la formación y regulación de la secreción biliar (Calamita y col., 2001; Huebert y col., 2002). Se ha demostrado que disminuciones en los niveles de AQP8 en hepatocitos llevan a deficiencias en el transporte de agua canalicular para la formación de la bilis (Larocca y col., 2009, Marinelli y col., 2016).

Los hepatocitos son capaces de regular hormonalmente su permeabilidad canalicular al agua mediada por AQP8. La hormona glucagon, al inducir un estímulo colerético, estimula la translocación de vesículas intracelulares que contienen AQP8 a los microdominios lipídicos *rafts* que se encuentran en la membranas plasmáticas canaliculares, lo cual está acompañado de un aumento en la permeabilidad de

membrana al agua (Gradilone y col., 2003, Mazzone y col., 2006, Tietz y col., 2005). Este tráfico requiere la activación de vías de señalización que involucran AMP cíclico-PKA y PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa). Dado que las moléculas de AQP8 carecen de los sitios de fosforilación consenso para PKA y PI3K, y por lo tanto no podría fosforilarse (Gradilone y col., 2003, Tietz y col., 2005), se cree que el efecto del glucagon no es hacia la proteína AQP8 directamente, sino hacia proteínas asociadas a microtúbulos involucradas en el transporte vesicular (Gradilone y col., 2003, Gradilone y col., 2005). De hecho, se requiere una red microtubular intacta para la translocación de AQP8 (Gradilone y col., 2003, Gradilone y col., 2005). Además de esta regulación, la AQP8 canalicular puede ser también modulada a largo plazo modificando su expresión génica. El glucagon aumenta post-transcripcionalmente la expresión proteica de AQP8 en hepatocitos de rata. Aunque el mecanismo exacto por el cual el glucagon ejerce este efecto no ha sido determinado, parecería involucrar la inhibición de la degradación proteica de AQP8 mediada por calpaína, un proceso que también involucra las vías de señalización de AMP cíclico-PKA y PI3K (Soria y col., 2009). Existen sólidas evidencias experimentales que apoyan un rol central de la AQP8 canalicular en la promoción y regulación de la secreción osmótica de agua (Marinelli y col., 2011; Calamita y col., 2015).

1.1.3.2. AQP8 mitocondrial

Corresponde a la proteína no glicosilada de 28 kDa (García y col., 2001; Calamita y col., 2005 b). Posee una amplia distribución, habiéndose encontrado en mitocondrias de hígado, riñón, testículo, corazón, duodeno, yeyuno y colon de rata (Calamita y col., 2005 b). Se ha determinado que en hepatocitos murinos (Ferri y col., 2003; Calamita y col., 2005 b), y en líneas celulares humanas derivadas de hepatocitos (Marchissio y col., 2012, Marchissio y col., 2014), se localiza específicamente en la membrana mitocondrial interna. Existe una correlación directa entre el tamaño mitocondrial y la magnitud de expresión de AQP8 en esta organela. Se ha especulado que esto puede deberse a que en las mitocondrias de menor tamaño, la contribución de AQP8 al pasaje mitocondrial de agua no es tan relevante, ya que para las mismas es suficiente con la difusión simple de agua a través de sus membranas. Sin embargo, la AQP8 no parece contribuir de manera significativa al pasaje mitocondrial de agua (Calamita y col., 2006; Yang y col., 2006; Gena y col., 2009). En base al hecho que AQP8 es capaz de facilitar la difusión transmembrana de amoníaco (Saparov y col.,

2007) y peróxido de hidrógeno (Bienert y col., 2007), evidencias recientes sugieren que la AQP8 mitocondrial hepática estaría involucrada en la detoxificación del amoníaco via ureagénesis (Soria y col., 2010; Soria y col., 2013; Soria y col., 2014) y también en la señalización celular dependiente de H₂O₂ (Marchissio y col., 2012).

La expresión proteica de AQP8 en mitocondrias también sufre regulación hormonal. Así, la hormona tiroidea triyodotironina, que modula la actividad metabólica de las mitocondrias hepáticas, induce la disminución por regulación transcripcional de AQP8 en mitocondrias de hígado de rata (Calamita y col., 2007).

1.2. Secreción biliar

1.2.1. Importancia de las aquaporinas en la fisiología biliar

El transporte de agua a través de los hepatocitos juega un rol fundamental en la producción de bilis debido a que el agua representa más del 95% de los componentes biliares y cumple importantes funciones: (a) Mantiene distendidos los ductos y dúctulos biliares y previene la precipitación y adsorción de constituyentes biliares en el epitelio biliar evitando el éstasis biliar y eventualmente una obstrucción; (b) actúa como vehículo para el transporte desde los canalículos hasta el intestino de las sales biliares (SB) y de moléculas destinadas a eliminación tales como bilirrubina, colesterol, metales pesados, hormonas esteroideas, etc.

Las sustancias osmóticamente activas, principalmente SB y otros aniones orgánicos, son transportados activamente hacia el lumen canalicular y concentrados allí, lo que conduce al flujo obligado de agua. Así, la formación de la bilis canalicular es un proceso de secreción osmótico.

En teoría, el pasaje de agua a través de la barrera epitelial de los hepatocitos puede ser a través de las uniones estrechas situadas entre hepatocitos adyacentes (vía paracelular) o a través de los dominios de membrana plasmática basolateral y canalicular (vía transcelular). Existen evidencias recientes basadas en estudios de transporte de agua en duplas aisladas de hepatocitos, vesículas de membranas canaliculares y basolaterales y líneas celulares hepáticas, que sugieren que una vía transcelular dependiente de AQPs constituye la vía principal a través de la cual el agua ingresa al canalículo biliar, mientras que la contribución de la vía paracelular es mínima (Marinelli y col., 2011; Boyer, 2013; Boyer, 2014). Además, se ha demostrado que en condiciones basales (esto es, no estimuladas), la membrana canalicular posee una

permeabilidad osmótica al agua menor que la membrana basolateral, constituyendo el paso limitante en el transporte de agua transcelular en los hepatocitos (Marinelli y col.; 2003). En definitiva, las evidencias experimentales sugieren que el agua ingresa al canalículo biliar mayormente por la vía transcelular y a través de AQPs.

El rol de AQP8 en la secreción biliar canalicular se basa en estudios con inhibidores en duplas aisladas de hepatocitos de rata (Huebert y col., 2002) y knockdown de la expresión de AQP8 en la línea celular derivada de hepatoma humano, HepG2 (Larocca y col., 2009). AQP8 modularía el flujo de agua limitado a nivel canalicular, mientras que AQP9 modularía el flujo de agua a nivel de la membrana basolateral. Además, hormonas capaces de inducir coleresis, tales como el glucagon y las endotelinas, aumentan la expresión de AQP8 canalicular (Gradilone y col., 2003; Rodríguez y col., 2013). AQP8 contribuiría en el mecanismo molecular para el acoplamiento eficiente de solutos osmóticamente activos y el transporte de agua durante la formación de bilis en los hepatocitos (**Figura 1.3**).

1.2.2. Transportadores de solutos relevantes para la formación de la bilis en el hepatocito

La captación hepática de SB desde la sangre está mediada por transportadores ubicados en la membrana basolateral de los hepatocitos. El polipéptido co-transportador de Na^+ /taurocolato, **NTCP**, transporta la mayor parte de los ácidos biliares (~90%); preferentemente conjugados (Dawson y col., 2009) y también contribuye en el transporte de compuestos sulfatados. En menor medida, los ácidos biliares son captados por un sistema independiente de Na^+ , que transporta una gran variedad de aniones y cationes orgánicos, compuesto por una familia de transportadores poliespecíficos denominada **OATP** (proteína transportadora de aniones orgánicos) (Roth y col., 2012). Estos transportadores intervienen en la captación de SB no conjugadas, otras sustancias endobióticas, como la bilirrubina y sustancias xenobióticas, como glicósidos cardíacos y péptidos cíclicos (Hagenbuch y Meier, 2003).

Además, la membrana sinusoidal del hepatocito contiene diversas isoformas de **MRP** (proteínas asociadas a resistencia a multidroga) tales como **MRP1, 3, 4, 5 y 6** (Homolya y col., 2003; Keppler, 2011), las cuales se encargan del eflujo de aniones orgánicos desde el hepatocito hacia el espacio extracelular y normalmente se expresan

en bajos niveles, por lo que cobran relevancia en condiciones fisiopatológicas de sobrecarga de SB.

En condiciones normales, el paso limitante en el transporte de solutos biliares a través de los hepatocitos es su excreción a la bilis a través de la membrana canalicular. La mayoría de los transportadores presentes en la membrana canalicular pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) que comprenden la bomba exportadora de sales biliares, **BSEP/ABCB11**, la cual transporta ácidos biliares monovalentes, en contra de un enorme gradiente de concentración (Soroka y Boyer, 2014) y la proteína de resistencia a multidrogas 2, **MRP2/ABCC2**, que media la excreción canalicular de diversos productos lipofílicos conjugados, como glucurónidos de bilirrubina y glutatión oxidado y reducido (Roma y col., 2008, Trauner y Boyer, 2003). Por otra parte, la membrana canalicular posee un sistema de transporte independiente de ATP, la isoforma 2 del intercambiador de aniones $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, **AE2**, responsable de la excreción de bicarbonato (Meier y Stieger, 2000; Zsemberly y col., 2000) (**Figura 1.3**). Además se expresan transportadores no directamente implicados en la generación del gradiente osmótico, tales como la bomba exportadora de fosfolípidos (**MDR3/ABCB4**) que actúa como "flipasa" en la translocación de fosfatidilcolina (Roma y col., 2008, Trauner y Boyer, 2003) y el transportador de colesterol (**ABCG5/G8**) (Berge y col., 2000). Las micelas mixtas de fosfatidilcolina y colesterol incorporan SB, mitigando así sus efectos detergentes (Trauner y Boyer, 2003).

Existen otros transportadores en la membrana canalicular, que tampoco participarían directamente en la generación de la bilis: el **MDR1/ABCB1**, que tiene una función protectora contra una amplia variedad de drogas hidrofóbicas y juega un rol clave en el desarrollo de la resistencia a multidrogas (Cuperus y col., 2014) y el **BCRP/ABCG2**, que posee una función principalmente de protección contra xenobióticos. Estudios recientes sugieren que también transporta SB, aunque este transporte parecería ser más relevante en la placenta que en el hígado (Cuperus y col., 2014).

Las fuerzas principales que dirigen el movimiento osmótico de agua desde la sangre sinusoidal hacia el canalículo biliar son: la excreción de SB a través del transportador de sales biliares BSEP/ABCB11, glutatión a través del transportador de aniones orgánicos MRP2/ABCC2 y HCO_3^- , via el intercambiador de aniones cloruro/bicarbonato AE2 (Boyer, 2013) (**Figura 1.3**).

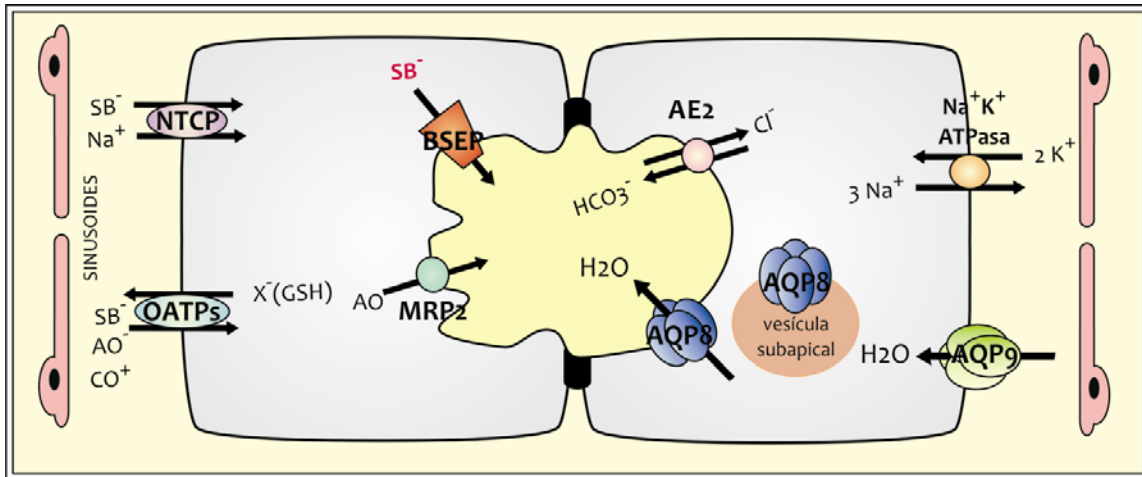


Figura 1.3. Transporte de solutos osmóticamente activos y de agua durante la formación de bilis en el hepatocito. En la figura se muestran los sistemas de transporte más relevantes en la formación de la secreción biliar. La captación hepática de sales biliares (SB^-) desde la sangre está mediada por los transportadores NTCP y OATPs, ubicados en la membrana basolateral de los hepatocitos. Las fuerzas principales que dirigen el movimiento osmótico de agua en el canalículo biliar son: la excreción de SB^- a través del transportador de sales biliares BSEP/ABCB11, glutation (GSH) a través del transportador de aniones orgánicos (AO) MRP2/ABCC2 y HCO_3^- , via el intercambiador de aniones Cl^-/HCO_3^- , AE2. La AQP8 localizada en la membrana apical modula el flujo limitante de agua canalicular, mientras que AQP9 modula el flujo de agua a nivel de la membrana basolateral.

Como se mencionó antes, la AQP8 de membrana canalicular se encuentra localizada en microdominios lipídicos (*rafts*) ricos en colesterol y esfingolípidos (Mazzone y col., 2006; Tietz y col., 2005). Se especula que estos *rafts* promueven el agrupamiento de proteínas específicas en regiones definidas de la membrana plasmática. Los transportadores canaliculares MRP2, AE2 (Tietz y col., 2005) y BSEP (Ismair y col., 2009; Bae y col., 2004), también se encuentran localizados en microdominios de membranas, por lo que podría especularse que en la membrana canalicular del hepatocito, la AQP8 se encuentra asociada a transportadores de solutos funcionalmente relacionados, que a su vez serían los generadores de la fuerza osmótica necesaria para que se produzca el transporte de agua transmembrana mediado por AQP8. Además, la localización de los transportadores en estos microdominios ricos en colesterol está relacionada con la actividad de los mismos, ya que está establecido que el nivel de colesterol de membrana modula la actividad de diversos transportadores (Storch y col., 2007; Molina y col., 2008). En el caso de BSEP, el contenido de colesterol canalicular es un factor determinante crítico de su actividad transportadora (Paulusma y col., 2009)

y existe una correlación directa entre el contenido de colesterol de membrana y la actividad BSEP.

1.2.3. Colestasis: disfunción secretora biliar

La relevancia de las AQP8 tanto en la salud como en las enfermedades humanas constituye una nueva área de investigación en ascenso, con potenciales implicancias terapéuticas y diagnósticas (King y col., 2004; Verkman, 2012). Algunas enfermedades que afectan al sistema hepatobiliar han sido asociadas a un transporte anormal de fluidos (Calamita y Portincasa, 2012) y un consecuente cuadro de colestasis (Zollner y Trauner, 2008). La colestasis se caracteriza por una alteración en la secreción biliar y se manifiesta en diversas enfermedades hepáticas. La colestasis crónica puede derivar en una cirrosis y falla biliar, requiriendo trasplante hepático (Lee y Boyer, 2000). Como se detalló anteriormente, existen sólidas evidencias que indican que las AQP8 cumplen un rol fisiológico fundamental en la formación de la bilis canalicular. Por lo tanto, es posible que una expresión defectiva de AQP8 canaliculares pueda conducir a alteraciones en la fisiología biliar normal. En condiciones patológicas experimentales donde existe una alteración en la secreción biliar, tales como, la colestasis extrahepática (obstructiva) (Carreras y col., 2007) y la colestasis intrahepática (hepatocelular) inducida por estrógenos (Carreras y col., 2003) o la asociada a sepsis (Lehmann y col., 2008; Lehmann y col., 2009), se encontró una expresión defectiva de la AQP8 canalicular.

1.2.3.1. Colestasis hepatocelular inducida por estrógenos

Los estrógenos son agentes causales de colestasis intrahepática en mujeres susceptibles. La presentación clínica más común de este trastorno corresponde a la colestasis inducida por anticonceptivos orales, la colestasis asociada al embarazo y la colestasis asociada a terapia de reemplazo hormonal de la menopausia (Lee y Boyer, 2000). La colestasis experimental inducida por 17α -etinilestradiol (EE) es un modelo ampliamente utilizado para investigar alteraciones *in vivo* de la expresión de transportadores de membrana del hepatocito.

El tratamiento crónico de ratas con el estrógeno sintético EE, reduce el flujo biliar dependiente y el independiente de SB (Lee y Boyer, 2000). Estudios orientados a dilucidar los mecanismos moleculares determinantes de la colestasis hepatocelular sugieren que la falla secretora biliar resultaría de una alteración conjunta del transporte

biliar de solutos osmóticamente activos (e.g. sales biliares) (Arrese y col., 2008, Cuperus y col., 2014) y de la permeabilidad al agua de la membrana canalicular dependiente de AQPs (Carreras y col., 2003).

Por otra parte, además de alterar los sistemas de transporte hepatocelular, EE también está implicado en la reducción de la síntesis de SB (Koopen y col., 1999), el aumento de la permeabilidad de las uniones estrechas (Elias y col., 1983), la disminución de la fluidez del dominio basolateral de la membrana plasmática del hepatocito (Rosario y col., 1988; Bossard y col., 1993) y la redistribución de gangliósidos en las membranas del hepatocito (Jirkovska y col., 2007; Petr y col., 2014).

1.2.3.1.1. AQP8 en colestasis inducida por EE

La expresión proteica de AQP8 en el hepatocito se encuentra disminuida en la colestasis inducida por estrógenos, sin cambios evidentes en los niveles proteicos de la AQP9 (Carreras y col., 2007). Aunque el mecanismo por el cual disminuye la expresión proteica de AQP8 no fue completamente dilucidado aún, parece ser posttranscripcional e involucrar un aumento en la degradación proteica vía lisosomal y a través del proteosoma (**Figura 1.4**). El hecho que la expresión de AQP8 canalicular sea defectiva en diferentes modelos animales de colestasis sugiere que esta AQP está involucrada en el desarrollo de la disfunción secretora biliar.

1.2.3.1.2. Transportadores de solutos en colestasis inducida por EE

Estudios funcionales revelan que en la colestasis por EE se encuentran disminuidas tanto la captación a nivel sinusoidal, como el transporte canalicular de SB y aniones orgánicos por disminución en la expresión de los principales transportadores de membrana sinusoidal, NTCP y OATPs (Simon y col., 1996; Geier y col., 2003); y canalicular, MRP2/ABCC2 y BSEP/ABCB11 (Huang y col., 2000; Geier y col., 2007; Cuperus y col., 2014; Lam y col., 2010).

Además, se produce un aumento compensatorio de la expresión basolateral de algunos transportadores de la familia de proteínas asociadas a resistencia a multidroga (Keppler, 2011; Ruiz y col., 2013). El aumento de la expresión del transportador basolateral MRP3/ABCC3 (Ruiz y col., 2013), junto con la disminución de la captación de SB, contribuyen a disminuir la acumulación tóxica de las SB en el hepatocito (Pauli-Magnus y col., 2010). Por otro lado, esto conduce a un marcado incremento del nivel

sérico de las SB, lo cual constituye un parámetro bioquímico clave en el curso de la colestasis, por sus potenciales efectos deletéreos (Rosario y col, 1988).

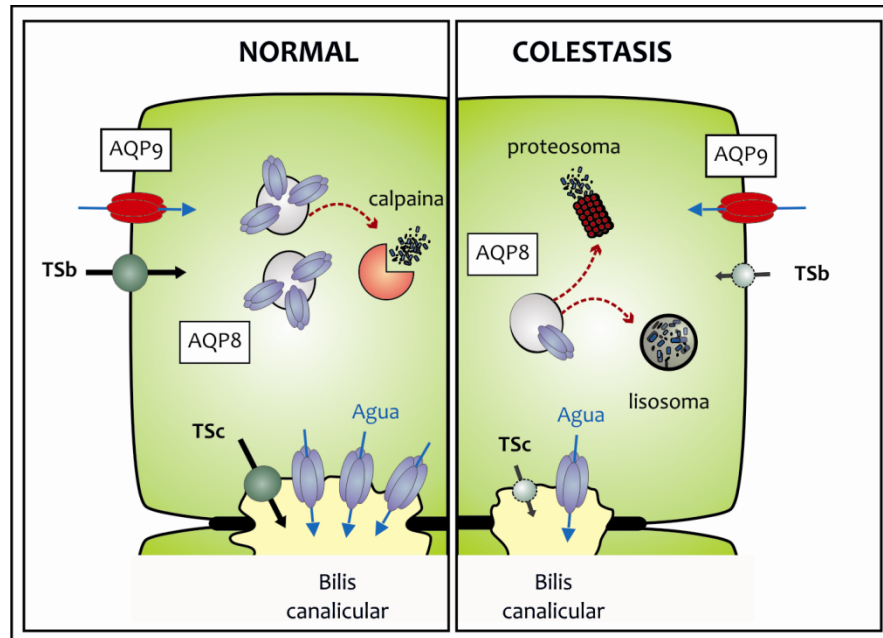


Figura 1.4. Contribución de la AQP8 canalicular en la colestasis hepatocelular. A la izquierda, se ilustra un hepatocito normal. Las sales biliares y otros aniones orgánicos son secretados al canalículo biliar a través de transportadores de solutos canaliculares (TSc), i.e. la bomba exportadora de sales biliares BSEP/ABCB11, el transportador de aniones orgánicos MRP2/ABCC2 y el intercambiador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, AE2. La AQP8 facilita el flujo osmótico de agua a través de la membrana canalicular mientras que la AQP9 contribuye a la captación basolateral de agua. Las calpainas están involucradas en la modulación de la degradación de AQP8 endógena. A la derecha, se ilustra un hepatocito colestásico. La expresión de AQP8 canalicular disminuye por degradación lisosomal y proteosomal. La colestasis hepatocelular resulta de una alteración conjunta en la excreción biliar de solutos, por disminución de TSc, y de la permeabilidad osmótica al agua mediada por AQP8.

1.3. Adenovirus como vectores virales

Los virus constituyen, probablemente, la forma de vida más simple y representan el ente natural más evolucionado para transferir material genético exógeno al interior celular. Hasta el día de hoy, el ser humano no ha sido capaz de crear artificialmente un sistema que supere la eficiencia de transferencia génica que han alcanzado los virus tras millones de años de evolución. Este hecho ha llevado al empleo y manipulación de los

virus como vectores para transferir material génico con fines experimentales y terapéuticos. (Narvaiza y col., 2003)

Se conocen casi 50 serotipos distintos de adenovirus humanos divididos en 6 subgrupos (A, B, C, D, E y F) en función de sus características inmunológicas, biológicas y secuencias genómicas. Los adenovirus humanos mejor caracterizados y más utilizados en terapia génica son los adenovirus tipo 2 (Ad2) y tipo 5 (Ad5) pertenecientes al subgrupo C (Shenk, 1996). Estos adenovirus generan enfermedades respiratorias en humanos y pertenecen a la subclase de adenovirus que no están asociados a tumores (Kozarsky, 1993).

La utilidad de los adenovirus recombinantes para terapia génica no fue la anticipada en base al espectro de enfermedades que se manifestaban en las infecciones adquiridas naturalmente. Los adenovirus humanos se asocian principalmente a un amplio rango de enfermedades respiratorias y de diarreas; siendo la hepatitis una manifestación extremadamente rara en las infecciones adenovirales humanas. El Ad5 es ampliamente utilizado en estudios de transferencia génica hepática debido a su natural tropismo hacia este órgano luego de su administración sistémica. La utilidad de los adenovirus recombinantes para terapia génica dirigida al hígado ha sido demostrado en ratas (Jaffe y col., 1992) y en otras especies, como ratones, conejos, perros y monos Rhesus. (Wilson, 2001; Narvaiza y col., 2003).

Las propiedades de los vectores adenovirales son: 1) un tropismo muy amplio, infectando numerosos tipos celulares; 2) infectan tanto células quiescentes como células en división; 3) muy alta eficacia de transducción; expresan cantidades altas del transgen; 4) no requieren de integración en su ciclo infectivo y el material génico se expresa de forma episomal; 5) son muy inmunogénicos; 6) su construcción, manipulación y producción son relativamente sencillas, son virus estables y se obtienen títulos altos (10^{11} - 10^{15} ufp/ml); 7) no se han descrito patologías graves asociadas al adenovirus salvaje; 8) su toxicidad como vector es baja y su bioseguridad es alta (Narvaiza y col., 2003; Li y col., 1993; Tao y col., 2001; Worgall y col., 1997; Hendrickx y col., 2014).

1.3.1. Estructura y organización genómica de la partícula adenoviral

Los adenovirus son virus de ADN cuyo genoma está encerrado en una cubierta proteica de geometría icosaédrica, denominada cápside, de 70-100 nm de diámetro. La

cápside está formada por tres proteínas principales: el hexón, la base pentona y la fibra con una protuberancia terminal, además de otras proteínas menores VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 (Shenk, 1996; Stewart y col., 1991; Stewart y col., 1993) (**Figura 1.5**). El genoma viral es una molécula lineal de ADN de doble hebra de unas 36 Kb con una proteína terminal unida covalentemente a cada uno de sus extremos 5'. En ambos extremos del genoma viral se definen unas secuencias cortas denominadas ITRs que constituyen el origen de replicación del ADN. A continuación del ITR izquierdo (con relación al mapa del genoma adenoviral establecido por convención) se localiza la secuencia de empaquetamiento (Ψ), requerida para la encapsidación del genoma. El ADN viral está íntimamente asociado con una proteína muy básica (VII) y con un pequeño péptido denominado μ . Otra proteína, denominada V, está empaquetada con este complejo ADN-proteína y parece que constituye una unión estructural con la cápside, a través de la proteína VI. El virus contiene, además, una proteasa codificada por el genoma viral (Pr) que es necesaria para el procesamiento de algunas proteínas estructurales y para producir virus infecciosos maduros (Shenk, 1996).

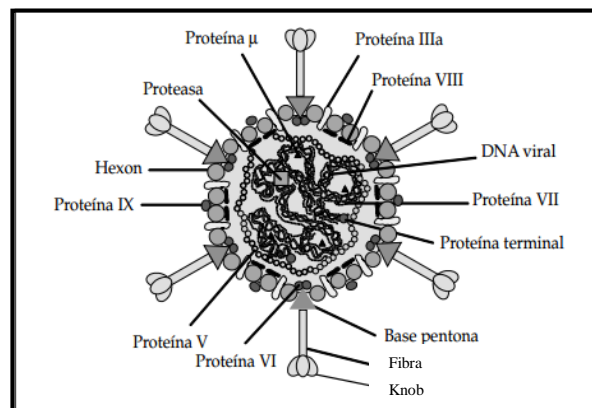


Figura 1.5. Estructura de la partícula adenoviral. La organización de las proteínas estructurales se basa en estudios publicados, excepto la localización de la proteína VIII y la organización espacial del genoma viral (Narvaiza y col., 2003).

Los productos génicos se organizan en regiones tempranas (E1-E4) y tardías (L1-L5), basadas en la expresión anterior o posterior al inicio de la síntesis del ADN viral. Los adenovirus poseen un ciclo de vida lítico, son captados por las células a través de receptores, ingresan al compartimiento endosomal, y desde allí el virus ingresa al citoplasma y comienza a perder su cubierta proteica. El ADN viral migra al núcleo, donde mantiene su estructura lineal, en lugar de integrarse al cromosoma.

1.3.2. Vectores Adenovirales de Primera Generación

Los adenovirus recombinantes de primera generación, defectivos en replicación, que se utilizan para terapia génica, poseen deleciones en la región E1 y/o E3. La región E1 regula la transcripción adenoviral y se requiere para la replicación viral (Gao y col., 1996). Los adenovirus de primera generación son, hasta el día de hoy, los más empleados en terapia génica. Los adenovirus delecionados en E1 admiten transgenes de hasta 5,1 Kb, cuyo tiempo de expresión es de 7 a 14 días (Kaplan y col., 1997), debido a la generación de una respuesta inmunitaria, lo que impide la administración repetida del adenovirus debido al efecto neutralizante de los anticuerpos contra la cápside viral generados con la primera administración.

1.3.2.1. Vector Adenoviral que codifica para aquaporina-1 humana: AdhAQP1

El vector adenoviral AdhAQP1, construido por el grupo del Dr. Bruce J. Baum (Gene Transfer Laboratories, NIH, USA), es un vector de primera generación, defectivo en replicación, que codifica para la aquaporina-1 humana (hAQP1). (Delporte y col., 1997). El vector AdhAQP1 ha sido utilizado en animales de experimentación con el propósito de corregir la hipofunción salival generada por radiación (Delporte y col., 1997). Esto se basa en que los pacientes con cáncer de cabeza y cuello sometidos a terapia radiante, sufren un daño importante e irreversible en la función de sus glándulas salivales. AdhAQP1 fue administrado en forma retrógrada por el conducto salival de las glándulas submaxilares de ratas, encontrándose a los 3 días aumento de expresión de la proteína hAQP1 en células acinares y ductales y una corrección de aproximadamente 80% del flujo salival. La transferencia génica del vector AdhAQP1 vía administración ductal retrógrada a glándulas salivales no mostró hepatotoxicidad significativa (Zheng y col., 2006). El vector fue bien tolerado por los animales, sin mostrar efectos adversos significativos (Kuriyama y col., 2005; Teos y col., 2016).

AdhAQP1 está aprobado en EE.UU. por la *Food and Drug Administration* (FDA) y actualmente está siendo usado para estudios clínicos de fase 1 en pacientes con hipofunción salival causada por terapia radiante (Baum y col., 2012).

1.3.3. Administración de adenovectores al hígado

Los estudios de transferencia génica al hígado de rata utilizan diferentes vías de administración: intravenosa, intraarterial, intraórgano, intraportal o retrobiliar (retrógrada intrabiliar) (Scholl y col., 2001; Brunetti-Pierri y col., 2005; Kuriyama y

col., 2005; Jiang y col., 2013). La vía retrobiliar tiene la ventaja de generar una menor reacción inmune sistémica, lo cual permite una eventual readministración del adenovector (Tominaga y col., 2004) y ha sido utilizada por su potencial significancia clínica (i.e. colangiografía endoscópica retrógrada en pacientes) (Terao y col., 1998; Xie y col., 2000; Jiang y col., 2013). Para nuestro proyecto en particular, existe una conveniencia adicional: la mayor exposición de AdhAQP1 a los hepatocitos periportales (hepatocitos determinantes de la producción de la secreción biliar canalicular) (Monte y col., 1993).

Con respecto a la transferencia génica *in vivo* de aquaporinas, existe un número muy limitado de estudios referidos a esta temática; como los conducentes a corregir el flujo salival (Baum y col., 2006) o a atenuar una disfunción renal (Yang y col., 2000), pero, para nuestro conocimiento, ninguno referido a la función hepática.

2. OBJETIVOS

El OBJETIVO GENERAL de este Trabajo de Tesis fue evaluar si la corrección de la permeabilidad canalicular al agua, vía transferencia génica *in vivo* de AQPs, atenúa la falla secretoria biliar en colestasis hepatocelular.

Para tal fin, en un modelo animal de colestasis hepatocelular inducida por el estrógeno EE, y utilizando el adenovector AdhAQP1 que codifica para la AQP1 humana, se plantearon los siguientes OBJETIVOS PARCIALES:

- (1) Estudiar si la administración de AdhAQP1 induce la expresión de hAQP1 en la membrana hepática canalicular y un consecuente aumento de su permeabilidad osmótica al agua.
- (2) Estudiar si la expresión canalicular de hAQP1, vía AdhAQP1, incrementa el flujo biliar y la eficiencia colerética de las SB en colestasis.
- (3) Estudiar si la expresión canalicular de hAQP1, vía AdhAQP1, afecta la excreción biliar de las SB y sus niveles séricos en colestasis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tratamientos y diseños experimentales

3.1.1. Animales

Para la realización del presente trabajo de Tesis se utilizaron ratas Wistar macho adultas (300 - 350 g), provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de Rosario. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo luz-oscuridad de 12 h de acuerdo a normas internacionales preestablecidas para el cuidado de animales de laboratorio (*“Guide for the care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health”*).

3.1.2. Vectores Adenovirales

3.1.2.1. AdhAQP1

Se utilizó el vector recombinante AdhAQP1 construido en el Laboratorio de Transferencia Génica (National Institutes of Health), gentilmente donado por el Dr. Bruce Baum. AdhAQP1 es un vector de primera generación, derivado de un adenovirus serotipo 5, deficiente en la replicación, que carece de la región E1. Para construir el AdhAQP1 (**Figura 3.1**), el ADNc de la hAQP1 fue clonado directamente en el vector Ad5 de transporte pACCMVpLpA. Dicho plásmido contiene parte del genoma Ad5 con el promotor inmediato del citomegalovirus sustituido entre las unidades de mapa 1.3 y 9.1 (Región Ad5 E1; Fig. 3.1). Se amplificó el ADNc de la hAQP1 (3 kb) por PCR utilizando cebadores específicos que contienen los sitios de restricción KpnI y BamHI para el clonado. El plásmido resultante, llamado pCMVhAQP1, fue cotransfectado con el plásmido Ad5 pJM17 en células 293 para obtener AdhAQP1 (Delporte y col, 1997). El vector AdhAQP1 requirió de amplificación, purificación y titulación, lo cual fue realizado en una primera instancia en el Laboratorio de Terapia Génica de la Universidad Austral a cargo del Dr. Guillermo Mazzolini y en una segunda instancia a cargo del Dr. Rodolfo Goya, en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata.

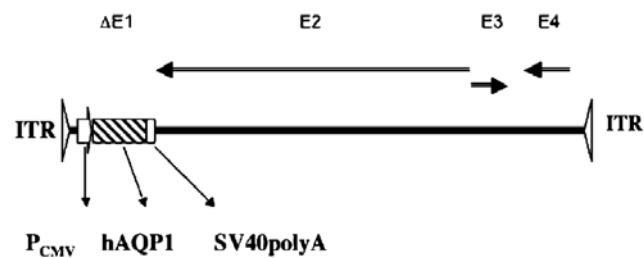


Figura 3.1: Esquema de la estructura de AdhAQP1. Se utilizaron las siguientes abreviaturas: ITR, repetición terminal invertida; PCMV, promotor inmediato del Citomegalovirus; hAQP1, ADNc de la aquaporina-1 humana; SV40polyA, señal de poliadenilación de Simian Virus 40; $\Delta E1$, delección de las secuencias adenovirales E1; E2, genes adenovirales E2; E3, genes adenovirales E3; E4, genes adenovirales E4.

3.1.2.2. Vector control

Se utilizó un adenovirus recombinante de primera generación, derivado de un adenovirus serotipo 5, deficiente en la replicación, que carece de la región E1 y que codifica para β -galactosidasa (Adc).

3.1.3. Tratamiento con EE: modelo de colestasis hepatocelular

Como modelo de colestasis hepatocelular se utilizaron ratas inyectadas con EE (Carreras y col., 2007). Los animales recibieron una dosis de 5 mg/kg peso corporal de EE (Sigma) diariamente, durante 5 días, por vía subcutánea. Los animales controles recibieron sólo el vehículo (propilenglicol).

3.1.4. Administración del vector

Modelo experimental de Administración Retrobiliar vía Transduodenal

Luego de la tercera inyección de EE o vehículo, las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (*Vetanarcol*) coadministrada con Xylacina (*Kensol*) por vía intraperitoneal. La dosis utilizada fue 100 mg/Kg Ketamina + 15 mg/Kg Xylacina, ya que permite una ventana de trabajo adecuada para realizar la cateterización transduodenal del colédoco y una rápida recuperación post-quirúrgica.

Laparotomía: Primero se procedió a rasurar el área abdominal del animal. Se realizó una incisión abdominal mínima longitudinal (2 cm aproximadamente) en el plano de la piel justo por debajo del apéndice xifoides. Se repitió la incisión en el plano

muscular. Se expuso el duodeno justo por debajo de la cara inferior del hígado y se extrajo mínimamente la segunda porción del mismo.

Cateterización transduodenal: Se localizó la desembocadura del colédoco en la cara mesentérica del duodeno, la cual puede visualizarse como una pequeña ampolla que ingresa en la pared duodenal de atrás hacia adelante, de derecha a izquierda y de abajo hacia arriba. Una vez localizado el sitio de ingreso del colédoco se realizó una punción con aguja calibre 25G en la cara antimesentérica duodenal para ingresar un catéter de polietileno PE-10 (Intramedic, Clay Adams, Parsippany, NJ) hasta ubicar la papila de Vater en la mucosa posterior. Una vez cateterizado el colédoco se ingresó aproximadamente 1 cm cuidando de no llegar al hilio hepático.

Administración retrobiliar: Se administró una dosis de 3×10^{10} unidades formadoras de placa (ufp)/animal en un volumen final de 300 μ L de solución fisiológica estéril en jeringa de 1 ml equipada con una aguja calibre 30G, inyectando la solución en forma retrógrada a través del extremo distal del catéter de manera lenta y continua durante un lapso de 3 min. En experimentos de control adicionales, los animales recibieron sólo 300 μ L de solución fisiológica estéril. El catéter se mantuvo en el lugar durante un lapso de 15 min, para evitar el flujo anterógrado. Se realizaron experimentos de puesta a punto para determinar tiempo y dosis óptima de administración del adenovirus.

Finalización del procedimiento: Una vez administrada la solución se retiró el catéter y se procedió a suturar el plano muscular y la piel del animal. Luego del procedimiento y pasado el efecto de la anestesia los animales se recuperaron adecuadamente. Fueron colocados en sus respectivas jaulas y se evaluó su estado general durante 72 h posteriores al tratamiento (en estudios iniciales, también se evaluó el estado a las 48 h).

3.1.5. Estudios de secreción biliar y obtención de muestras

Pasadas 72 h de la administración del vector, los animales fueron anestesiados como se describió arriba y se mantuvieron en esta condición durante la recolección de bilis, la cual se realizó por fístula biliar y el flujo biliar fue determinado por gravimetría, como se describe a continuación: Se procedió a realizar una laparotomía transversal inmediatamente por debajo del apéndice xifoides. Se localizó el colédoco en el mesenterio duodenal y se lo aisló del tejido conectivo circundante colocando una sonda

acanalada por debajo del mismo. Utilizando la sonda como superficie de apoyo, se efectuó una punción con aguja calibre 25G y se introdujo un catéter de polietileno calibre PE-10 (Intramedic, Clay Adams). Durante todo el procedimiento quirúrgico se mantuvo la temperatura corporal del animal con lámpara de calentamiento infrarroja entre 37 °C y 38 °C. Una vez realizada la fístula biliar, se dejó estabilizar el flujo durante 10 min y se recolectó la bilis que fluye por el catéter en tubos pre-pesados durante períodos de 10 min, durante 30 minutos. Luego se inyectó la sal biliar taurocolato (TC) (Sigma) (8 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ peso corporal, intravenosa) para estimular el flujo biliar (canalicular) y se recolectó bilis durante un período adicional de 10 minutos. El flujo biliar se determinó promediando el volumen de la bilis recolectada en al menos tres períodos de recolección, asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/mL (Carreras y col., 2007).

Finalizada la recolección de bilis, se tomaron muestras de sangre por punción cardíaca y el plasma fue separado. Los animales fueron sacrificados por exsanguinación y los hígados fueron removidos y almacenados a -70 °C para su posterior análisis.

3.2. Determinaciones serológicas

3.2.1. Fosfatasa alcalina

La actividad de esta enzima fue determinada utilizando un kit enzimático comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante (Wiener Lab). La fosfatasa alcalina hidroliza al p-nitrofenilfosfato, que es incoloro, produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH 9,8. La velocidad de aparición del anión p-nitrofenolato (amarillo) a 405 nm, es proporcional a la actividad enzimática de la muestra. Las unidades de actividad enzimática específica se definieron como μmol de p -nitrofenilfosfato hidrolizado por min.

3.2.2. Lactato Deshidrogenasa

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se determinó espectrofotométricamente midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm, producida por la oxidación del NADH a NAD^+ en la reacción acoplada de reducción de piruvato a lactato catalizada por la LDH. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó un kit enzimático comercial (Wiener Lab), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las unidades de actividad enzimática fueron definidas como μmol de sustrato consumido por hora a 37 °C.

3.2.3. Alanina aminotransferasa

La enzima alanina aminotransferasa (ALT/GPT) cataliza la reacción de transferencia entre L-alanina y 2-oxoglutarato para producir piruvato y L-glutamato. En un paso subsiguiente, el oxalacetato producido es convertido, en presencia de NADH, en L-lactato por la enzima lactato deshidrogenasa. Así, la velocidad de desaparición de NADH a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa de la muestra. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó un kit enzimático comercial (Wiener Lab), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las unidades de actividad enzimática fueron definidas como μmol de sustrato consumido por hora a 37 °C.

3.2.4. Aspartato aminotransferasa

La enzima aspartato aminotransferasa (AST/GOT) cataliza la reacción de transferencia entre L-aspartato y 2-oxoglutarato para producir oxalacetato y L-glutamato. En un paso subsiguiente, el oxalacetato producido es convertido, en presencia de NADH, en L-malato por la enzima malato deshidrogenasa. Así, la velocidad de desaparición de NADH a 340 nm es directamente proporcional a la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa de la muestra. Para determinar la actividad de esta enzima se utilizó un kit enzimático comercial (Wiener Lab), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las unidades de actividad enzimática fueron definidas como μmol de sustrato consumido por hora a 37 °C.

3.2.5. Sales biliares séricas

En presencia de Thio-NAD, la enzima 3- α hidroxisteroide deshidrogenasa convierte los ácidos biliares en 3-ketoesteroides y Thio-NADH. La reacción puede revertirse y 3- α hidroxisteroide deshidrogenasa puede convertir 3-ketoesteroides, y Thio-NADH en ácidos biliares y Thio-NAD. En la presencia de NADH en exceso, los ciclos de enzimas se presentan en forma eficaz y la tasa de formación de Thio-NADH se determina mediante la medición del cambio específico de la absorción a 405 nm. Para determinar la concentración de SB séricas se utilizó un kit enzimático comercial (Randox), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3. Sales biliares en bilis

Se evaluó la concentración de SB totales en bilis utilizando el ensayo de la 3 α -hidroxisteroide deshidrogenasa (Talalay, 1960).

3.4. Eficiencia colerética de las sales biliares endógenas

Los animales fueron anestesiados y se cateterizó el conducto biliar común con un catéter de polietileno PE-10. Se recolectó bilis durante 6 horas, en períodos de 1 h. Se determinó el flujo biliar y la concentración de SB totales. La eficiencia colerética de las SB endógenas (es decir, volumen de bilis/ μ mol de sal biliar excretada) se estimó a partir de la pendiente de las gráficas de flujo biliar versus excreción de SB (Koopen y col., 1998).

3.5. Composición biliar de sales biliares

En el primer y sexto períodos de bilis recolectada para determinar la eficiencia colerética de SB endógenas (ver arriba), se identificaron las SB individuales y se cuantificaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Waters, Milford, MA) por comparación con compuestos estándares, como está descrito (Tietz y col., 1984).

3.6. Secreción biliar de [³H]TC

Se realizaron experimentos en ratas para estudiar la secreción biliar de [³H]-TC. Se recolectó bilis en períodos de 10 min durante 30 min (flujo biliar basal), seguidamente se realizó una inyección intravenosa en bolo de [³H]TC (actividad específica 5 Ci/mmol, Perkin Elmer) (0,1 μ Ci disueltos en 0,3 mL de solución fisiológica) y se continuó la recolección de bilis durante 30 minutos cada 5 minutos. Se tomaron alícuotas de 50 μ L, se adicionaron 3 mL de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se determinó la radiactividad correspondiente en el contador de centelleo, como cuentas por minuto (cpm) (Hung y col., 2005).

3.7. Fraccionamiento subcelular

3.7.1. Preparación de membranas plasmáticas hepáticas

Se prepararon homogenados al 20% a partir de hígados de ratas normales y tratadas. Los tejidos se homogeneizaron en sacarosa 0,3 M (MP Biomedicals) conteniendo los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma-Aldrich) 0,1 mM y leupeptin (Chemicon, Millipore) 0,1 mM. El homogenado de hígado se centrifugó a 500 g por 10 min para obtener los sobrenadantes post-nucleares. Para obtener la fracción enriquecida en membranas plasmáticas, estos sobrenadantes post-nucleares se sembraron en un gradiente discontinuo de sacarosa 1,3 M / 0,3 M (Carreras y col., 2003). Se centrifugó 1 h a 200.000 g a 4 °C. Se removió la banda de membranas

plasmáticas que quedó en la interfase y se diluyó en agua suplementada con inhibidores de proteasas, hasta una concentración final de sacarosa 0,3 M. Se centrifugó luego 1 h a 200.000 g a 4 °C. El pellet que contiene las membranas plasmáticas se resuspendió en sacarosa 0,3 M con inhibidores de proteasas y se congeló a -70 °C. Para obtener un grado de purificación aún mayor, la fracción de membranas plasmáticas obtenida se colocó en un gradiente lineal de sacarosa de 9 a 60% (suplementado con inhibidores de proteasas) y se sometió a ultracentrifugación en rotor vertical TV865 durante 90 min a 100.000 g, a 4 °C (Carreras y col., 2003). Se removió la banda de membranas y se lavó dos veces con NaHCO₃ 1 mM pH 7,5; centrifugando durante 30 min a 200.000 g, a 4° C. Los pellets conteniendo las membranas plasmáticas altamente purificadas se resuspendieron en sacarosa 0,3 M.

3.7.2. Preparación de membranas plasmáticas canaliculares

Las membranas plasmáticas altamente purificadas se sometieron a “*douncing*” en un potter-émbolo apropiado vidrio-vidrio tipo B durante 50 veces. Las muestras se sembraron sobre un gradiente discontinuo de sacarosa de 38%, 34% y 31% y se centrifugaron en rotor vertical SW40Ti durante 3 h a 270.000 g a 4 °C, obteniéndose la fracción correspondiente a membranas canaliculares en la parte superior de la sacarosa 31% (Carreras y col., 2007; Marinelli y col., 2003). Esta banda fue removida cuidadosamente, se diluyó en agua para obtener una concentración de sacarosa final de 0,3 M y luego se centrifugó 1 h a 200.000 g a 4 °C. El pellet, conteniendo la fracción de membrana plasmática canalicular, se resuspendió en sacarosa 0,3 M con inhibidores de proteasas y se mantuvo a -70 °C hasta su posterior uso. También se recuperó del gradiente discontinuo la banda correspondiente a las membranas basolaterales, localizada en la parte superior de la sacarosa 38%.

3.7.2.1. Actividad 5'-nucleotidasa

La enzima 5'-nucleotidasa cataliza la desfosforilación de fosfonucleósidos con grupos fosfato en posición C5 del anillo de ribosa, tal como el AMP, con máxima actividad a pH 7,5. A este pH, el AMP también es hidrolizado inespecíficamente por las fosfatasas alcalinas presentes en la muestra. La 5'-nucleotidasa es inhibida selectivamente por iones Ni²⁺. Así, la actividad de esta enzima es directamente proporcional a la diferencia de medidas entre la cantidad de fosfato liberado en presencia y ausencia de Ni²⁺. La determinación de la actividad de la enzima 5'-

nucleotidasa se realizó mediante un kit enzimático comercial (Wiener Lab), según las indicaciones del fabricante. Para la determinación del fosfato liberado, se cortó la reacción enzimática con el agregado 0,5 mL de TCA 10% y se centrifugó durante 5 min a 2.000 g. Se tomaron 0,1 ml del sobrenadante y se agregó 2 mL del reactivo de color (0,5 mL de H₂SO₄ 6 N + 1 mL H₂O + 0,5 mL de molibdato de amonio 2,5% + 0,5 mL de ácido ascórbico 10%). Luego de 20 min de incubación a 45 °C, se dejó enfriar y se realizó la lectura de absorbancia a 830 nm (Howard Evans, 1979). Las unidades de actividad enzimática se definen como μmol de producto formado por hora a 37 °C. La actividad específica se obtuvo relacionando el valor de la pendiente de la recta (absorbancia en función del tiempo) sobre los mg de proteína utilizados en la reacción.

3.7.2.2. Pureza y enriquecimiento de las membranas plasmáticas canaliculares

La pureza de las membranas canaliculares no fue afectada por la colestasis y/o la expresión de la hAQP1. La actividad específica del marcador canalicular 5'-nucleotidasa en membranas canaliculares fue similar al reportado previamente por nuestro grupo (Carreras y col., 2007) y no difirió entre los distintos grupos experimentales (**Figura 3.2 A izquierda**). El enriquecimiento de la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa en membranas canaliculares con respecto a la actividad en homogenados fue alrededor de 30 en todos los grupos; en concordancia con lo publicado anteriormente (Carreras y col., 2007). De acuerdo a lo esperado, se observó una mínima contaminación con membranas basolaterales, basada en la detección por inmunoblotting del marcador basolateral AQP9 (**Figura 3.2 B**).

Asimismo, las membranas basolaterales también evidenciaron muy baja contaminación cruzada con las membranas canaliculares (**Figuras 3.2 A derecha y 3.2 C**).

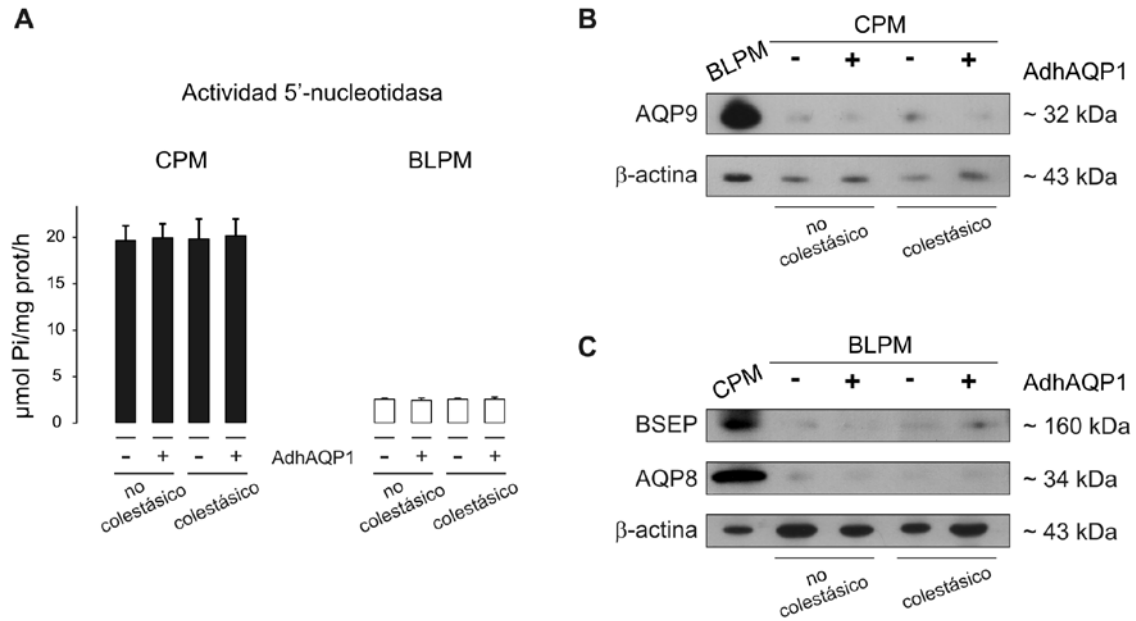


Figura 3.2. Presencia de marcadores proteicos de membranas plasmáticas canaliculares y basolaterales en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1. (A) Actividad específica de la enzima 5'-nucleotidasa (marcador canalicular) en membranas canaliculares (CPM) y basolaterales (BLPM). Los datos se expresan como medias \pm error estándar ($n=3$). Las actividades específicas se expresan como μmol de producto formado/mg proteína/h. La actividad 5'-nucleotidasa en las membranas basolaterales fue muy bajo, consistente con un esperado nivel de contaminación cruzada (Huebert y col., 2002), y no difirió entre los grupos experimentales. (B) Inmunobloting representativo para la proteína AQP9 (marcadora de membrana basolateral) en membranas canaliculares. Se sembraron 20 μg proteína/calle. Se sembró la misma cantidad de proteína correspondiente a la membrana basolateral como control positivo. Las membranas fueron reprobadas utilizando el anticuerpo anti- β -actina como control de carga. (C) Inmunoblotings representativos de BSEP y AQP8 en membranas basolaterales (20 μg proteína/calle). Los niveles de expresión de ambas proteínas transportadoras canaliculares son prácticamente indetectables. Se sembró la misma cantidad de proteína correspondiente a la membrana canalicular como control positivo. Las membranas fueron reprobadas utilizando el anticuerpo anti- β -actina como control de carga. La banda correspondiente a la β -actina de las membranas basolaterales es típicamente más intensa que la correspondiente a las membranas canaliculares.

3.8. Transporte osmótico de agua en membranas canaliculares: espectrofotometría de flujo detenido (*stopped flow light scattering*)

Para la determinación del flujo de agua inducido osmóticamente en vesículas de membrana canaliculares, se registró el cambio en el volumen vesicular mediante la intensidad de luz dispersada a 450 nm en función del tiempo, utilizando un equipo de espectrofotometría de flujo detenido (*stopped flow light scattering*) SX.18MVR

(Applied Photophysics) (Carreras y col., 2007). El equipo posee un tiempo muerto de 1,3 milisegundos y una eficiencia de mezclado de 99% en tiempos menores a 1 milisegundo, y se encuentra en el laboratorio del Dr. Alejandro Vila, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET).

Para llevar a cabo los experimentos, una suspensión de vesículas canaliculares obtenida como se detalló anteriormente, se diluyó en buffer Hepes-Tris 5 mM pH 7,4 conteniendo sacarosa 50 mM. Con esta suspensión se llenó una de las jeringas del equipo, mientras que la otra se cargó con el mismo buffer que contenía una concentración de sacarosa mayor, de forma tal de establecer un gradiente osmótico de 250 mosM luego del mezclado. La concentración final de proteínas luego de la mezcla fue de 150 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y la temperatura de las muestras fue mantenida a 20 °C mediante un baño termostatzado de agua recirculante.

Inmediatamente después de establecerse el gradiente hipertónico, se produce un flujo de agua desde el interior de las vesículas que provoca una disminución del tamaño de las mismas y un consecuente aumento en la intensidad de luz dispersada. El coeficiente de permeabilidad osmótica al agua se calcula mediante la ecuación (Marinelli y col, 2003): $P_f = K_{exp} \cdot V_o/A_v \cdot V_w$, donde V_o es el volumen inicial de las vesículas, A_v es el área inicial de las vesículas, V_w es el volumen molar del agua (18 cm^3/mol), ΔC es el gradiente osmótico aplicado (0,25 mol/cm^3) y K_{exp} es la constante exponencial de ajuste de la curva intensidad de luz dispersada vs. tiempo. V_o y A_v se calcularon para cada grupo a partir del valor de diámetro promedio de las vesículas canaliculares (160 ± 9 nm), que fue determinado por análisis morfométrico de imágenes obtenidas por microscopía electrónica en determinaciones anteriores del grupo (Carreras y col., 2007).

3.9. Transporte de TC en vesículas de membranas canaliculares hepáticas

La captación de [^3H]-TC (actividad específica 5 Ci/mmol, Perkin Elmer), se determinó en vesículas de membranas canaliculares mediante la técnica de filtración rápida (Boyer y Meier, 1990). Las preparaciones de vesículas de membrana canaliculares conservadas a -70 °C se descongelaron rápidamente, colocándolas en un baño termostatzado a 37° C, y fueron diluidas a la concentración proteica adecuada (2,5 mg/mL), y vesiculizadas mediante 10 pasajes a través de una jeringa con aguja de calibre 25 G. Se incubaron 20 μL de una solución que contenía 50 μg de dichas

vesículas a 37 °C, y el transporte se inició adicionando 80 µL de un buffer de incubación (en mM: 100 sacarosa, 100 NaCl, 0.2 CaCl₂, 5 MgSO₄, and 20 HEPES-Tris, pH 7.5) con 0.5 µCi [³H]-TC, en presencia y en ausencia de ATP 5 mM (Sigma). Luego de 30 s y 1 minuto de incubación, se detuvo la reacción mediante el agregado de 3.5 mL del buffer de stop fría (en mM: 100 sacarosa, 100 NaCl, 0.2 CaCl₂, 5 MgSO₄, and 20 HEPES-Tris, pH 7.5, T = 4 °C) y se realizó una filtración rápida, utilizando filtros de PVDF con un diámetro de poro de 0.45 µm (Millipore), pre-lavados con una solución 1 mM de TC frío, para reducir uniones inespecíficas. Los filtros se lavaron 5 veces con 3.5 mL de la solución de stop, se disolvieron en 3 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se contó la radiactividad asociada al filtro en el contador de centelleo (RackBeta 1214, Pharmacia Wallac Oy). Las uniones no específicas a las membranas se determinaron utilizando el mismo método, con la diferencia que el experimento se llevó a cabo a una temperatura entre 0-4°C. La actividad BSEP se estimó a partir del transporte de [³H]-TC dependiente de ATP (Boyer y Meier, 1990). El transporte de TC varió en forma lineal hasta un minuto. Todos los experimentos se realizaron por triplicado (n=3). El 20-30% de las vesículas de membrana canalicular se encuentran con una orientación *inside-out*, lo que permite el acceso directo del ATP adicionado exógenamente a sus sitios de unión en la molécula de BSEP orientados citoplasmáticamente (Stieger y col., 1992). El tratamiento con EE no afecta la orientación de las vesículas (Bossard y col., 1993).

3.10. Preparación de microdominios canaliculares solubles/insolubles en detergente

Las vesículas de membrana canaliculares fueron resuspendidas en buffer TNE (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasas), conteniendo una concentración final de Tritón X-100 1% (Sigma-Aldrich) e incubadas en hielo durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 18.000g durante 1 hora y los sobrenadantes (que contienen las proteínas solubles en Tritón X-100), se recolectaron en un nuevo tubo. Los pellets fueron resuspendidos en un buffer de solubilización (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 5 mM EDTA y 1% SDS) y homogeneizados. Luego de la precipitación con acetona, las fracciones solubles e insolubles fueron procesadas para SDS-PAGE e inmunobloting (Van der Wouden y col., 2002).

Para preparar los microdominios solubles/insolubles en detergente por *gradiente de flotación en sacarosa*, se realizó la extracción con Tritón X-100 descripta arriba. Luego, las muestras se llevaron a una concentración final de sacarosa 40%, se colocaron

en un gradiente discontinuo de sacarosa 30%/5% que contenía Tritón X-100 0.5% y 2 mmol/L EDTA. Seguidamente se centrifugaron a 200.000 g durante 18-20 h a 4 °C (Van der Wouden y col., 2002; Mazzone y col., 2006). Luego de la centrifugación, se tomaron fracciones de 1 mL comenzado por la parte superior de los tubos y se analizaron por inmunobloting.

3.10.1. Determinación del colesterol total en microdominios de membrana

Se cuantificó el colesterol total de las microdominios de membrana (*rafts* y no *rafts*) por la técnica colesterol oxidasa utilizando reactivos comerciales que incluyen las enzimas y sustratos necesarios para la cuantificación de todas las formas de colesterol (Wiener Lab). Brevemente, el colesterol es oxidado enzimáticamente por la colesterol oxidasa, previa hidrólisis enzimática de los ésteres mediante una colesterol esterasa. El peróxido de hidrógeno generado en la oxidación permite la unión del fenol con la 4-aminofenazona mediante una reacción catalizada por una peroxidasa. El indicador final es la formación de quinonimina roja la cual se lee en espectrofotómetro a 505 nm y es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

3.11. Inmunobloting

Las fracciones de membrana se solubilizaron en el buffer de muestra con agentes reductores durante 10 min a 60 °C y se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 8 ó 12% (Laemmli, 1970). Se transfirieron eléctricamente a membranas de polivinil difluoruro (PVDF, Perkin Elmer Life Sciences) durante 70 min a voltaje constante de 110-150 mV, utilizando un equipo comercial (Mini-Trans Blot Cell, Bio Rad). Se bloquearon en leche al 10% en PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo comercial contra AQP8 o AQP9 de rata (1 µg/mL; Alpha Diagnostics International), AQP1 humana (1 µg/mL; Alpha Diagnostics International), BSEP (1 µg/mL; Kamiya); caveolina-1 (0.5 µg/mL; Sigma); clatrina (0.5 µg/mL, Sigma), o por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal contra β-actina (0.2 µg/mL, Sigma). Las membranas polivinílicas fueron lavadas con PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1%) y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rabanito (Thermo Scientific) durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas inmobilizadas fueron detectadas por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Pierce ECL-Western

Blotting, Thermo Scientific). Las autorradiografías se obtuvieron al exponer las membranas polivinílicas a una placa radiográfica de alta sensibilidad (Kodak XAR films). Posteriormente, las bandas se cuantificaron por densitometría mediante el Image J Software (Rasband; 1997-2011).

3.12. Estudios inmunohistológicos

3.12.1. Inmunohistoquímica

Se perfundió el hígado con solución fisiológica para eliminar la sangre y luego fue extraído, cortado y fijado por inmersión con paraformaldehído 4%. El tejido fue embebido en parafina (Carreras y col., 2003; Carreras y col., 2007). Las secciones de parafina fueron cortadas a un grosor de 4 μm . Las secciones fueron colocadas en buffer citrato 10 mM pH 6,0 y calentadas en un baño de agua a fin de mejorar el teñido por desenmascaramiento del antígeno. Después de lavados sucesivos con PBS, se eliminó la actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno, se procedió a bloquear con 3% de albúmina en buffer PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1%) durante 1 hora e incubar los cortes de hígado toda la noche a 4 °C con anticuerpos contra AQP1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Alpha Diagnostics International) y luego por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa correspondiente. La peroxidasa fue visualizada por la reacción con 0.06% 3,3- diaminobencidina y 0.01% H_2O_2 durante 5 minutos y contra teñido con hematoxilina. Los controles fueron realizados por omisión del anticuerpo primario. Las imágenes se capturaron con un microscopio E600 equipado con cámara digital DMX 1200 (Nikon).

3.12.2. Inmunofluorescencia confocal

Los cortes de hígado fueron permeabilizados y bloqueados con 0,2% Triton X-100/Albúmina Sérica Bovina 3% durante 1 hora, e incubadas toda la noche a 4 °C con anticuerpos anti-AQP1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti- β -actina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma Aldrich). Después de lavar, los cortes de hígados fijados se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugado con Alexa 488 y Alexa 594 (Molecular Probes), respectivamente. Las muestras se lavaron y se incubaron durante 5 min con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes) (50 μM) y fueron montados con ProLong (Molecular Probes). La fluorescencia se visualizó por microscopía confocal (Nikon C1PlusSiR con microscopio invertido Nikon TE200). Bajo estas condiciones, no se detectó autofluorescencia. Los controles realizados por omisión de anticuerpos

primarios o secundarios no mostraron fluorescencia. Para mejorar la calidad de las imágenes obtenidas se ajustó el brillo y contraste del mismo modo utilizando el programa Adobe Photoshop.

Se estimó la eficiencia de transducción de AdhAQP1 en los hepatocitos de ratas colestásicas a partir de las imágenes de inmunofluorescencia confocal utilizando el programa Image J (Rasband; 1997-2011). Se utilizaron varias imágenes con aproximadamente 400 células cada una. La autofluorescencia obtenida de los hepatocitos transducidos con el Adc se utilizaron para ajustar la fluorescencia para el análisis de las imágenes. Los hepatocitos marcados representaron aproximadamente el 20% del total de las células contadas.

3.13. Medición de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Lowry, utilizando albúmina sérica bovina como estándar (Lowry y col., 1951).

3.14. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media aritmética \pm error estándar. Para la comparación entre dos grupos experimentales se usó el test ``t de Student'' no apareado. Para la comparación entre varios grupos experimentales se efectuó el análisis de la variancia (ANOVA), seguida del test de Tukey. Los valores con $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Estudios iniciales de las condiciones óptimas de administración del vector AdhAQP1

A fin de comenzar con los estudios, en primer instancia se administró a animales normales una dosis inicial de 5×10^9 ufp del adenovector AdhAQP1 en forma retrobiliar y se estudió el tiempo requerido para la expresión proteica (48 - 72 h). Luego se determinó la dosis óptima de administración ($5 \times 10^9 - 1$ y 3×10^{10} ufp/animal en 300 μ L de solución fisiológica estéril) en animales colestásicos.

A las 48 h post-tratamiento, la inmunohistoquímica no arrojó resultados positivos, ya que sólo se observó tinción donde normalmente se expresa la AQP1 en el hígado (células endoteliales venosas y capilares peribiliares) (Marinelli y col., 1999), sin transducción evidente en los hepatocitos. Los estudios de inmunobloting para hAQP1 en fracciones de membranas plasmáticas también fueron negativos (datos no mostrados).

Transcurridas 72 h de la administración retrobiliar del vector, verificamos la expresión de hAQP1 por inmunohistoquímica. En la **Figura 4.1 A**, que corresponde al hígado control, se observa, como era de esperar, tinción en los sitios donde normalmente se expresa la AQP1, es decir a nivel de las células endoteliales de las venas centrales y capilares periportales. Claramente no se observó tinción en los hepatocitos, ya que estos normalmente no expresan AQP1. Las **Figuras 4.1 B** y **C** corresponden a hígados de rata no colestásicas (**Figura 4.1 B**) y EE (**Figura 4.1 C**) tratadas con AdhAQP1; se observó tinción en los endotelios similar a la de los animales tratados con vector control. Además, se observó tinción en hepatocitos, correspondiente a hAQP1.

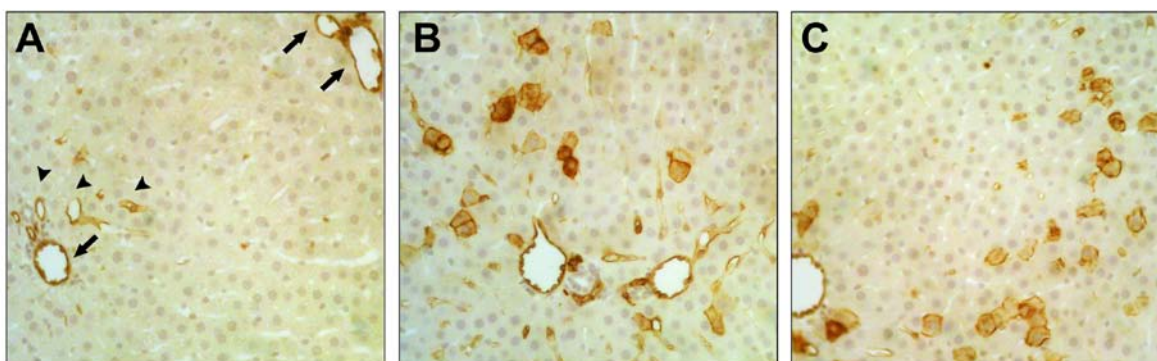


Figura 4.1: Inmunohistoquímica para AQP1 en hígados de ratas sometidas a transferencia génica de hAQP1 por adenovirus. Cortes de hígado de ratas no colestásicas tratadas con vector control (A) o vector AdhAQP1 (B) y colestásicas transducidas con AdhAQP1 (C), a través de la vía retrobiliar. Los hígados fueron extraídos 72 h después de la administración del vector. (A) Como era esperado, los hígados controles mostraron tinción en las células endoteliales venosas (flechas) y capilares peribiliares (cabezas de flechas). Los hepatocitos y endotelio sinusoidal no mostraron tinción. (B) y (C) Los hígados tratados con AdhAQP1 mostraron tinción en los hepatocitos. La tinción para AQP1 fue específica según controles negativos donde se omitió el anticuerpo primario (datos no mostrados).

Dado que la dosis inicial de 5×10^9 ufp del adenovector AdhAQP1 evidenciaba pocos hepatocitos transducidos, se probaron dosis mayores del vector AdhAQP1 (1 y 3×10^{10} ufp/animal en $300 \mu\text{L}$ de solución fisiológica estéril), acorde a lo publicado para vectores adenovirales. En la **Figura 4.2** pueden observarse los resultados de expresión (inmunobloting y densitometría) para AQP1 en membranas plasmáticas totales de ratas colestásicas tratadas con dosis crecientes de AdhAQP1. La expresión hepática de AQP1 aumentó con la dosis de AdhAQP1. Es por ello que decidimos realizar los estudios con la dosis 3×10^{10} ufp/animal.

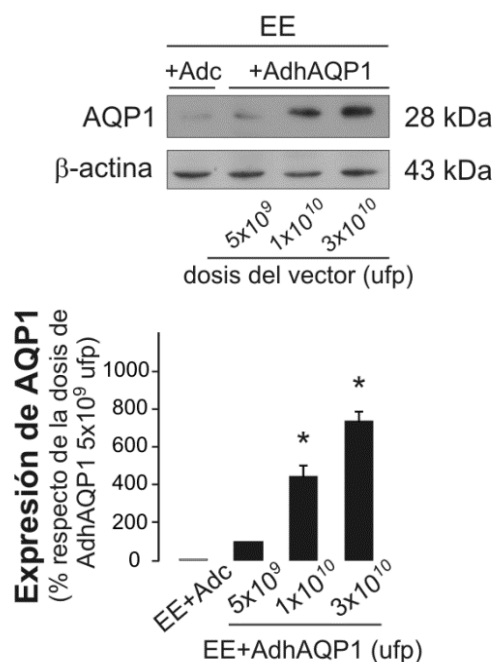


Figura 4.2: Expresión hepática de AQP1 en función de la dosis de AdhAQP1 administrada. Los estudios se realizaron 72 h después de la administración del vector. Los hígados fueron extraídos y se obtuvieron las membranas plasmáticas totales de hepatocitos. La expresión hepática de AQP1 aumentó con la dosis de AdhAQP1. Los datos se muestran como media \pm error estándar; se usaron 3 animales por grupo.

4.2. La transferencia génica de AdhAQP1 a ratas induce la expresión de hAQP1 funcional en membrana canalicular

4.2.1. Expresión de hAQP1 en hepatocitos de ratas normales y colestásicas

Una vez establecidas las condiciones de administración del vector, dosis: 3×10^{10} ufp/animal por vía retrobiliar y 72 h como tiempo requerido para la expresión de hAQP1; se realizaron estudios de inmunohistoquímica, microscopía confocal de inmunofluorescencia e inmunobloting en animales normales y colestásicos.

En la **Figura 4.3** se muestran los resultados de la inmunohistoquímica y microscopía confocal de inmunofluorescencia para AQP1. En concordancia con la expresión de AQP1 endógena reportada (Marinelli y col., 1999), se observa una tinción intensa para AQP1 en el endotelio vascular, y tinción más débil en las células epiteliales ductulares (colangiocitos) de los hígados correspondientes a ratas transducidas con el vector control, y ausencia de tinción en hepatocitos. Similares resultados fueron observados en cortes de hígados de ratas colestásicas tratadas con el vector control (datos no mostrados). La administración del vector AdhAQP1 tanto a ratas normales como colestásicas indujo la expresión de hAQP1 en hepatocitos (**Figura 4.3 A**). No se observó aumento en la tinción de AQP1 en colangiocitos. En los hepatocitos, hAQP1 se localiza principalmente en membrana plasmática, sin acumulación en organelas

intracelulares. Es importante destacar que se observa expresión de hAQP1 en el polo secretorio biliar de los hepatocitos, esto es, a nivel de la membrana plasmática canalicular (Figura 4.3 B).

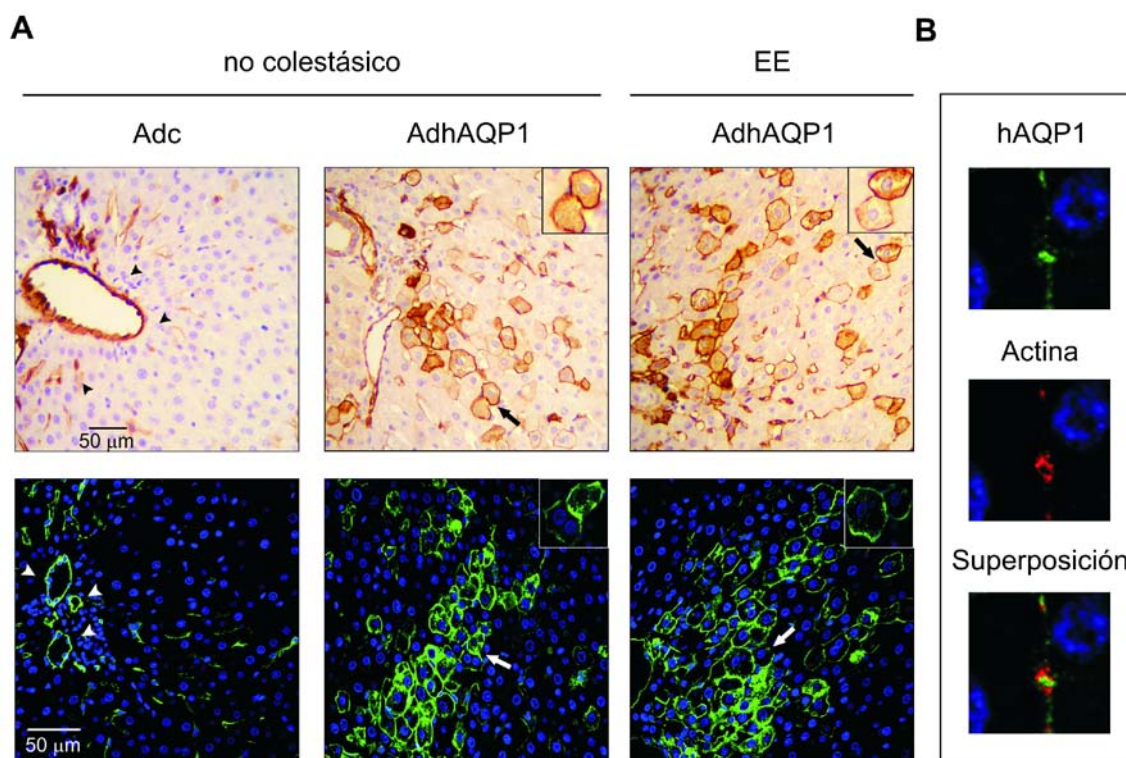


Figura 4.3. Expresión hepática de hAQP1 en ratas normales y colestásicas luego de la transferencia génica con AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración de los vectores se describen en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración del vector (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). **(A) Panel Superior.** Inmunohistoquímica para AQP1 en secciones de hígado incluidas en parafina de ratas normales y colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1. Como era esperado (Marinelli y col., 1999), los controles no colestásicos transducidos con Adc mostraron inmunoreactividad para AQP1 endógena (tinción marrón) solamente en el endotelio vascular peribiliar (tinción intensa) y en colangiocitos (tinción débil) (*cabezas de flecha*). La inmunoreactividad para AQP1 en ratas transducidas con AdhAQP1 se observó principalmente a nivel de membranas plasmáticas canalicular y basolateral de hepatocitos (*flechas*, ver ampliación). No se observó tinción en experimentos donde se omitió el anticuerpo primario AQP1 (datos no mostrados). **Panel Inferior.** Inmunofluorescencia y microscopía confocal para AQP1. Los resultados coinciden con lo observado por inmunohistoquímica. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). **(B)** Localización por inmunofluorescencia y microscopía confocal de hAQP1 en el canalículo (marcado con actina) de ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1.

Para corroborar que la expresión de hAQP1 es principalmente a nivel de la membrana plasmática canalicular de hepatocitos, preparamos membranas plasmáticas a partir de hígados de ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1, las separamos por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en sus dominios canaliculares y basolaterales (ver Materiales y Métodos, sección 3.7.2) y realizamos estudios de inmunobloting, los cuales confirmaron estos resultados (**Figura 4.4**).

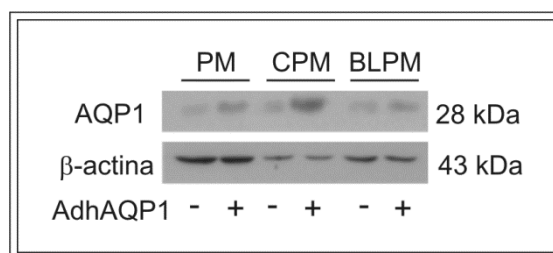


Figura 4.4. Expresión de hAQP1 en dominios de membrana plasmática hepática de ratas colestásicas luego de la transferencia génica con AdhAQP1. Inmunobloting para AQP1 en membranas plasmáticas hepáticas totales (PM), canaliculares (CPM) y basolaterales (BLPM) de animales colestásicos transducidos con AdhAQP1 o vector control. Se sembraron 20 μ g de proteína por calle. Las membranas fueron reprobadas utilizando el anticuerpo anti- β -actina como control de carga. PM, membranas plasmáticas totales.

Para estudiar si el nivel de expresión de hAQP1 en animales colestásicos mostraba diferencias con respecto a los normales, realizamos estudios de inmunobloting en fracciones de membranas plasmáticas altamente purificadas. La expresión de AQP1 en la membrana plasmática de los hepatocitos fue similar tanto en animales normales como colestásicos, lo que sugiere que la colestasis inducida por etinilestradiol no afecta la infección adenoviral ni la expresión de hAQP1 (**Figura 4.5**). Tanto el nivel de expresión de la hAQP1, como su localización subcelular, fueron similares entre los animales normales y colestásicos.

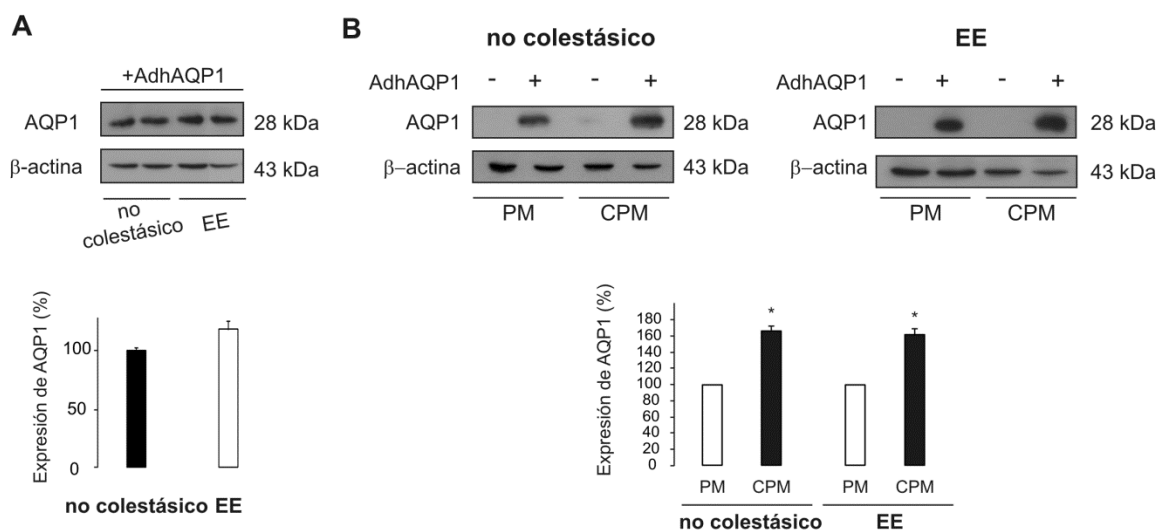


Figura 4.5. Comparación de la expresión hepática de hAQP1 en ratas con colestasis por EE y no colestásicas luego de la transferencia génica con AdhAQP1. (A) Inmunoblotting para AQP1 en membranas plasmáticas hepáticas de animales normales y colestásicos, sometidos a transferencia génica con el vector AdhAQP1. La expresión de hAQP1 fue similar en ambos grupos. Se sembraron 25 μ g de proteína por calle. Las membranas fueron reprobadas utilizando el anticuerpo anti- β -actina como control de carga. Se muestra el análisis densitométrico de cuatro experimentos separados por cada grupo. Los datos (media \pm error estándar) se expresan como porcentaje respecto a los controles. (B) Inmunoblotting para AQP1 de fracciones de membranas plasmáticas hepáticas totales (PM) y canaliculares (CPM) de animales con colestasis por EE y no colestásicos transducidos con AdhAQP1. Se sembraron 20 μ g de proteína por calle. Las membranas fueron reprobadas utilizando el anticuerpo anti- β -actina como control de carga. Se muestra el análisis densitométrico para tres experimentos separados por cada grupo. Los datos (media \pm error estándar) se expresan como porcentaje respecto a las membranas plasmáticas de los no colestásicos y EE, en cada caso.

4.2.2. Permeabilidad osmótica al agua de membranas canaliculares de hepatocitos sometidos a transferencia génica mediante el adenovector AdhAQP1

A fin de evaluar la funcionalidad de la hAQP1 expresada en la membrana canalicular, se determinó la permeabilidad osmótica de membrana canalicular al agua mediante espectrofotometría de flujo detenido (*stopped flow*) (sección 3.8 de Materiales y Métodos). Para ello utilizamos vesículas altamente purificadas correspondientes a los dominios canaliculares de hepatocitos los cuales se obtuvieron a partir del hígado de ratas colestásicas tratadas con el vector AdhAQP1 y sus respectivos controles tratados con el vector Adc. La técnica se fundamenta en la rápida exposición de vesículas de membrana a un gradiente osmótico hipertónico y el registro del cambio de volumen que experimentan en función del tiempo, como se detalló en Materiales y Métodos (Marinelli y col., 2003).

La **Figura 4.6 A** muestra las curvas obtenidas en cada medición en respuesta a un gradiente hiperosmolar de sacarosa (250 mOsm). La curva obtenida a partir de vesículas canaliculares de hígados tratados con el vector AdhAQP1, muestran un rápido aumento en la pendiente inicial y ajustan a una función biexponencial representativa de dos poblaciones de vesículas funcionalmente diferentes. Mientras que los datos correspondientes a los hígados tratados con Adc, ajustaron a una curva monoexponencial representativa de homogeneidad funcional.

Las membranas canaliculares derivadas de ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1 mostraron un incremento promedio de 5 veces en la permeabilidad al agua con respecto a las ratas colestásicas transducidas con el vector control (**Figura 4.6 B**). Estos resultados indican una expresión proteica funcional de hAQP1 a nivel del canalículo biliar de ratas colestásicas.

Así, la administración retrobiliar induce una adecuada expresión hAQP1 en hepatocitos, y además no provoca efectos adversos como se muestra en la **Tabla 4.1**.

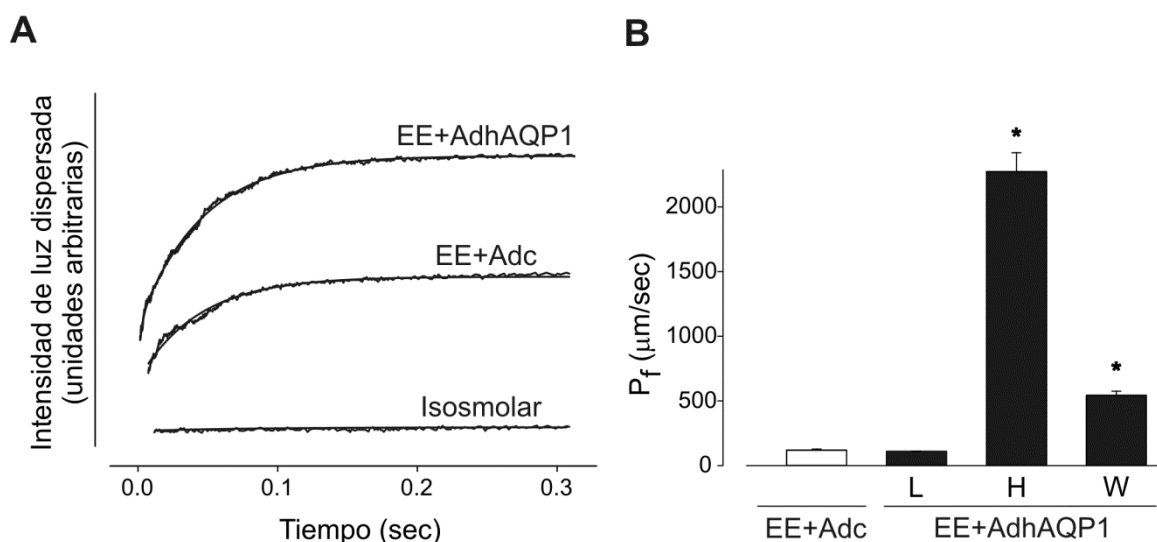


Figura 4.6: Permeabilidad osmótica al agua de membranas hepáticas canaliculares ratas colestásicas sometidos a transferencia génica mediante el adenovector AdhAQP1. Ratas Wistar fueron tratadas durante cinco días con etinilestradiol. Al tercer día se les administró el vector control (EE+Adc) o el vector AdhAQP1 (EE+AdhAQP1). Los hígados fueron extraídos 72 h luego de las transferencias génicas (i.e., al 6to día de iniciado el tratamiento con EE) y a partir de los mismos se obtuvieron vesículas de membrana canalicular. Se determinó la intensidad de luz dispersada para vesículas expuestas a un gradiente hipertónico de sacarosa 250 mosM por espectrometría de flujo detenido (**A**) Curvas típicas de intensidad de luz dispersada (transporte osmótico de agua) en función del tiempo con un ajuste monoexponencial para las vesículas canaliculares de hígados colestásicos tratados con el vector control y ajuste biexponencial para las vesículas canaliculares de hígados transducidos con AdhAQP1. No se observaron cambios en la intensidad de luz dispersada cuando las vesículas fueron expuestas a un buffer isosmótico (isosmolar). (**B**) Permeabilidad osmótica de membrana (P_f), calculada como se describe (Marinelli y col., 2003). L, P_f mínimo, calculado a partir de la constante de velocidad lenta del ajuste biexponencial. H, P_f máximo, calculado a partir de la constante de velocidad rápida del ajuste biexponencial. W, P_f promedio ponderado, calculado a partir de P_f máximo y mínimo, y sus porcentajes de contribución al total, i.e. $W = (L \times 80 + H \times 20)/100$. Los datos de muestran como medias \pm error estándar a partir de tres preparaciones de vesículas independientes. * $P < 0.05$ con respecto a las vesículas canaliculares de hígados colestásicos tratados con el vector control.

TABLA 4.1: Parámetros séricos hepáticos y pesos corporales y de los hígados de ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1

	no colestásico +sln fisiológica	no colestásico +Adc	EE + sln fisiológica	EE+Adc	EE+AdhAQP1
ALP (U/L)	159 ± 29	182 ± 41	457 ± 81 ^{a,b}	465 ± 39 ^{a,b}	334 ± 37
AST (U/L)	144 ± 5	131 ± 21	127 ± 20	102 ± 1	139 ± 11
ALT (U/L)	25 ± 4	14 ± 3	25 ± 2	19 ± 2	22 ± 3
LDH (U/L)	987 ± 171	913 ± 13	811 ± 222	781 ± 132	637 ± 157
Peso corporal (g)	335 ± 9	368 ± 14	347 ± 9	333 ± 7	336 ± 7
Peso del hígado (g)	12.5 ± 0.3	12.9 ± 0.5	15.8 ± 0.4 ^{a,b}	15.6 ± 0.4 ^{a,b}	15.1 ± 0.3 ^{a,b}

Se administró en forma retrobiliar AdhAQP1, Adc o solución (sln) fisiológica a ratas tratados con EE o vehículo, como se detalló en Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron luego de 72 h de la administración adenoviral (es decir, al sexto día de iniciado el tratamiento con EE). Los datos corresponden a la media ± error estándar (N=3-6). ^aP < 0.05 con respecto a controles no colestásicos (no colestásicos+Adc). ^b P < 0.05 con respecto a no colestásicos+sln fisiológica. EE, etinilestradiol; Adc, vector control; ALP, fosfatasa alcalina; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; LDH, lactato deshidrogenasa.

4.3. La expresión hepática de hAQP1 en ratas con colestasis por etinilestradiol aumentó significativamente el flujo biliar basal y el estimulado por sales biliares.

4.3.1. Flujo biliar en ratas transducidas con AdhAQP1

La formación de bilis por los hepatocitos es un proceso secretorio osmótico que resulta de la secreción canalicular de agua en respuesta a gradientes osmóticos creados por transporte activo de solutos, principalmente SB y otros aniones orgánicos. Así, el flujo biliar depende, en última instancia, de la expresión canalicular de transportadores como la bomba exportadora de sales biliares BSEP/ABCB11 y la proteína resistente a multidroga MRP2/ABCC2 y de la permeabilidad al agua de membrana plasmática canalicular determinado principalmente por el nivel de expresión de aquaporinas (Marinelli y col., 2011; Portincasa y Calamita, 2012; Jessner y col., 2008). Se cree que una deficiencia en alguno de estos procesos básicos de la secreción de fluido canalicular es el evento primario en el desarrollo de la colestasis inducida por estrógenos (Marinelli y col., 2011; Arrese y col., 2008; Pauli-Magnus y col., 2010).

Por lo tanto, se estudió si el aumento de la permeabilidad canalicular al agua inducida por la expresión de AQP1 podría afectar el flujo biliar en ratas colestásicas. Como se muestra en la **Figura 4.7 A**, el flujo biliar aumentó un 51% en ratas colestásicas sometidas a transferencia génica con el adenovector AdhAQP1, pero no se modificó significativamente en ratas no colestásicas tratadas con AdhAQP1. Dado que las SB son solutos claves en la formación de bilis por los hepatocitos, se realizaron estudios de flujo biliar en condición de estimulación. Para estimular el flujo biliar hepático (canalicular), se utilizó la sal biliar fisiológica TC, la cual es eficientemente captada por los hepatocitos y secretada en bilis (Hung y col., 2005). El flujo biliar estimulado por TC fue un 70% superior en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1 con respecto a las transducidas con el vector control (**Figura 4.7 B**). El flujo biliar inducido por TC (esto es, el flujo biliar estimulado por TC por encima de los valores basales) se incrementó tres veces entre estos grupos de animales (**Figura 4.7 B**). Si bien la transferencia génica de AdhAQP1 a ratas no colestásicas no modificó el flujo biliar basal, el flujo biliar estimulado por TC evidenció un aumento leve, pero estadísticamente significativo.

Los datos sugieren que el aumento de la permeabilidad canalicular al agua inducida por hAQP1 en ratas con colestasis por EE, induce un aumento significativo tanto del flujo biliar basal como del estimulado por SB.

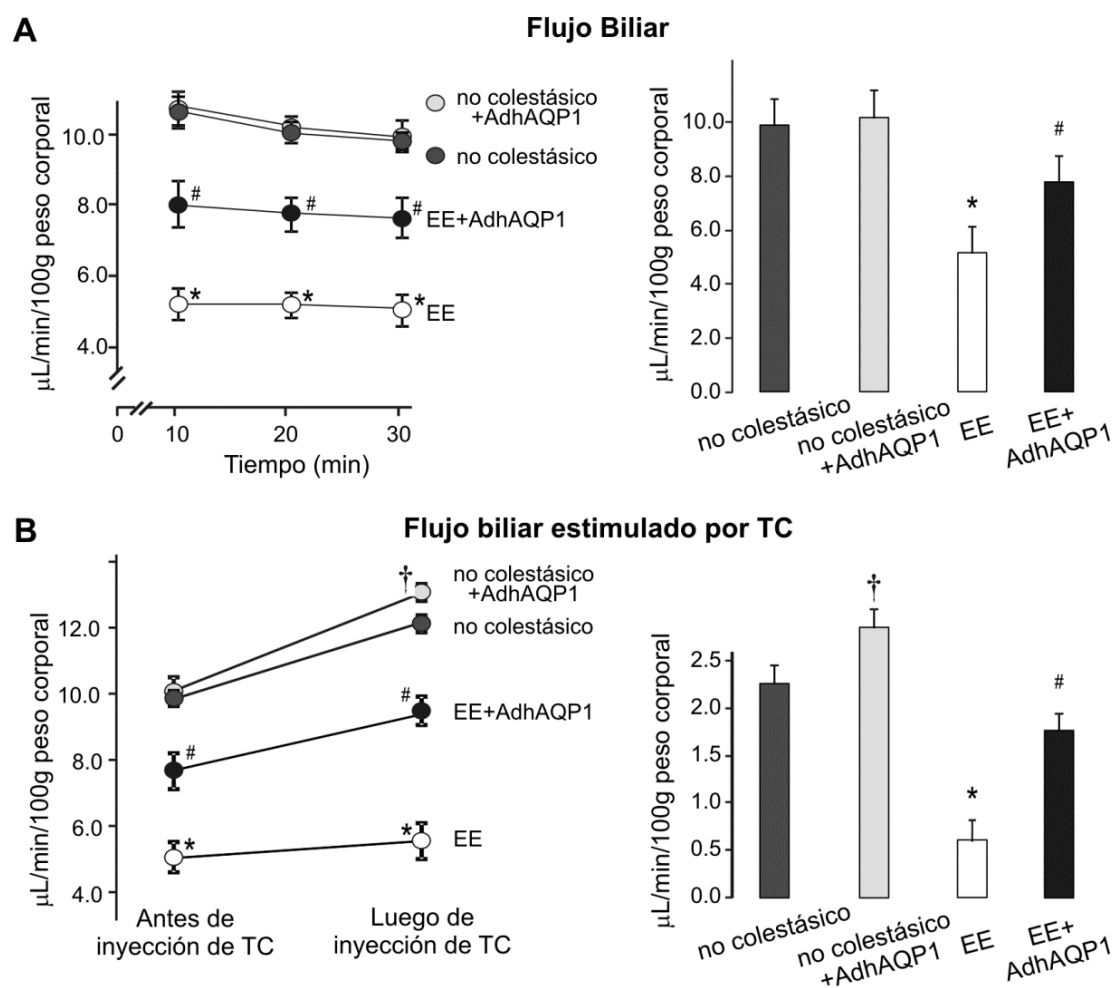


Figura 4.7: Flujo biliar en ratas transducidas con el AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). **(A)** Flujo biliar basal de ratas transducidas con el vector AdhAQP1 o control. Flujo biliar basal en función del tiempo (*panel izquierdo*) y flujo biliar promedio en un período de recolección de bilis de 30 min (*panel derecho*). **(B)** Flujo biliar estimulado por taurocolato (TC) de ratas transducidas con el vector AdhAQP1 o control (*panel izquierdo*). Flujo biliar inducido por TC, i.e., flujo biliar estimulado por TC por encima de los valores basales (*panel derecho*). Los datos corresponden a seis animales por grupo y se expresan como media \pm error estándar. * $P < 0.05$ versus controles no colestásicos y EE+AdhAQP1, # $P < 0.05$ versus controles no colestásicos y EE, † $P < 0.05$ versus no colestásicos, EE y EE+AdhAQP1.

4.4. La expresión de hAQP1 en ratas con colestasis por EE aumenta la eficiencia colerética de las sales biliares.

4.4.1. Eficiencia colerética de las sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1

Dado que la formación de bilis por hepatocitos es un proceso osmótico principalmente conducido por SB, la permeabilidad al agua canalicular aumentada observada en nuestros estudios (**Figura 4.6**) podría llevar a una secreción de agua aumentada en respuesta a la excreción de SB. Por lo tanto, se estudió si la corrección del flujo biliar en ratas colestásicas podría estar asociada a una eficiencia osmótica mejorada de las SB excretadas. La eficiencia colerética de las SB endógenas (esto es, el volumen de bilis por μmol de sal biliar excretada) se estimó a partir de la pendiente de la relación entre flujo biliar y excreción de SB durante la depleción del pool de SB generada por interrupción de la circulación enterohepática (Koopen y col., 1998) (**Figura 4.8 A**, panel izquierdo).

Las ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1 mostraron una eficiencia colerética para las SB endógenas totales un 45% mayor que las ratas colestásicas transducidas con el vector control (**Figura 4.8 A**, panel derecho). Dado que las SB endógenas individuales poseen distintas eficiencias coleréticas, se estudió la composición de SB por HPLC. Estos estudios indican que la composición biliar de las SB individuales no difiere significativamente entre ambos grupos antes mencionados de ratas colestásicas (**Figura 4.8 B**). Por lo tanto, el incremento de la eficiencia colerética parece ser resultado de la permeabilidad al agua canalicular aumentada.

Una estimación independiente de la eficiencia colerética, esto es, aquella calculada para el TC (μl de bilis por μmol de TC excretado) a partir de los valores de flujo biliar de la figura 4.7 y los correspondientes valores de excreción biliar de SB, dieron resultados coincidentes: 5.1 ± 0.4 (no colestásicos); $2.5 \pm 1.0^*$ (EE+Adc) y 5.9 ± 0.9 (EE+AdhAQP1), $*P < 0.05$. Para el grupo no colestásicos+AdhAQP1, la eficiencia colerética fue 6.1 ± 0.3 (un incremento del 20% respecto al grupo no colestásico).

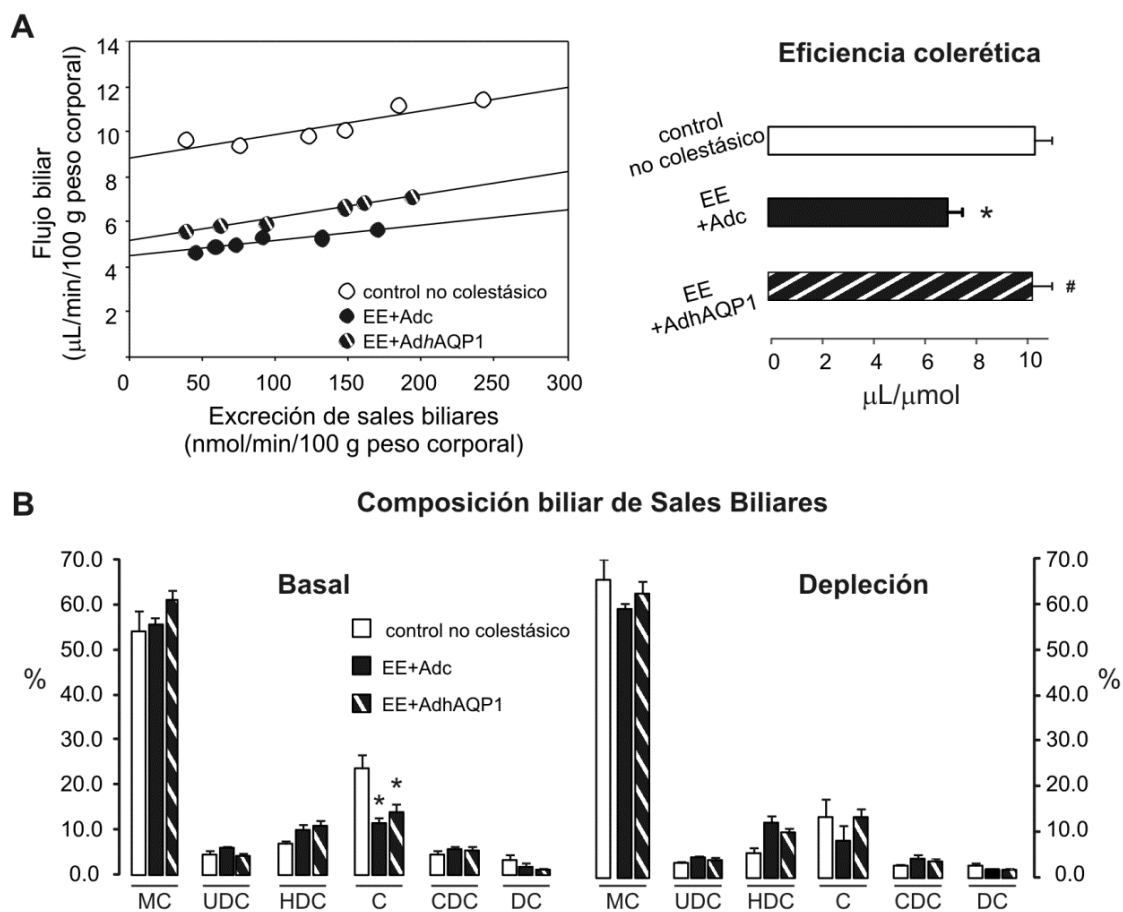


Figura 4.8: Eficiencia colerética de sales biliares endógenas en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1. (A) *Panel izquierdo*, gráficas representativas de flujo biliar y excreción biliar de sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1 (EE+AdhAQP1) o con el vector control (EE+Adc) y ratas controles no colestásicas. Se recolectó bilis durante 6 h en intervalos de 1 h. La interrupción de la circulación enterohepática de sales biliares genera una reducción progresiva de la excreción biliar de sales biliares. Se muestran los puntos individuales en el tiempo de un animal representativo de cada grupo. *Panel derecho*, la eficiencia colerética de las sales biliares excretadas se estimó a partir de las pendientes de las rectas de ajuste entre flujo biliar y excreción de sales biliares. Los valores correspondientes a tres animales por grupo se expresan como media \pm error estándar. * $P < 0.05$ con respecto al control no colestásico y # $P < 0.05$ con respecto a EE. (B) La composición biliar de sales biliares individuales se determinó en muestras de bilis recolectadas durante los períodos entre 0–1 h (excreción basal) y 5–6 h (excreción reducida) luego de la interrupción de la circulación enterohepática de sales biliares. Los datos se expresan como media \pm error estándar, $N=3$ por grupo; MC, muricolato, UDC, ursodesoxicolato; HDC, hiodesoxicolato; C, colato; CDC, quenodesoxicolato; DC, desoxicolato; * $P < 0.05$ versus control no colestásico.

4.5. La transferencia génica de hAQP1 aumenta la excreción biliar de sales biliares en ratas con colestasis por etinilestradiol

4.5.1. Excreción biliar de sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1

En la **Figura 4.9** se muestran el flujo biliar y la concentración y excreción de SB totales en condiciones basales en ratas colestásicas y no colestásicas transducidas con AdhAQP1 o con el vector control. En la colestasis inducida por EE, tanto el flujo biliar (**Figura 4.9 A**) como la excreción biliar de SB (**Figura 4.9 C**) (Crocenzi y col., 2001), se encuentran significativamente disminuidos, mientras que la concentración biliar de SB (**Figura 4.9 B**) no se modifica significativamente. Como se describió previamente, la transferencia génica de AdhAQP1 corrigió significativamente el flujo biliar basal en ratas con colestasis por etinilestradiol, mientras que no afectó significativamente el flujo biliar basal en animales no colestásicos. La transferencia de AdhAQP1 a ratas con colestasis por EE produjo un aumento significativo de un 65% en la excreción biliar de SB, alcanzando de esta forma valores similares a los controles no colestásicos (**Figura 4.9 C**). El análisis de la composición biliar de SB por HPLC muestra que la excreción biliar de la mayoría de SB endógenas aumentó significativamente hasta un 80% en las ratas colestásicas luego de la transducción con AdhAQP1 (**Figura 4.9 D**). La transferencia de AdhAQP1 no afectó la excreción biliar de SB individuales en ratas no colestásicas (**Figura 4.9 D**).

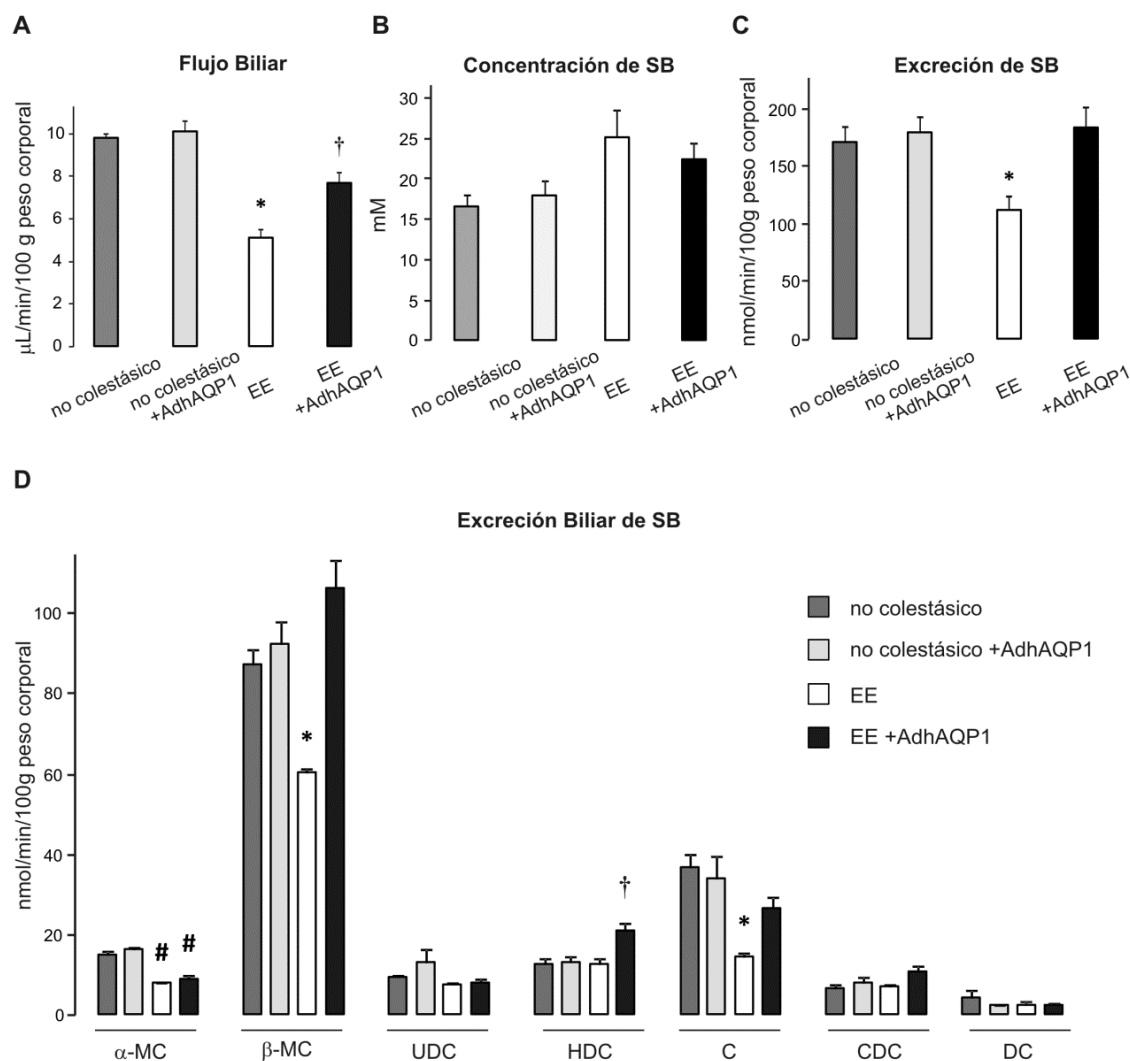


Figura 4.9: Excreción biliar de SB en condiciones basales en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). (A) Flujo biliar, (B) concentración biliar de SB totales, y (C) excreción biliar de SB totales en ratas no colestásicas y EE transducidas con el vector AdhAQP1 o Adc. Los datos se expresan como media \pm error estándar, correspondientes a 6 experimentos independientes por grupo. (D) Excreción biliar individual de las SB endógenas analizadas por HPLC. Los datos se expresan como media \pm error estándar, N=3 por grupo. * $P < 0.05$ con respecto a controles no colestásicos y EE+AdhAQP1, [#] $P < 0.05$ con respecto a controles no colestásicos, [†] $P < 0.05$ versus no colestásicos y EE. α -MC, alfa-muricolato; β -MC, beta-muricolato; UDC, ursodesoxicolato; HDC, hiodesoxicolato; C, colato; CDC, quenodesoxicolato; DC, desoxicolato.

También se estudió la excreción biliar de SB luego de la administración intravenosa de TC. En la **Figura 4.10** se muestran el flujo biliar estimulado por TC y la concentración y excreción de SB totales en ratas colestásicas y no colestásicas transducidas con AdhAQP1 o con el vector control. Como se describió, y de la misma manera que ocurre en condiciones basales, la transferencia génica de AdhAQP1 corrigió significativamente el flujo biliar en ratas con colestasis por etinilestradiol sometidas a una sobrecarga de TC. La transferencia génica de AdhAQP1 aumentó leve pero significativamente el flujo biliar en ratas no colestásicas (**Figura 4.10 A**).

Como está descripto en la colestasis inducida por EE (Accatino y col., 1995), la concentración biliar de SB se encuentra levemente aumentada (**Figura 4.10 B**), mientras que la excreción biliar de SB disminuye significativamente (-45%) (**Figura 4.10 C**). Al igual que lo observado en condiciones basales, la transferencia de AdhAQP1 provocó un aumento significativo de aproximadamente 60% en la excreción biliar de SB en ratas colestásicas, pero no en los controles no colestásicos (**Figura 4.10 B**).

A fin de estudiar la excreción biliar de TC en ausencia de modificaciones del flujo biliar, se inyectó TC radiactivo (trazas) por vía intravenosa. En la **Figura 4.10 D, panel izquierdo** se muestran curvas de excreción de [³H]TC representativas de un animal de cada grupo. Puede observarse en ambos grupos no colestásicos una rápida excreción de [³H]TC (pico agudo a los 5 minutos), mientras que en el grupo EE es más lento; aunque también se observa el pico a los 5 minutos, la cinética de decaimiento es más lenta. En el caso del grupo EE+AdhAQP1, observamos una curva intermedia. El flujo biliar se mantuvo constante en cada animal a lo largo de todo el experimento (datos no mostrados). En la **Figura 4.10 D, panel derecho** se muestra la cantidad total de radiactividad excretada a los 30 minutos de administrado el [³H]TC.

Como se mostró previamente (Hung y col., 2005), la excreción biliar de [³H]TC en función del tiempo (**Figura 4.10 D, panel izquierdo**) y acumulado (**Figura 4.10 D, panel derecho**) se encuentran significativamente disminuidos en colestasis inducida por etinilestradiol. La transferencia de AdhAQP1 produjo un significativo aumento del 74% en la excreción biliar acumulada de [³H]TC únicamente en las ratas colestásicas (**Figura 4.10 D, panel derecho**).

Así, estos datos indican que la expresión hepática de hAQP1 via administración de AdhAQP1 a ratas colestásicas, aumenta la excreción biliar de SB.

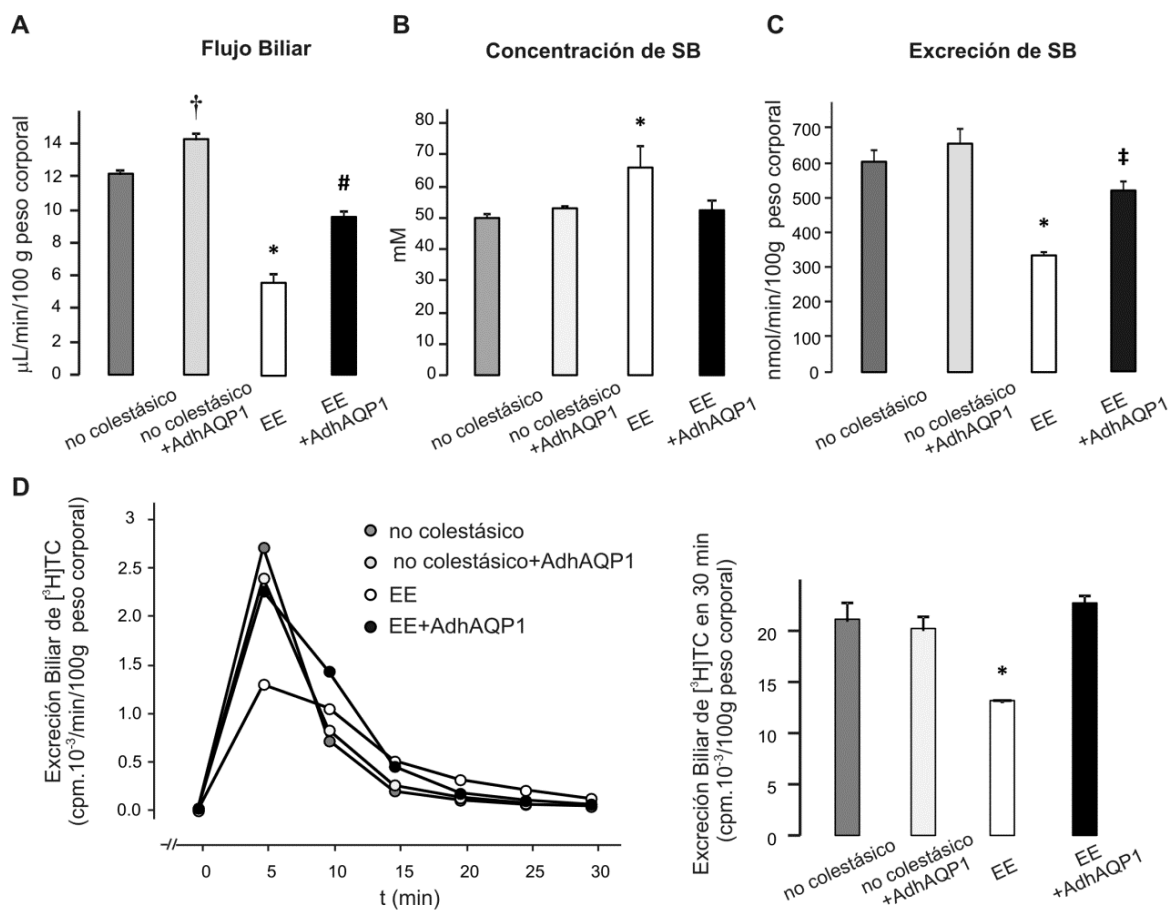


Figura 4.10: Administración de TC a ratas EE transducidas con AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). **(A)** Flujo biliar, **(B)** concentración biliar de SB totales, y **(C)** excreción biliar de SB totales en ratas no colestásicas y EE transducidas con el vector AdhAQP1 o Adc, luego de una inyección única de TC (8 µmol/100g peso corporal). La bilis fue recolectada en un período de 10 minutos. Los datos se expresan como media ± error estándar, correspondientes a 6 experimentos independientes por grupo. **(D)** Curvas representativas de excreción biliar de [3H]TC y excreción biliar de [3H]TC acumulada en 30 minutos, luego de una inyección única intravenosa de 0,1µCi de [3H]TC. Los datos se expresan como media ± error estándar, correspondientes a 4 experimentos independientes por grupo. * P < 0.05 con respecto a controles no colestásicos y EE+AdhAQP1, [#] P < 0.05 con respecto a controles no colestásicos y EE, [†] P < 0.05 versus no colestásico, EE y EE+AdhAQP1, [‡] P < 0.05 versus no colestásico+AdhAQP1 y EE.

4.5.2. Niveles séricos de sales biliares en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1

Luego se decidió explorar si esta excreción biliar de SB aumentada en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1 tenía algún impacto en los elevados niveles de SB séricas encontrados en colestasis.

Como se describió anteriormente (Rosario y col., 1988), la determinación bioquímica de SB séricas mostró niveles marcadamente incrementados en ratas colestásicas (**Figura 4.11**). La transferencia de AdhAQP1 produjo una corrección en los niveles de SB séricas en ratas colestásicas, sin observarse efectos evidentes en ratas no colestásicas (**Figura 4.11**).

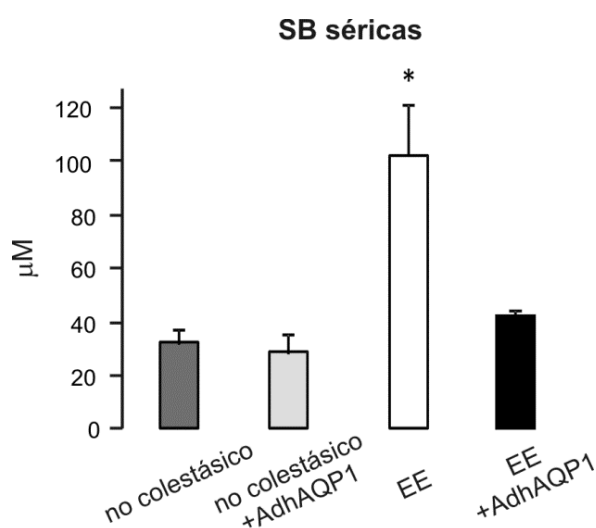


Figura 4.11: Concentración de sales biliares séricas en ratas EE transducidas con AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). Los niveles de sales biliares se encuentran aumentados en el grupo EE, consistente con lo reportado (Rosario y col., 1988). La administración de AdhAQP1 a animales colestásicos mostró una corrección de estos valores. No se observaron diferencias en la concentración de sales biliares séricas en ambos grupos no colestásicos. Los datos se expresan como media \pm error estándar, correspondientes a 5 experimentos independientes por grupo. * $P < 0.05$ con respecto a controles no colestásicos y EE+AdhAQP1.

4.5.3. Expresión y actividad de BSEP/ABCB11 en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1

BSEP/ABCB11 es el transportador de sales biliares de la membrana plasmática canalicular de hepatocitos. Para determinar si BSEP está involucrado en el aumento de la excreción biliar de SB en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1, se determinó su expresión proteica canalicular y su actividad transportadora. Como se observó anteriormente (Lee y col., 2000), la expresión proteica canalicular de BSEP se encuentra disminuida alrededor de un 40% en colestasis inducida por EE (Figura 4.12). La transferencia de AdhAQP1 no modificó la expresión proteica de BSEP (Figura 4.12).

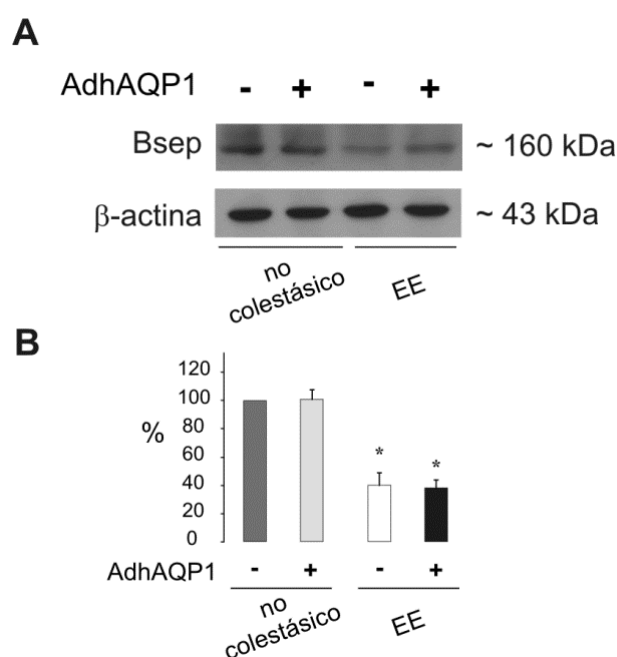


Figura 4.12. Expresión canalicular de BSEP en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). Se obtuvieron fracciones de membrana plasmática canalicular hepática y se realizó el inmunobloting, como se describió en Materiales y Métodos. (A) Inmunobloting representativo para BSEP en fracciones de membrana plasmática canalicular de hígados normales y colestásicos (EE) tratados con el vector control o AdhAQP1. Se sembraron 20 µg de proteína por calle. Las membranas fueron reprobadas utilizando el anticuerpo anti-β-actina como control de carga. Los niveles de expresión de BSEP fueron semejantes en ambos grupos colestásicos. (B) Análisis densitométrico para cuatro experimentos separados por cada grupo. Los datos (media ± error estándar) se expresan como porcentaje respecto a los controles no colestásicos. * P < 0.05 con respecto a controles no colestásicos.

Dado que no encontramos diferencias en la expresión de BSEP en el grupo colestásico tras la administración del vector AdhAQP1, decidimos estudiar, en segundo lugar, la actividad del transportador en este grupo de animales. Para ello se prepararon vesículas de membrana canalicular y se procedió como se detalla en Materiales y Métodos y se esquematiza en la **Figura 4.13 A**.

Según la bibliografía (Stieger y col., 1992; Bossard y col., 1993), la cinética de captación de TC muestra una región donde la velocidad de captación es directamente proporcional al tiempo de incubación con ^3H -TC, y luego se alcanza un *plateau*. A fin de determinar el tiempo óptimo de incubación y para asegurarnos trabajar en la zona lineal, realizamos experimentos de captación a distintos tiempos (t 0; 0,5; 1 y 1,5 min). En la **Figura 4.13 B** se muestran curvas representativas en función del tiempo para los grupos no colestásicos, EE y EEAdhAQP1. La captación de TC es lineal hasta t = 1 min para los cuatro grupos, por lo que se decidió fijar a este valor el tiempo de incubación. En la **Figura 4.13 C** se muestra captación de TC al minuto de incubación. Como se reportó anteriormente (Bossard y col., 1993), la actividad transportadora canalicular de BSEP se encuentra disminuida en colestasis por EE alrededor de un 50 % (**Figura 4.13 C**). Sin embargo, la transferencia de AdhAQP1 a ratas colestásicas indujo significativamente la actividad transportadora de BSEP alrededor de un 90% (**Figura 4.13 C**). Llamativamente, la administración de AdhAQP1 a ratas controles no colestásicos no produjo cambios significativos en la actividad BSEP (**Figura 4.13 B y C**).

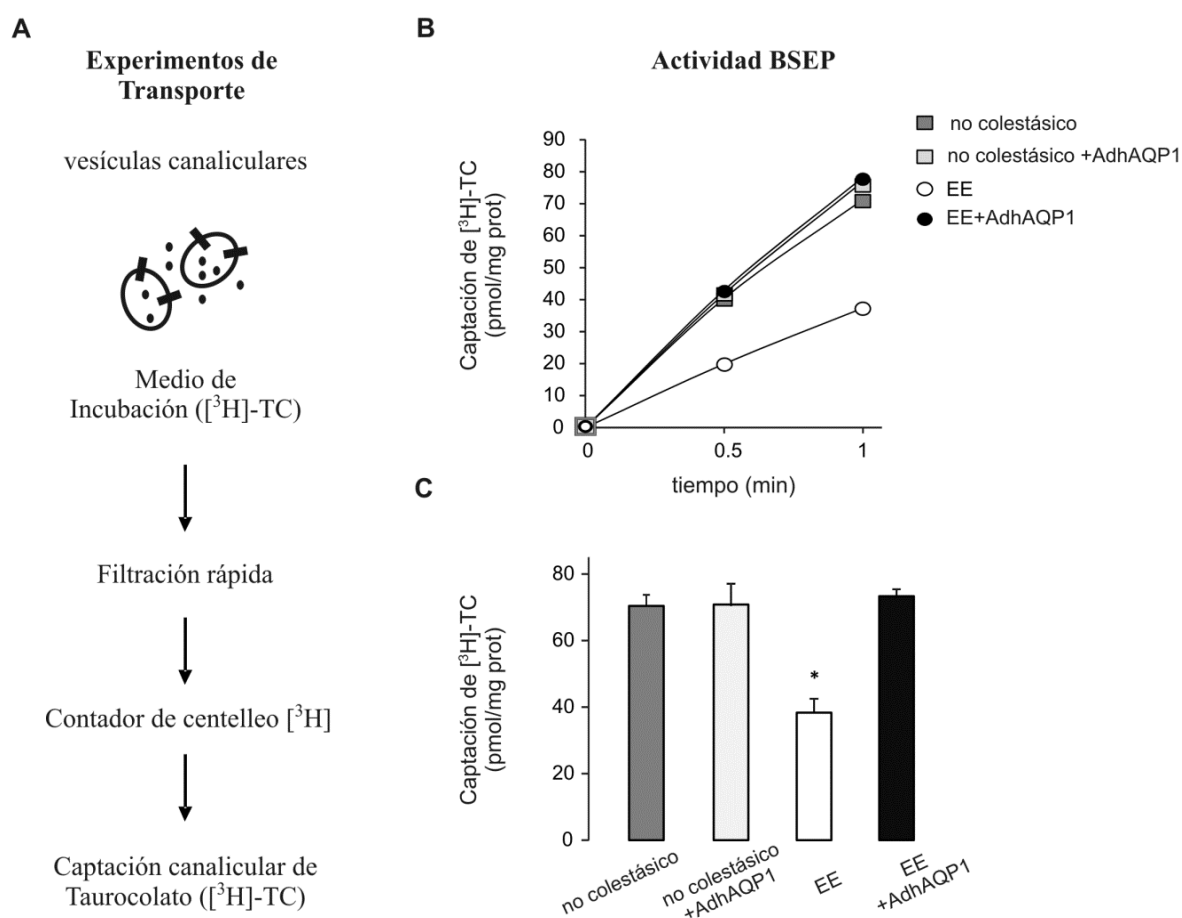


Figura 4.13. Actividad del transportador BSEP en membranas plasmáticas canaliculares hepáticas de animales colestásicos tratados con AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). (A) La actividad BSEP se estimó mediante el transporte de $[^3\text{H}]\text{TC}$ dependiente de ATP en vesículas de membrana plasmática canalicular, como se detalla en Materiales y Métodos y se esquematiza en el diagrama (B) Curvas representativas de captación de $[^3\text{H}]\text{TC}$ en función del tiempo. (C) Captación de $[^3\text{H}]\text{TC}$ en vesículas de membrana plasmática canalicular, luego de 1 minuto de incubación con $[^3\text{H}]\text{TC}$. Los datos se expresan como media \pm error estándar, correspondientes a 3 experimentos independientes por grupo. * P < 0.05 con respecto a controles no colestásicos y EE+AdhAQP1.

4.5.4. Localización de BSEP en microdominios de membrana canalicular en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1

La proteína canalicular BSEP se encuentra principalmente en microdominios ricos en colesterol (Bae y col., 2004, Ismail y col., 2009) y el contenido de colesterol canalicular es un factor determinante crítico de la actividad transportadora de BSEP (Paulusma y col., 2009). Existe una correlación directa entre el contenido de colesterol de membrana y la actividad BSEP. De esta forma, para empezar a entender los mecanismos involucrados en la inducción de la actividad BSEP, se determinó la expresión de BSEP en microdominios de membrana canalicular ricos en colesterol.

Se aislaron microdominios canaliculares *rafts* (alto contenido de colesterol) y *no rafts* (bajo contenido de colesterol) en función de su solubilidad en detergente y enriquecimiento de la proteína marcadora de *rafts* caveolina-1 y de la proteína marcadora de *no rafts* clatrina, como se describe en Materiales y Métodos y se muestra en la **Figura 4.14**.

En ratas no colestásicas tratadas con el vector AdhAQP1 o control, el BSEP canalicular se encuentra más concentrado en los microdominios ricos en colesterol (70%) que en los microdominios no ricos en colesterol (30%). Sin embargo, en las ratas colestásicas tratadas con el vector control, existe una diferencia llamativa, habiendo un 30% de BSEP en los microdominios de membrana canalicular ricos en colesterol y un 70% en los microdominios no ricos en colesterol (**Figura 4.14 A, B**). Los mismos resultados se observaron en ratas colestásicas con administración de solución fisiológica, en lugar del vector control (datos no mostrados). Notablemente, en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1, BSEP mostró una distribución en microdominios canaliculares semejantes al control, es decir, BSEP se redistribuyó mayormente en microdominios ricos en colesterol (aproximadamente un 60 % de BSEP se localizó en los microdominios de membrana canalicular ricos en colesterol y un 40% en los microdominios no ricos en colesterol) (**Figura 4.14 A, B**).

AQP8, otra proteína canalicular, mostró una distribución similar a BSEP en ratas no colestásicas (tanto en las tratadas con el vector control como las tratadas con AdhAQP1), es decir, 90% en los microdominios ricos en colesterol y 10% en los microdominios no ricos en colesterol. La expresión proteica de AQP8, al igual que la de BSEP, se encuentra disminuida en colestasis por EE (Carreras y col., 2007). Sin

embargo, en claro contraste con el transportador de sales biliares, su distribución en microdominios canaliculares *rafts* y *no rafts* no se alteró en las ratas colestásicas con o sin administración de AdhAQP1 (**Figura 4.14 A, B**).

La expresión de hAQP1 en membrana canalicular se restringió exclusivamente a microdominios ricos en colesterol (**Figura 4.14 A**).

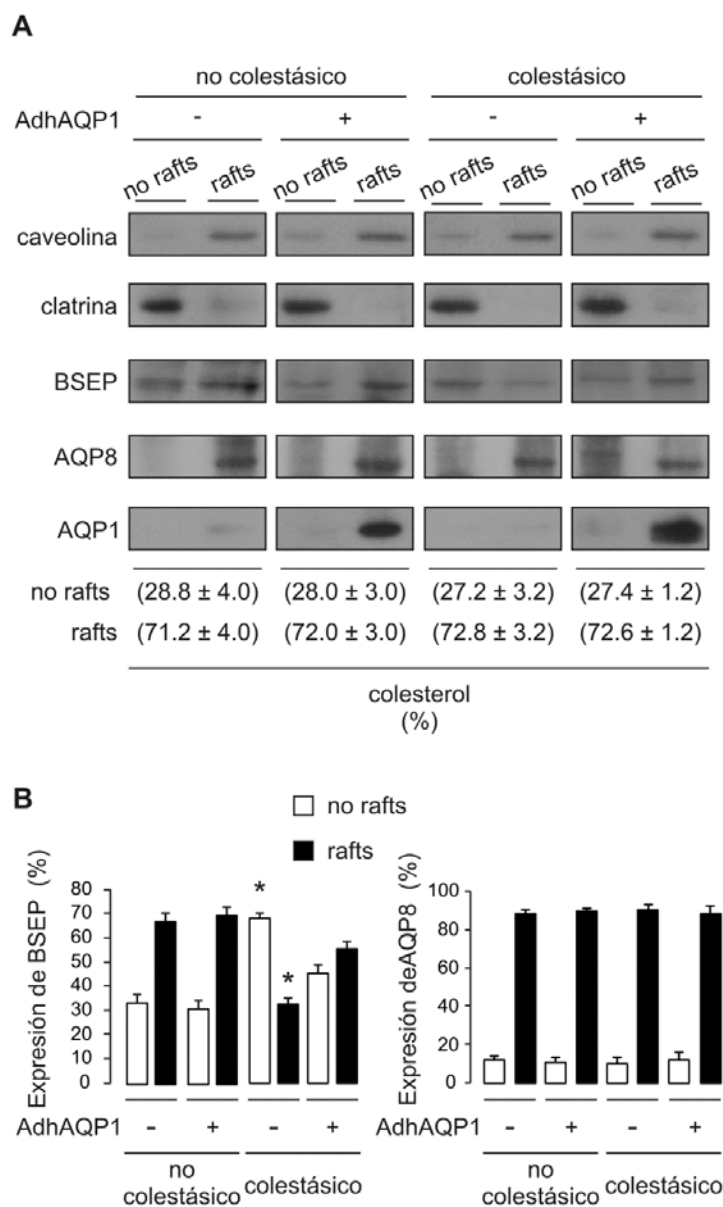


Figura 4.14. Localización de BSEP en microdominios lipídicos canaliculares *rafts/no rafts* en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1. La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). Se aislaron microdominios canaliculares *rafts* (alto contenido de colesterol) y *no rafts* (bajo contenido de colesterol) en función de su solubilidad en detergente, como se detalla en Materiales y Métodos. **(A)** Inmunoblottings representativos para caveolina-1 (proteína marcadora de *rafts*), clatrina (proteína marcadora de *no rafts*), BSEP, AQP8 y AQP1 (20 µg de proteína por calle). También se muestra la distribución de colesterol, expresada como porcentaje del contenido de colesterol total (mg de colesterol/mg de proteína). **(B)** Expresión porcentual de BSEP y AQP8 en microdominios canaliculares *rafts* y *no rafts*. Los datos se expresan como media ± error estándar, correspondientes a 4 experimentos independientes por grupo * P < 0.05 con respecto a controles no colestásicos y EE+AdhAQP1.

También se aislaron microdominios canaliculares *rafts* (alto contenido de colesterol) y *no rafts* (bajo contenido de colesterol) mediante un procedimiento técnico alternativo, esto es, por gradiente de flotación en sacarosa. Las proteínas antes mencionadas se estudiaron por inmunobloting. Los resultados obtenidos confirmaron que la proteína canalicular BSEP (pero no AQP8) redistribuye de microdominios *rafts* hacia microdominios *no rafts* en ratas con colestasis por EE, mientras que en las ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1, BSEP mostró una distribución en microdominios canaliculares semejantes a controles no colestásicos (**Figura 4.15**). También confirmamos que la expresión de hAQP1 en membrana canalicular se restringe exclusivamente a microdominios ricos en colesterol.

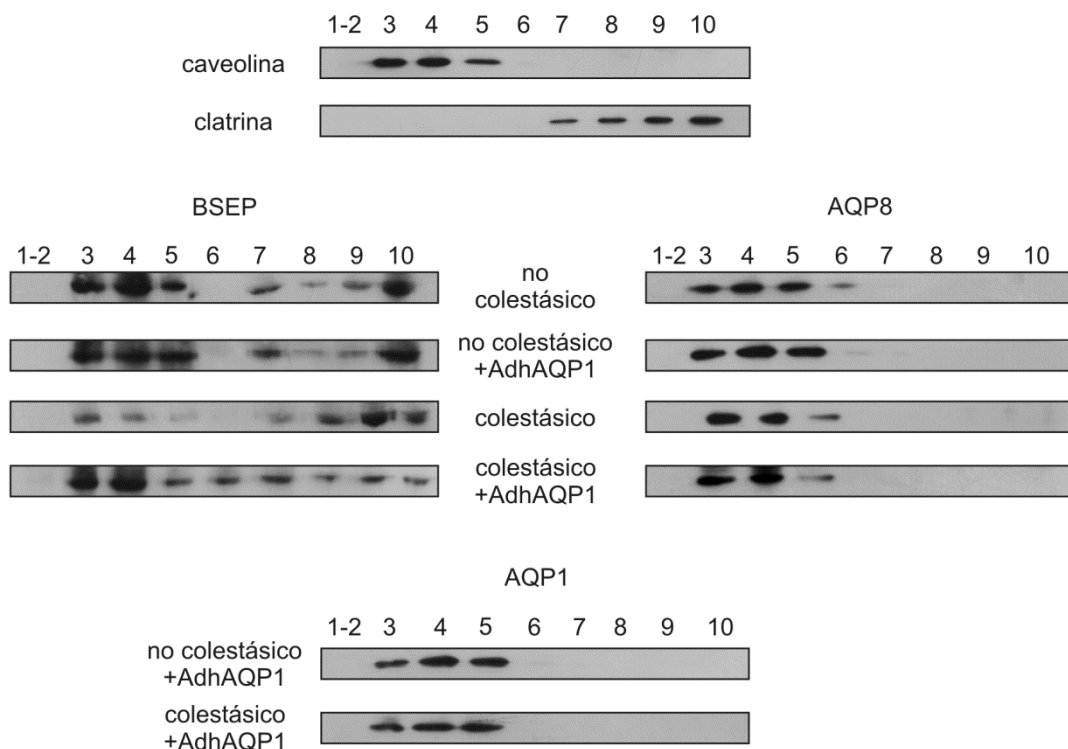


Figura 4.15. Localización de BSEP en microdominios lipídicos canaliculares *rafts/no rafts* en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1, aislados por gradiente de flotación en sacarosa.

La inducción de colestasis por EE y la administración del vector se detallan en Materiales y Métodos. Los experimentos se llevaron a cabo 72 h luego de la administración de AdhAQP1 (i.e., al 6to día luego de iniciado el tratamiento con EE). Los microdominios canaliculares *rafts* (insolubles en detergente) se localizan en la interfase de sacarosa 5%/30%, correspondiente a las fracciones 3-5, consistente con la proteína marcadora caveolina-1. Estas fracciones contienen alrededor del 70% del colesterol total. Las distribuciones a lo largo del gradiente de la proteína marcadora de *rafts*, caveolina-1, y de *no rafts*, clatrina, fueron idénticas para los 4 grupos experimentales. Para mayor claridad, sólo se muestran inmunoblottings representativos para caveolina-1 y clatrina de ratas no colestásico.

5. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo de Tesis sugieren que la hAQP1 expresada en la membrana canalicular, vía administración retrobiliar del adenovector AdhAQP1, mejora significativamente la función secretora biliar en la colestasis inducida por estrógenos. Esto sucede por el aumento de la permeabilidad osmótica al agua de la membrana canalicular y por el aumento de la excreción biliar de SB debido a la inducción de la actividad del transportador BSEP.

La administración de AdhAQP1 incrementa el contenido de agua biliar en colestasis. El agua representa más del 95 % de los componentes biliares y es necesaria para mantener distendidos los ductos y ductulos biliares y prevenir la precipitación de constituyentes biliares evitando el éstasis biliar y eventualmente una obstrucción (Hofmann, 2011). Además, la fase acuosa biliar actúa como vehículo para el transporte desde los canalículos hasta el intestino de las SB y de moléculas destinadas a eliminación tales como bilirrubina, colesterol, metales pesados, hormonas esteroideas, etc. (Hofmann, 2011). La función del agua biliar es en definitiva de auto-protección y por lo tanto un normal transporte canalicular de agua reduce el riesgo de disfunción secretora biliar. Nuestros datos sugieren que el incremento de la permeabilidad osmótica al agua de la membrana canalicular inducida por la expresión de hAQP1 permite un acoplamiento más eficiente del transporte de las SB y el agua osmóticamente comprometida en el proceso de secreción biliar en colestasis. Como resultado, hay una cantidad aumentada del agua biliar inducida osmóticamente por las SB excretadas. La expresión canalicular de hAQP1 incrementó significativamente la eficiencia colerética de las SB endógenas (volumen de bilis por μmol de SB excretada) sugiriendo que el flujo biliar fue mejorado en cierta medida por un transporte de agua mediado por hAQP1.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la administración del vector AdhAQP1 indujo la expresión de hAQP1 en aproximadamente 20% de los hepatocitos, el cual fue estimado en base a las inmunotinciones (**Figura 4.3**) y por el porcentaje de vesículas canaliculares con elevada permeabilidad al agua (**Figura 4.6**). Este porcentaje de transducción está acorde con estudios reportados anteriormente, en los cuales utilizan la vía retrobiliar de administración (Terao y col., 1998; Kuriyama y col., 2005). Es importante destacar que los hepatocitos periportales (hepatocitos cercanos al espacio

porta) son predominantemente transducidos después de una administración retrógrada intrabiliar (Kuriyama y col., 2005) y que estos hepatocitos son los responsables primarios de la formación de la bilis (Monte y col., 1993).

Así, la administración retrobiliar induce una adecuada expresión hAQP1 en hepatocitos, y además no provoca efectos adversos como se muestra en la **Tabla 4.1** y ha sido reportado anteriormente (Kuriyama y col., 2005). En concordancia, la transferencia génica del vector AdhAQP1 vía administración ductal retrógrada a glándulas salivales no mostró hepatotoxicidad significativa (Zheng y col., 2006). La administración retrobiliar permite el transporte de adenovirus a hepatocitos con un mínimo escape del hígado debido a las restricciones anatómicas del tracto biliar. Además, el exceso de adenovirus que no es captado en el hígado es transportado al duodeno y excretado en las heces. De esta forma, la expresión hepática repetitiva de un transgen podría llevarse a cabo mediante la administración retrobiliar sin necesidad de inmunosupresión (Tominaga y col., 2004).

Un hallazgo no anticipado en nuestros estudios fue el hecho que las ratas colestásicas transducidas con hAQP1 mostraran un marcado incremento de la excreción biliar de SB (**Fig. 4.9 C**). Este efecto estuvo ausente en animales no colestásicos, indicando especificidad para los animales con colestasis por EE. Así, los resultados en conjunto sugieren que la transferencia génica adenoviral de hAQP1 a ratas con colestasis por EE mejora sustancialmente la disfunción secretoria incrementando tanto la eficiencia colerética como la excreción biliar de las SB.

La disminuida excreción biliar de las SB en la colestasis inducida por EE, causa retención hepática de las SB y, en consecuencia, niveles séricos incrementados de las mismas (Hung y col., 2005). Después de la administración de AdhAQP1 y en concordancia con el incremento en la eliminación biliar de las SB, la concentración sérica de SB se normalizó (**Fig. 4.11**).

La incrementada excreción biliar de las SB en ratas tratadas con AdhAQP1, no fue causada por un aumento en la expresión proteica canalicular de BSEP/ABCB11 (**Fig. 4.13**). Al igual que BSEP, la expresión del co-transportador de sodio/taurocolato de membrana basolateral de hepatocitos (NTCP; Slc10a1) se encontró disminuida en colestasis por EE (Geier y col., 2003) e inalterada por el tratamiento con AdhAQP1 (datos no mostrados). Seguidamente, consideramos estudiar una posible inducción en la

actividad transportadora de BSEP/ABCB11, la cual fue confirmada por experimentos de transporte de [³H]-taurocolato tanto *in vivo* como *in vitro* (**Fig. 4.11 D y 4.13**).

Debido a que BSEP en membrana canalicular se localiza mayormente, pero no exclusivamente, en dominios lipídicos enriquecidos en colesterol, llamados *rafts* (Bae y col., 2004; Ismail y col. 2009) y que la actividad BSEP depende en forma directa del contenido de colesterol canalicular (Paulusma y col., 2009; Kis y col., 2009; Guyot y col., 2014), se estudió la distribución *raft/no-raft* de BSEP canalicular. El análisis cinético del efecto del colesterol de membrana sobre la actividad BSEP indica que el colesterol altera la velocidad máxima sin afectar la constante de Michaelis Menten (Paulusma y col., 2009; Kis y col., 2009; Guyot y col., 2014). Los mecanismos por los cuales el colesterol modula la actividad BSEP no han sido dilucidados, es posible que el colesterol actúe como modulador alostérico de BSEP o simplemente actúe mediante modificaciones de la fluidez de membrana (Kis y col., 2009).

Los *rafts* son aislados usando protocolos establecidos basados en su insolubilidad en detergentes no iónicos. Nosotros elegimos un protocolo que permite la evaluación cuantitativa de la distribución de proteínas entre microdominios *raft* (ricos en colesterol) y *no raft* (pobres en colesterol) (van der Wouden y col., 2002; Nyasae y col., 2003), y también corroboramos los resultados obtenidos aislando microdominios *rafts* por el método de gradiente de flotación en sacarosa (Mazzone y col., 2006). Obtuvimos microdominios *raft* resistentes a Triton X-100, ricos en colesterol, positivos para la presencia de la proteína caveolina-1 (marcador de *rafts*) y negativos para la proteína clatrina (marcador de *no-rafts*) y microdominios *no-rafts* solubles en Triton X-100, pobres en colesterol y positivos para la proteína clatrina (**Fig. 4.14 y Fig. 4.15**), como ha sido publicado (Mazzone y col., 2006).

Además, en acuerdo con lo publicado (Mazzone y col., 2006), identificamos la presencia de la aquaporina endógena AQP8 en estos microdominios *rafts* canaliculares. Por otro lado, confirmamos que en membrana canalicular, BSEP se expresa en dominios resistentes al Triton (**Fig. 4.14**), como había sido inicialmente identificado por análisis de las proteínas de hígado de rata por espectrometría de masas en tándem (Bae y col., 2004).

También ha sido informada la presencia de BSEP en microdominios canaliculares ricos en colesterol resistentes al detergente no iónico Lubrol (Ismail y col., 2009) o la

acción detergente de las SB (Guyot y col., 2011). Así, diferentes estudios coinciden en que BSEP normalmente reside principalmente en dominios canaliculares detergente-resistentes. Inesperadamente, en las ratas colestásicas, encontramos que BSEP, pero no AQP8, redistribuyó desde *rafts* a *no rafts* (**Fig. 4.14 y 4.15**). En la colestasis por EE, la actividad canalicular de BSEP está marcadamente reducida, observándose cambios en la velocidad máxima, pero no en la constante de Michaelis Menten (Lee y col., 2000). Esto puede ser atribuido a la reducida expresión proteica de BSEP; no obstante, el corrimiento de BSEP a dominios con menor contenido de colesterol se espera contribuya a disminuir su actividad, lo cual estaría asociado a una menor velocidad máxima, sin cambios en los valores de la constante de Michaelis Menten (Paulusma y col., 2009; Kis y col., 2009; Guyot y col., 2014). Es interesante mencionar que en colestasis por EE, la velocidad máxima para BSEP canalicular mostró una reducción del 63% (Lee y col., 2000, Bossard y col., 1993) mientras que la disminución de la proteína correspondió solo a un 47% (Lee y col., 2000).

Ha sido demostrado que BSEP es constitutivamente endocitado por un proceso mediado por clatrina (Lam y col., 2012). En colestasis experimental, incluyendo la causada por estradiol 17 β -D-glucurónido, la expresión de BSEP canalicular es reducida por una exacerbada endocitosis (Crocenzi y col., 2003; Crocenzi y col., 2008). Esto permite especular que en colestasis, BSEP sería inicialmente concentrado en microdominios *no rafts* ricos en clatrina, como describimos en nuestros experimentos, antes de ser endocitado en vesículas de clatrina. Esta hipótesis se apoya en el hecho que AQP8, que contrariamente a BSEP, es retenida en *rafts* canaliculares en colestasis (**Figura 4.14 y 4.15**) y no sufre internalización en la colestasis por estradiol 17 β -D-glucurónido (Mottino y col., 2006).

En las ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1, la distribución de BSEP en microdominios canaliculares fue similar a la de los controles no colestásicos, es decir, mayoritariamente presente en microdominios *rafts* (ricos en colesterol). El aumento de la proporción de BSEP en *rafts* en ratas colestásicas tratadas con AdhAQP1 explicaría, al menos en parte, el aumento de actividad debido al mayor contenido de colesterol. Sin embargo, el mecanismo por el cual la presencia de hAQP1 distribuye BSEP hacia dominios *rafts* es por el momento desconocido. El hecho que hAQP1 se localice exclusivamente en *rafts* (**Figura 4.14 y 4.15**), sugeriría una posible interacción molecular entre hAQP1 y BSEP que distribuya al transportador de SB preferentemente

en *rafts*. Por otro lado, la localización exclusiva de hAQP1 en *rafts* podría sugerir una interacción con caveolina-1. De hecho, AQP1 contiene un sitio putativo de unión a caveolina-1 y diversos estudios han descrito una asociación AQP1-caveolina-1 en células no hepáticas (Jablonski y col., 2006). Es interesante mencionar que ratones transducidos con un adenovector para caveolina-1 mostraron incremento de la actividad BSEP, sin cambio de su expresión proteica (Moreno y col., 2003). Dado que caveolina-1 es una proteína de unión a colesterol, su sobreexpresión podría inducir cambios en el ambiente lipídico de membrana donde se localiza BSEP, los cuales favorecerían su actividad transportadora. Sin embargo, también podría ser posible una interacción “activadora” BSEP-caveolina-1, como se ha sugerido para otro transportador canalicular (Storch y col., 2007). No encontramos cambios significativos en la expresión de caveolina-1 con los tratamientos (datos no mostrados); es decir, ni la colestasis inducida por EE ni la administración de AdhAQP1 afectaron su expresión. Por lo tanto, si la activación de BSEP se debe a interacción con hAQP1 en forma directa o a través de caveolina-1 u otros factores, deberá ser esclarecida en futuros estudios.

Se ha descrito que tanto bajo condiciones normales, como colestásicas, la administración retrobiliar de un gran volumen (720 μ L a una velocidad de 2 μ L/sec en ratones de 30 g), provoca la ruptura de las uniones estrechas canaliculares (Wiener y col., 2000). En nuestros estudios, se infundió lentamente un volumen mucho menor (300 μ L), a ratas de 320 g. Aunque no se puede descartar una apertura transitoria de las uniones estrechas, la administración retrobiliar de AdhAQP1 no conduciría a la ruptura de las uniones estrechas ni a una pérdida de polaridad (como puede observarse en la **Figura 3.1 B y C**, la cual muestra que proteínas marcadoras de los dominios canaliculares y basolaterales mantienen su localización luego de la administración de AdhAQP1).

En la colestasis por administración de lipopolisacáridos bacterianos, en similitud a la causada por EE, también disminuye la expresión de AQP8 en la membrana canalicular causando una reducción en la permeabilidad osmótica al agua (Lehmann y col., 2008). Así, se podría anticipar una mejora en la disfunción secretora biliar en este tipo de colestasis hepatocelular con la administración de AdhAQP1. Probablemente, la terapia con AdhAQP1 podría ser beneficiosa para el tratamiento o prevención de hepatopatías colestásicas hepatocelulares (no-obstructivas). Además, el aumento del

contenido de agua biliar podría ayudar a reducir la viscosidad de la bilis en ciertos estados patológicos (Reinhart y col., 2010).

En colestasis, la acumulación sistémica y hepática de SB tiene críticos efectos deletéreos sobre la función hepática. Dado que la transferencia génica de hAQP1 no solo mejoró el flujo biliar, sino que también claramente mejoró/normalizó la excreción biliar y el nivel sérico de las SB, y la infusión intrabiliar es una técnica clínicamente factible por medio de la colangiografía endoscópica retrograda; el adenovector AdhAQP1 podría llegar a ser una efectiva herramienta terapéutica para ciertos desórdenes colestásicos.

6. CONCLUSIONES

Nuestros datos sugieren que la transferencia adenoviral del gen hAQP1 a hígados de ratas colestásicas corrige el flujo biliar mejorando la secreción de agua canalicular inducida por SB y mediada por AQP, y aumentando la excreción biliar de SB debido a la inducción de la actividad del transportador BSEP.

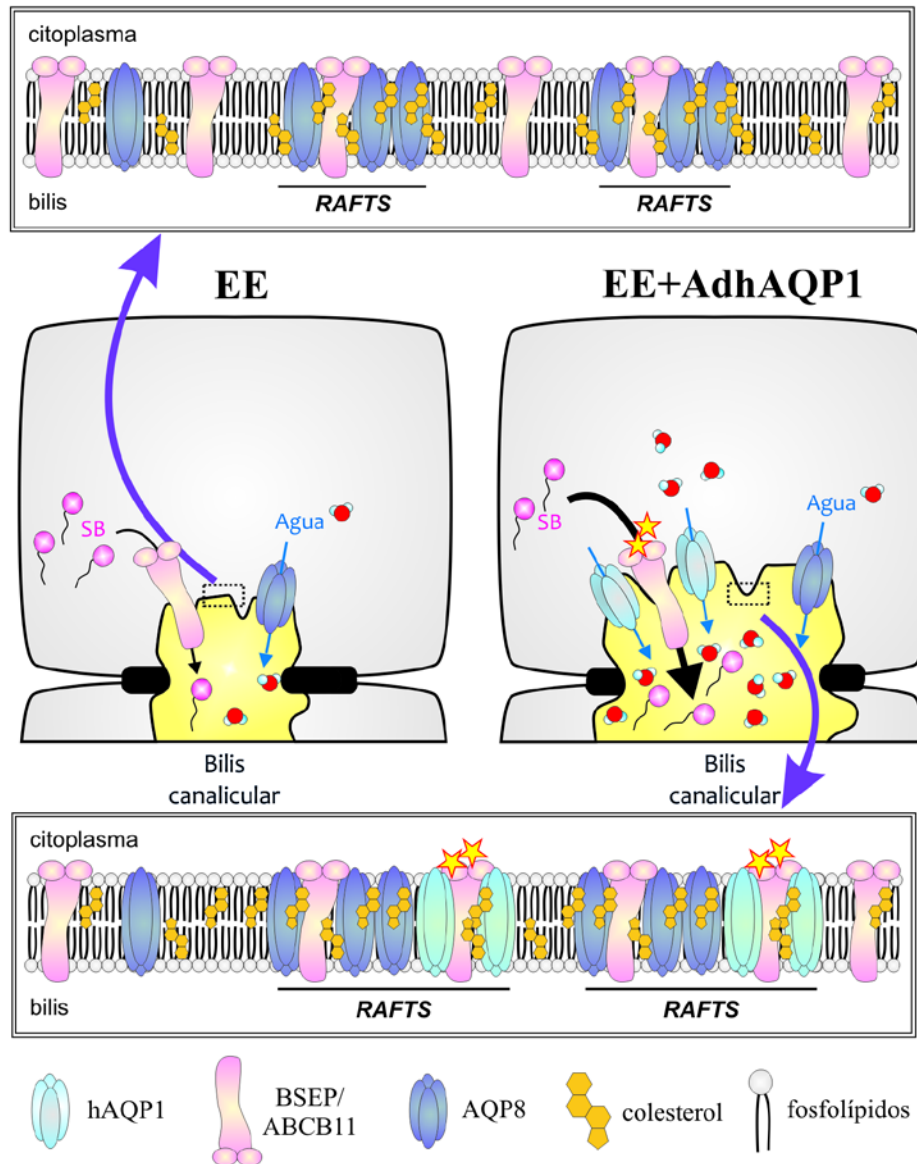


Figura 6.1. Modelo propuesto para la acción de hAQP1 en la membrana canalicular, por el cual se mejora la función secretora biliar en la colestasis inducida por EE. La transferencia génica de AdhAQP1 corrige el flujo biliar en colestasis, como resultado de un aumento de la permeabilidad osmótica al agua de la membrana canalicular y de la excreción biliar de SB debido a la inducción de la actividad del transportador BSEP. La hAQP1 en membrana canalicular se expresa exclusivamente en microdominios lipídicos ricos en colesterol (*rafts*); aumenta la eficiencia colerética de las SB excretadas a bilis, y también redistribuye BSEP en *rafts*, induciendo su actividad y aumentando la excreción biliar de las SB.

7. REFERENCIAS

- Accatino L, Figueroa C, Pizarro M, Solís N. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in estrogen-induced and obstructive cholestasis, and effects of different bile acids in the isolated perfused rat liver. *J Hepatol*, 22:658-670, 1995.
- Agemark M, Kowal J, Kukulski W, Nordén K, Gustavsson N, Johanson U, Engel A, Kjellbom P. Reconstitution of water channel function and 2D-crystallization of human aquaporin 8. *Biochim Biophys Acta*, 1818:839-50, 2012.
- Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ. Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems". *J Biol Chem*, 73:14659-62, 1998.
- Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett*, 555:72-8, 2003.
- Agre P. Aquaporin Water Channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 43: 4278-4290, 2004.
- Arrese M, Macias RI, Briz O, Perez MJ, Marin JJ. Molecular pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Expert Rev Mol Med*, 10:9, 2008.
- Bae TJ, Kim MS, Kim JW, Kim BW, Choo HJ, Lee JW, et al. Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface. *Proteomics*, 4:3536-3548, 2004.
- Baum BJ, Alevizos I, Zheng C, Cotrim AP, Liu S, McCullagh L, Goldsmith CM, Burbelo PD, Citrin DE, Mitchell JB, Nottingham LK, Rudy SF, Van Waes C, Whatley MA, Brahim JS, Chiorini JA, Danielides S, Turner RJ, Patronas NJ, Chen CC, Nikolov NP, Illei GG. Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:19403-7, 2012.
- Baum BJ, Zheng C, Cotrim AP, Goldsmith CM, Atkinson JC, Brahim JS, Chiorini JA, Voutetakis A, Leakan RA, Van Waes C, Mitchell JB, Delporte C, Wang S, Kaminsky SM, Illei GG. Transfer of the AQP1 cDNA for the correction of radiation-induced salivary hypofunction. *Biochim Biophys Acta*, 1758:1071-7, 2006.
- Beitz, E., Wu, B., Holm, L.M., Schultz, J.E. y Zeuthen, T. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:169-274, 2006.
- Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, Jahn TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem*, 282:1183-92, 2007.
- Bossard R, Stieger B, O'Neill B, Fricker G, Meier PJ. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest*, 91: 2714-2720, 1993.
- Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*, 3: 1035-1078, 2013.
- Boyer JL. The hepatobiliary paracellular pathway: a paradigm revisited. *Gastroenterology*, 147:965-968, 2014.
- Boyer, J. L., y P. J. Meier. Characterizing mechanisms of hepatic bile acid transport utilizing isolated membrane vesicles. In: Abelson J and Simon M, eds. *Methods Enzymol*. Volume 192. Pasadena, California, 1990:517-533.
- Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Mane V, Finegold M, Beaudet AL, Ng P. Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther*, 12:99-106, 2005.
- Calamita G, Delporte C, Marinelli RA. Aquaporins in the liver, salivary glands and pancreas. In: *Aquaporins in Health and Disease: new molecular targets for drug discovery* (G. Soveral, S. Nielsen, A. Casini; Eds). CRC Press, p.183-205, 2015.
- Calamita G, Ferri D, Gena P, Liquori GE, Marinelli RA, Meyer G, Portincasa P, Svelto M. Water transport into bile and role in bile formation. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5:137-42, 2005 a.

- Calamita G, Ferri D, Bazzini C, Mazzone A, Bottà G, Liquori GE, Paulmichl M, Portincasa P, Meyer G, Svelto M. Expression and subcellular localization of the AQP8 and AQP1 water channels in the mouse gall-bladder epithelium. *Biol Cell*, 97:415-23, 2005 b.
- Calamita G, Ferri D, Gena P, Liquori GE, Cavalier A, Thomas D, Svelto M. The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water. *J Biol Chem*, 280:17149-53, 2005 c.
- Calamita G, Gena P, Meleleo D, Ferri D y Svelto M. Water permeability of rat liver mitochondria: A biophysical study. *Biochim Biophys Acta*, 1758:1018-1024, 2006.
- Calamita G, Gena P, Ferri D, Rosito A, Rojek A, Nielsen S, Marinelli RA, Frühbeck G, Svelto M. Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol. *Biol Cell*, 104:342-51, 2012.
- Calamita G, Moreno M, Ferri D, Silvestri E, Roberti P, Schiavo L, Gena P, Svelto M, Goglia F. Triiodothyronine modulates the expression of aquaporin-8 in rat liver mitochondria. *J Endocrinol*, 192:111-20, 2007.
- Calamita G, Spalluto C, Mazzone A, Rocchi M, Svelto M. Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse aquaporin-8 water channel gene (Aqp8). *Cytogenet Cell Genet*, 85:237-41, 1999.
- Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Cavalier A, Cassano G, Thomas D, Svelto M. Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *Eur J Cell Biol*, 80:711-9, 2001.
- Caperna TJ, Shannon AE, Richards MP, Garrett WM, Talbot NC. Identification and characterization of aquaporin-9 (AQP9) in porcine hepatic tissue and hepatocytes in monolayer culture. *Domest Anim Endocrinol*, 32:273-86, 2007.
- Carbrey JM, Gorelick-Feldman DA, Kozono D, Praetorius J, Nielsen S, Agre P. Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:2945-50, 2003.
- Carbrey JM, Agre P. Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol*, 190:3-28, 2009.
- Carreras FI, Gradilone SA, Mazzone A, García F, Huang BQ, Ochoa JE, Tietz PS, LaRusso NF, Calamita G, Marinelli RA. Rat hepatocyte aquaporin-8 water channels are down-regulated in extrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 37:1026-1033, 2003.
- Carreras FI, Lehmann GL, Ferri D, Tioni MF, Calamita G, Marinelli RA. Defective hepatocyte aquaporin-8 expression and reduced canalicular membrane water permeability in estrogen-induced cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292:G905-G912, 2007.
- Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Pozzi EJ, Vore M, Coleman R, Roma MG. Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285:G449-G459, 2003.
- Crocenzi FA, Sánchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Favre CO, Rodríguez Garay EA, Mottino AD, Coleman R, Roma MG. Beneficial effects of silymarin on estrogen-induced cholestasis in the rat: a study in vivo and in isolated hepatocyte couplets. *Hepatology*, 34:329-339, 2001.
- Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ, Ruiz ML, Zucchetti AE, Roma MG, Mottino AD, Vore M. Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms are critical to estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in the rat. *Hepatology*, 48:1885-1895, 2008.
- Cuperus FJ, Claudel T, Gautherot J, Halilbasic E, Trauner M. The role of canalicular ABC transporters in cholestasis. *Drug Metab Dispos*, 42:546-60, 2014.
- Dawson PA, Lan T, Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res*, 50:2340-57, 2009.
- Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, Conner MT. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta*, 1840:1492-506, 2014.
- Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre P, Baum BJ. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:3268-73, 1997.

- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, Ludewig U. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem J*, 414:53-61, 2008.
- Elias E, Iqbal S, Knutton S, Hickey A, Coleman R. Increased tight junction permeability: a possible mechanism of oestrogen cholestasis. *Eur J Clin Invest*, 13: 383-90, 1983.
- Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, Frøkiaer J, Nielsen S. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 276:1118-28, 2000.
- Elkjaer ML, Nejsum LN, Gresz V, Kwon TH, Jensen UB, Frøkiaer J, Nielsen S. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281:F1047-57, 2001.
- Ferri D, Mazzone A, Liquori GE, Cassano G, Svelto M, Calamita G. Ontogeny, distribution, and possible functional implications of an unusual aquaporin, AQP8, in mouse liver. *Hepatology*, 38:947-57, 2003.
- Finkelstein, A. Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes: Theory and reality. Wiley, New York, 1987.
- Fujiyoshi Y, Mitsuoka K, de Groot BL, Philippsen A, Grubmüller H, Agre P, Engel A. Structure and function of water channels. *Curr Opin Struct Biol*, 12:509-15, 2002.
- Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*, 70:8934-43, 1996.
- García F, Kierbel A, Larocca MC, Gradilone SA, Splinter P, LaRusso NF, Marinelli RA. The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J Biol Chem*, 276:12147-52, 2001.
- Geier A, Dietrich CG, Gerloff T, Haendly J, Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gattung C. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochim Biophys Acta*, 1609: 87-94, 2003.
- Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 283-308, 2007.
- Gena P, Fanelli E, Brenner C, Svelto M y Calamita G. News and views on mitochondrial water transport. *Front. Biosci*, 1, 352-361, 2009.
- Gerbeau P, Güçlü J, Ripoché P, Maurel C. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J*, 18:577-87, 1999.
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta*, 1788:1213-28, 2009.
- Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys*, 39:361-96, 2006.
- Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem*, 7:14, 2006.
- Gradilone SA, García F, Huebert RC, Tietz PS, Larocca MC, Kierbel A, Carreras FI, LaRusso NF, Marinelli RA. "Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rat hepatocytes". *Hepatology*, 37: 1435-1441, 2003.
- Gradilone SA, Carreras FI, Lehmann GL, Marinelli RA. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the glucagon-induced translocation of aquaporin-8 to hepatocyte plasma membrane. *Biol Cell*, 97:831-6, 2005.
- Gregoire F, Lucidi V, Zerrad-Saadi A, Virreira M, Bolaky N, Delforge V, Lemmers A, Donckier V, Devière J, Demetter P, Perret J, Delporte C. Analysis of aquaporin expression in liver with a focus on hepatocytes. *Histochem Cell Biol*, 144:347-63, 2015.
- Guyot C, Hofstetter L, Stieger B. Differential effects of membrane cholesterol content on the transport activity of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) and of the bile salt export pump (ABCB11). *Mol Pharmacol*, 85:909-920, 2014.
- Guyot C, Stieger B. Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains. *J Hepatol*, 55:1368-1376, 2011.

- Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta*, 1609: 1-18, 2003.
- Hendrickx R, Stichling N, Koelen J, Kuryk L, Lipiec A, Greber UF. Innate Immunity to Adenovirus. *Hum Gene Ther*, 25: 265-84, 2014.
- Hofmann, AF. Overview of Bile Secretion. In: Pollock DM (ed). *Comprehensive Physiology*, John Wiley & Sons, Hoboken NJ, 2011, pp 549-566. doi: 10.1002/cphy.cp060328.
- Homolya L, Varadi A and Sarkadi B. Multidrug resistance-associated proteins: Export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17: 103-114, 2003.
- Howard Evans W. Preparation and characterization of mammalian plasma membranes. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, edited by Work E and Work T. North Holland: 1979, p. 115.
- Huang L, Smit JW, Meijer DK, et al. Mrp2 is essential for estradiol-17beta (beta-D-glucuronide)- induced cholestasis in rats. *Hepatology*, 32: 66-72, 2000.
- Huebert RC, Splinter PL, García F, Marinelli RA, LaRusso NF. Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *J Biol Chem*, 277: 22710-22717, 2002.
- Hung DY, Siebert GA, Chang P, Roberts MS. Hepatic pharmacokinetics of taurocholate in the normal and cholestatic rat liver. *Br J Pharmacol*, 145:57-65, 2005.
- Ishibashi K, Tanaka Y, Morishita Y. The role of mammalian superaquaporins inside the cell. *Biochim Biophys Acta*, 1840:1507-12, 2014.
- Ismair MG, Häusler S, Stuermer CA, Guyot C, Meier PJ, Roth J, Stieger B. ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes. *Hepatology*, 49:1673-1682, 2009.
- Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S, Ishibashi K. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 330:832-8, 2005.
- Jablonski EM, Hughes FM Jr. The potential role of caveolin-1 in inhibition of aquaporins during the AVD. *Biol Cell*, 98:33-42, 2006.
- Jaffe HA, Danel C, Longenecker G, Metzger M, Setoguchi Y, Rosenfeld MA, Gant TW, Thorgeirsson SS, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, et al. Adenovirus mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat Genet*, 1:372-8, 1992.
- Jahn TP, Møller AL, Zeuthen T, Holm LM, Klaerke DA, Mohsin B, Kühlbrandt W, Schjoerring JK. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett*, 574:31-6, 2004.
- Jessner W, Zsembery A, Graf J. Transcellular water transport in hepatobiliary secretion and role of aquaporins in liver. *Wien Med Wochenschr*, 158: 565-569, 2008.
- Jiang X, Ren Y, Williford JM, Li Z, Mao HQ. Liver-targeted gene delivery through retrograde intrabiliary infusion. In: Ogris M, and Oupicky D, eds. *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery: Methods and Protocols*, *Methods Mol Biol*. Humana Press: New Jersey, 2013; 275-284.
- Jirkovska M, Majer F, Smidova J, Striteský J, Shaik GM, Dráber P, Vitek L, Marecek Z, Smíd F. Changes in GM1 ganglioside content and localization in cholestatic rat liver. *Glycoconj J*, 24: 231-41, 2007.
- Jung JS, Bhat RV, Preston GM, Guggino WB, Baraban JM, Agre P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:13052-6, 1994.
- Kaplan JM, Armentano D, Sparer TE, Wynn SG, Peterson PA, Wadsworth SC, Couture KK, Pennington SE, St George JA, Gooding LR, Smith AE. Characterization of factors involved in modulating persistence of transgene expression from recombinant adenovirus in the mouse lung. *Hum Gene Ther*, 8:45-56, 1997.
- Keppler D. Multidrug Resistance Proteins (MRPs, ABCCs): Importance for Pathophysiology and Drug Therapy. *Handb Exp Pharmacol*, 201:299-323, 2011.
- King LS, Kozono D, Agre P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporinbiology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5:687-98, 2004.

- King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat. *J Clin Invest*, 97:2183-91, 1996.
- Kis E, Ioja E, Nagy T, Szente L, Herédi-Szabó K, Krajcsi P. Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos*, 37:1878-1886, 2009.
- Kitchen P, Day RE, Salman MM, Conner MT, Bill RM, Conner AC. Beyond water homeostasis: Diverse functional roles of mammalian aquaporins. *Biochim Biophys Acta*, 1850:2410-21, 2015.
- Koopen NR, Post SM, Wolters H, et al. Differential effects of 17alpha ethinylestradiol on the neutral and acidic pathways of bile salt synthesis in the rat. *J Lipid Res*, 40:100-8, 1999.
- Koopen NR, Wolters H, Havinga R, Vonk RJ, Jansen PL, Müller M, Kuipers F. Impaired activity of the bile canalicular organic anion transporter (Mrp2/cmoat) is not the main cause of ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Hepatology*, 27:537-545, 1998.
- Koyama N, Ishibashi K, Kuwahara M, Inase N, Ichioka M, Sasaki S, Marumo F. Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene. *Genomics*, 54:169-72, 1998.
- Kozarsky, Wilson. Gene therapy: adenoviral vectors. *Curr Opin Genet Devel*, 3:499-503, 1993.
- Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T, Menon AG. Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem*, 276:23413-20, 2001.
- Kuriyama H, Shimomura I, Kishida K, Kondo H, Furuyama N, Nishizawa H, Maeda N, Matsuda M, Nagaretani H, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*, 51:2915-21, 2002.
- Kuriyama S, Yoshiji H, Tominaga K, Tsujinoue H, Nakatani T, Tsujimoto T, Okuda H, Akahane T, Deguchi A, Nakai S, Masaki T, Uchida N. Repetitive and safe transgene expression in rat liver is achievable by adenoviral infusion into the common bile duct. *Int J Mol Med*, 16:503-8, 2005.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
- Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis*, 30:125-133, 2010.
- Lam P, Xu S, Soroka CJ, Boyer JL. A C-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology*, 55:1901-1911, 2012.
- Larocca MC, Soria LR, Espelt MV, Lehmann GL, Marinelli RA. Knockdown of hepatocyte aquaporin-8 by RNA interference induces defective bile canalicular water transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296:G93-100, 2009.
- Lee J, Boyer JL. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis*, 20: 373-384, 2000.
- Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology*, 118:163-172, 2000.
- Lehmann GL, Carreras FI, Soria LR, Gradilone SA, Marinelli RA. LPS induces the TNF-alpha-mediated downregulation of rat liver aquaporin-8: role in sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294:G567-G575, 2008.
- Lehmann GL, Marinelli RA. Peritoneal sepsis downregulates liver expression of Aquaporin-8: a water channel involved in bile secretion. *Liver Int*, 29:317-318, 2009.
- Li Q, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SL. Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther*, 4:403-409, 1993.
- Liu Z, Shen J, Carbrey JM, Mukhopadhyay R, Agre P, Rosen BP. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:6053-8, 2002.
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB, von Wirén N. Urea transport by nitrogen-regulated tonoplast intrinsic proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 133:1220-8, 2003.

- Loqué D, Ludewig U, Yuan L, von Wirén N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol*, 137:671-80, 2005.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal, RJJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
- Madeira A, Moura TF, Soveral G. Detecting Aquaporin Function and Regulation. *Front Chem* 4:3, 2016.
- Maeda N, Hibuse T, Funahashi T. Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity. *Handb Exp Pharmacol*, 190:233-49, 2009.
- Maeda N. Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. *Mol Aspects Med*, 33:665-75, 2012.
- Marchissio MJ, Francés DE, Carnovale CE, Marinelli RA. Evidence for necrosis, but not apoptosis, in human hepatoma cells with knockdown of mitochondrial aquaporin-8. *Apoptosis*, 19:851-9, 2014.
- Marchissio MJ, Francés DE, Carnovale CE, Marinelli RA. Mitochondrial aquaporin-8 knockdown in human hepatoma HepG2 cells causes ROS-induced mitochondrial depolarization and loss of viability. *Toxicol Appl Pharmacol*, 264:246-54, 2012.
- Marinelli RA, Lehmann GL, Soria LR, Marchissio MJ. Hepatocyte aquaporins in bile formation and cholestasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16:2642-52, 2011.
- Marinelli RA, Tietz PS, Caride AJ, Huang BQ, LaRusso NF. Water transporting properties of hepatocyte basolateral and canalicular plasma membrane domains. *J Biol Chem*, 278: 43157-43162, 2003.
- Marinelli RA, Tietz PS, Pham LD, Rueckert L, Agre P, LaRusso NF. Secretin induces the apical insertion of aquaporin-1 water channels in rat cholangiocytes. *Am J Physiol*, 276:G280-286, 1999.
- Marinelli RA, Marrone J, Soria LR. Hepatocyte aquaporins in bile physiology and disease. *Physiol Mini Rev*, Vol.9 N°1, 2016.
- Marples D, Knepper MA, Christensen EI, Nielsen S. Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am J Physiol*, 269:C655-64, 1995.
- Masyuk AI, LaRusso NF. Aquaporins in the hepatobiliary system. *Hepatology*, 43:S75-81, 2006.
- Mazzone A, Tietz P, Jefferson J, Pagano R, LaRusso NF. Isolation and characterization of lipid microdomains from apical and basolateral plasma membranes of rat hepatocytes. *Hepatology*, 43:287-296, 2006.
- Meier PJ and Stieger B. Molecular mechanisms in bile formation. *News Physiol Sci* 15:89-93, 2000.
- Molina H, Azocar L, Ananthanarayanan M, Arrese M, Miquel JF. Localization of the Sodium-Taurocholate cotransporting polypeptide in membrane rafts and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1778:1283-91, 2008.
- Monte MJ, Badia MD, Palomero F, el-Mir MY, Alonso JR, Marin JJ. Effects of selective zonal injury on bile acid-induced bile flow in the isolated rat liver. *Am J Physiol*, 264:G1103-11, 1993.
- Moreno M, Molina H, Amigo L, Zanlungo S, Arrese M, Rigotti A, et al. Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice. *Hepatology*, 38:1477-1488, 2003.
- Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-chikuma M, Andoo A, Shimono M, Matsuki A, Kobayashi K, Ikeda M, Yamamoto T, Verkman A, Kusano E, Ookawara S, Takata K, Sasaki S, Ishibashi K. Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. *Mol Cell Biol*, 25:7770-9, 2005.
- Mottino AD, Carreras FI, Gradilone SA, Marinelli RA, Vore M. Canalicular membrane localization of hepatocyte aquaporin-8 is preserved in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *J Hepatol*, 44:232-233, 2006.
- Mulders SM, Preston GM, Deen PM, Guggino WB, van Os CH, Agre P. Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *J Biol Chem*, 270:9010-16, 1995.
- Narvaiza I., Mazzolini G., Qian C., Prieto J., Melero I. Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer. *Inmunología*, 2: 225-242, 2003.

- Nicchia GP, Frigeri A, Nico B, Ribatti D, Svelto M. Tissue distribution and membrane localization of aquaporin-9 water channel: evidence for sex-linked differences in liver. *J Histochem Cytochem*, 12:1547-56, 2001.
- Nyasae LK, Hubbard AL, Tuma PL. Transcytotic efflux from early endosomes is dependent on cholesterol and glycosphingolipids in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell*, 14:2689-2705, 2003.
- Padma, S., Smeltz, A.M., Banks, P.M., Iannitti, D.A. y McKillop, I.H. Altered aquaporin 9 expression and localization in human hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, 11:66-74, 2009.
- Pauli-Magnus C, Meier PJ, Stieger B. Genetic determinants of drug-induced cholestasis and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Semin Liver Dis*, 30:147-59, 2010.
- Paulusma CC, de Waart DR, Kunne C, Mok KS, Elferink RP. Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content. *J Biol Chem*, 284:9947-9954, 2009.
- Petr T, Smid V, Kucerova V, Váňová K, Leníček M, Vítek L, Smíd F, Muchová L. The effect of heme oxygenase on ganglioside redistribution within hepatocytes in experimental estrogen-induced cholestasis. *Physiol Res*, 63: 359-67, 2014.
- Portincasa P, Calamita G. Water channel proteins in bile formation and flow in health and disease: when immiscible becomes miscible. *Mol Aspects Med*, 33:651-64, 2012.
- Preston GM, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88:11110-4, 1991.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 256:385-7, 1992.
- Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem*, 268:17-20, 1993.
- Rasband, WS. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2011; <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Reinhart WH, Näf G, Werth B. Viscosity of human bile sampled from the common bile duct. *Clin Hemorheol Microcirc*, 44:177-182, 2010.
- Rodríguez A, Gena P, Méndez-Giménez L, Rosito A, Valentí V, Rotellar F, Sola I, Moncada R, Silva C, Svelto M, Salvador J, Calamita G, Frühbeck G. Reduced hepatic aquaporin-9 and glycerol permeability are related to insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Obes (Lond)*, 38:1213-20, 2014.
- Rodríguez A, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, García-Navarro S, Rotellar F, Valentí V, Silva C, Gil MJ, Salvador J, Burrell MA, Calamita G, Malagón MM, Frühbeck G. Insulin-and leptin-mediated control of aquaglyceroporins in human adipocytes and hepatocytes is mediated via the PI3 K/Akt/mTOR signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab*, 96:E586-97, 2011.
- Rodriguez MR, Soria LR, Ventimiglia MS, Najenson AC, Di María A, Dabas P, Fellet A, Marinelli RA, Vatta MS, Bianciotti LG. Endothelin-1 and -3 induce choleresis in the rat through ETB receptors coupled to nitric oxide and vagovagal reflexes. *Clin Sci (Lond)*, 125:521-532, 2013.
- Rojek A, Füchtbauer EM, Füchtbauer A, Jelen S, Malmendal A, Fenton RA, Nielsen S. Liver-specific Aquaporin 11 knockout mice show rapid vacuolization of the rough endoplasmic reticulum in periportal hepatocytes after amino acid feeding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304:G501-15, 2013.
- Rojek AM, Skowronski MT, Füchtbauer EM, Füchtbauer AC, Fenton RA, Agre P, Frøkiær J, Nielsen S. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:3609-14, 2007.
- Roma MG, Crocenzi FA and Sanchez Pozzi EA. Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond)* 114:567-588, 2008.
- Rosario J, Sutherland E, Zaccaro L, Simon FR. Ethinylestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein composition. *Biochemistry*, 27:3939-3946, 1988.
- Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, 165:1260-87, 2012.

- Ruiz ML, Rigalli JP, Arias A, Villanueva S, Banchio C, Vore M, Mottino AD, Catania VA. Induction of hepatic multidrug resistance-associated protein 3 by ethynylestradiol is independent of cholestasis and mediated by estrogen receptor. *Drug Metab Dispos*, 41:275-80, 2013.
- Sales AD, Lobo CH, Carvalho AA, Moura AA, Rodrigues AP. Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet Mol Res*, 12:6718-32, 2013.
- Saparov SM, Liu K, Agre P, Pohl P. Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J Biol Chem*, 282:5296-301, 2007.
- Savage DF, Stroud RM. Structural basis of aquaporin inhibition by mercury. *J Mol Biol*, 368:607-17, 2007.
- Scholl B, Gervaz P, Martinet O, Ksontini R, Krueger T, Sahli R, Gillet M. Adenovirus-mediated gene transfer into selected liver segments using a vascular exclusion technique. *Eur Surg Res*, 33:348-54, 2001.
- Shenk T. Adenoviridae: the viruses and their replication, In: BN F, editor. *Fundamental virology*, 1996, p 979-1016.
- Shinkai Y, Sumi D, Toyama T, Kaji T, Kumagai Y. Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 237:232-6, 2009.
- Simon FR, Fortune J, Iwahashi M, Gartung C, Wolkoff A, Sutherland E. Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters. *Am J Physiol*, 1996.
- Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med*, 37:3-14, 2014.
- Soria LR, Fanelli E, Altamura N, Svelto M, Marinelli RA, Calamita G. Aquaporin-8-facilitated mitochondrial ammonia transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 393:217-21, 2010.
- Soria LR, Gradilone SA, Larocca MC, Marinelli RA. Glucagon induces the gene expression of aquaporin-8 but not that of aquaporin-9 water channels in the rat hepatocyte. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296:R1274-81, 2009.
- Soria LR, Marrone J, Calamita G, Marinelli RA. Ammonia detoxification via ureagenesis in rat hepatocytes involves mitochondrial aquaporin-8 channels. *Hepatology*, 57:2061-71, 2013.
- Soria LR, Marrone J, Molinas SM, Lehmann GL, Calamita G, Marinelli RA. Lipopolysaccharide impairs hepatocyte ureagenesis from ammonia: involvement of mitochondrial aquaporin-8. *FEBS Lett*, 588:1686-91, 2014.
- Stewart PL, Burnett RM, Cyrklaff M, Fuller SD. Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*, 67:145-54, 1991.
- Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J*, 12:2589-99, 1993.
- Stieger B, O'Neill B, Meier PJ. ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles *Biochem J*, 284:67-74, 1992.
- Storch CH, Eehalt R, Haefeli WE, Weiss J. Localisation of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 323:257-264, 2007.
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, 414:872-8, 2001.
- Talalay P. Enzymic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem Anal*, 8:119-43, 1960.
- Talbot, N.C., Garrett, W.M. y Caperna, T.J. Analysis of the expression of aquaporin-1 and aquaporin-9 in pig liver tissue: comparison with rat liver tissue. *Cells Tissues Organs*, 174:117-128, 2003.
- Tani T, Koyama Y, Nihei K, Hatakeyama S, Ohshiro K, Yoshida Y, Yaoita E, Sakai Y, Hatakeyama K, Yamamoto T. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat digestive organs and testis. *Arch Histol Cytol*, 64:159-68, 2001.
- Tao N, Gao G-P, Parr M, et al. Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther*, 3:28-35, 2001.

- Teos LY, Zheng CY, Liu X, Swaim WD, Goldsmith CM, Cotrim AP, Baum BJ, Ambudkar IS. Adenovirus-mediated hAQP1 expression in irradiated mouse salivary glands causes recovery of saliva secretion by enhancing acinar cell volume decrease. *Gene Ther*. 2016 Mar 11. doi: 10.1038/gt.2016.29. En prensa.
- Terao R, Honda K, Hatano E, Uehara T, Yamamoto M, Yamaoka Y. Suppression of proliferative cholangitis in a rat model with direct adenovirus-mediated retinoblastoma gene transfer to the biliary tract. *Hepatology*, 28:605-12, 1998.
- Tietz P, Jefferson J, Pagano R, LaRusso NF. Membrane microdomains in hepatocytes: potential target areas for proteins involved in canalicular bile secretion. *J Lipid Res*, 46:1426-1432, 2005.
- Tietz PS, Thistle JL, Miller LJ, LaRusso NF. Development and validation of a method for measuring the glycine and taurine conjugates of bile acids in bile by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 336:249-257, 1984.
- Tominaga K, Kuriyama S, Yoshiji H, Deguchi A, Kita Y, Funakoshi F, Masaki T, Kurokohchi K, Uchida N, Tsujimoto T, Fukui H. Repeated adenoviral administration into the biliary tract can induce repeated expression of the original gene construct in rat livers without immunosuppressive strategies. *Gut*, 53:1167-117, 2004.
- Trauner M and Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633-671, 2003.
- Tsukaguchi H, Shayakul C, Berger UV, Mackenzie B, Devidas S, Guggino WB, van Hoek AN, Hediger MA. Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *J Biol Chem*, 273:24737-43, 1998.
- Tsukaguchi H, Weremowicz S, Morton CC, Hediger MA. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am J Physiol*, 277:F685-96, 1999.
- van der Wouden JM, van IJzendoorn SC, Hoekstra D. Oncostatin M regulates membrane traffic and stimulates bile canalicular membrane biogenesis in HepG2 cells. *EMBO J*, 21:6409-6418, 2002.
- Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med*, 63:303-16, 2012.
- Verkman AS. Water permeability measurement in living cells and complex tissues. *J Membr Biol*, 173:73-87, 2000.
- Wiener SM, Hoyt RF Jr, Deleonardis JR, Clevenger RR, Jeffries KR, Nagashima K, et al. Manometric changes during retrograde biliary infusion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279:G49-66, 2000.
- Wilson JM. Adenovirus-mediated gene transfer to liver. *Adv Drug Deliv Rev*, 46:205-9, 2001.
- Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther*, 8:37-44, 1997.
- Xie X, Forsmark CE, Lau JY. Effect of bile and pancreatic juice on adenoviral-mediated gene delivery: implications on the feasibility of gene delivery through ERCP. *Dig Dis Sci*, 45:230-6, 2000.
- Yakata K, Hiroaki Y, Ishibashi K, Sohara E, Sasaki S, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta*, 1768:688-93, 2007.
- Yang B, Ma T, Dong JY, Verkman AS. Partial correction of the urinary concentrating defect in aquaporin-1 null mice by adenovirus-mediated gene delivery. *Hum Gene Ther*, 11:567-75, 2000.
- Yang B, Zhao D, Verkman AS. Evidence against functionally significant aquaporin expression in mitochondria. *J Biol Chem*, 281:16202-6, 2006.
- Zardoya R, Villalba S. A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *J Mol Evol*, 52:391-404, 2001.
- Zheng C, Goldsmith CM, Mineshiba F, Chiorini JA, Kerr A, Wenk ML, Vallant M, Irwin RD, Baum BJ. Toxicity and biodistribution of a first-generation recombinant adenoviral vector, encoding aquaporin-1, after retroductal delivery to a single rat submandibular gland. *Hum Gene Ther*, 17:1122-33, 2006.
- Zollner G, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin. Liver Dis*. 12 :1-26 (viii), 2008.

Zsembery A, Thalhammer T and Graf J. Bile formation: a concerted action of membrane transporters in hepatocytes and cholangiocytes. *News Physiol Sci* 15:6-11, 2000.

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1.	Expresión de AQPs en humanos	3
1.2.	Topología, organización y funcionamiento de las aquaporinas	4
1.3.	Transporte de solutos osmóticamente activos y de agua durante la formación de bilis en el hepatocito	14
1.4.	Contribución de la AQP8 canalicular en la colestasis hepatocelular	17
1.5.	Estructura de la partícula adenoviral	19
3.1.	Esquema de la estructura de AdhAQP1	24
3.2.	Presencia de marcadores proteicos de membranas plasmáticas canaliculares y basolaterales en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1	31
4.1.	Inmunohistoquímica para AQP1 en hígados de ratas sometidas a transferencia génica de hAQP1 por adenovirus	38
4.2.	Expresión hepática de AQP1 en función de la dosis de AdhAQP1 administrada	39
4.3.	Expresión hepática de hAQP1 en ratas normales y colestásicas luego de la transferencia génica con AdhAQP1.	40
4.4.	Expresión de hAQP1 en dominios de membrana plasmática hepática de ratas colestásicas luego de la transferencia génica con AdhAQP1	41
4.5.	Comparación de la expresión hepática de hAQP1 en ratas con colestasis por EE y no colestásicas luego de la transferencia génica con AdhAQP1	42
4.6.	Permeabilidad osmótica al agua de membranas hepáticas canaliculares ratas colestásicas sometidos a transferencia génica mediante el adenovector AdhAQP1	44
4.7.	Flujo biliar en ratas transducidas con el AdhAQP1	47
4.8.	Eficiencia colerética de sales biliares endógenas en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	49
4.9.	Excreción biliar de SB en condiciones basales en ratas colestásicas transducidas con AdhAQP1	51
4.10.	Administración de TC a ratas EE transducidas con AdhAQP1	53
4.11.	Concentración de sales biliares séricas en ratas EE transducidas con AdhAQP1	54
4.12.	Expresión canalicular de BSEP en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1	55
4.13.	Actividad del transportador BSEP en membranas plasmáticas canaliculares hepáticas de animales colestásicos tratados con AdhAQP1	57

4.14.	Localización de BSEP en microdominios lipídicos canaliculares <i>rafts/no</i> <i>rafts</i> en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1	60
4.15.	Localización de BSEP en microdominios lipídicos canaliculares <i>rafts/no</i> <i>rafts</i> en ratas colestásicas transducidas con el vector AdhAQP1, aislados por gradiente de flotación en sacarosa	61
6.1.	Modelo propuesto para la acción de hAQP1 en la membrana canalicular, por el cual se mejora la función secretora biliar en la colestasis inducida por EE	68

ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Localización y permeabilidad de las AQP _s del hepatocito	6
4.1	Parámetros séricos hepáticos y pesos corporales y de los hígados de ratas . colestásicas transducidas con AdhAQP1	45

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo de Tesis:

☞ Al Dr. Raúl Marinelli por haber confiado en mí para llevar a cabo este hermoso proyecto y por dirigirme a lo largo de todos estos años. Porque siempre tuvo en mente un objetivo claro, y con paciencia me guió para alcanzarlo. Porque en todo momento me dio el espacio necesario para discutir los resultados. Porque me brindó sustento y herramientas que me han hecho crecer científicamente.

☞ A mis tutores, la Dra. Laura Trumper y el Dr. Fernando Crocenzi, por acompañarme en este proceso y por su buena predisposición constante.

☞ A Juan Monti, mi gran profesor. Porque siempre estuvo presente cuando lo necesité y dispuesto a ayudarme. Gracias Juan por tu paciencia y generosidad a la hora de enseñarme. Gracias por tus consejos, contención y afecto.

☞ A Cris Carnovale, por su calidez desde el primer momento y por brindarme siempre con cariño una palabra de aliento.

☞ Al Dr. Mottino, por abrirme las puertas del Instituto y por su calidez, por estar siempre atento a cómo estaba y avanzaban mis experimentos.

☞ A Guillermo Lehmann, por enseñarme con tanta paciencia las primeras cirugías. Por transmitirme confianza y seguridad para encarar este proyecto.

☞ A Leandro, por su incondicional ayuda. Por contagiarme su pasión por la ciencia. Por su espíritu de trabajo en equipo. Por alentarme en todo momento y hacer divertidas las largas horas compartidas. Gracias Nardi!

☞ A Mauro, por su colaboración fundamental el último año, por estar siempre dispuesto con una sonrisa y sus palabras de aliento. Al grupo que junto con Alejo empezamos a formar.

☞ A Ceci L., por su colaboración con las imágenes; por estar siempre al pie del cañón dispuesta a ayudarme. Y por sobre todo, por su amistad y sinceridad.

☞ A Ceci B., Tere y Lu, por tantas charlas y catarsis compartidas, por brindarme su amistad y apoyo científico y humano. A Laura, mi ex vecina, por su asistencia en momentos clave y a Silvi, por las charlas compartidas.

☞ A Dani, un gran investigador, por su generosidad y predisposición para ayudarme desde el minuto cero; por los buenos momentos

compartidos, que hicieron que el tiempo pasara más rápido. A Isma, por su amabilidad, buena onda y sinceridad.

☞ A las chicas de mi lado: Flavia T., Andre, Pao y Fla L., por estar siempre para todo y por los lindos momentos compartidos. Gracias ahora junto con Aine, Romi y Nanu, por permitirme disfrutar las horas de trabajo.

☞ A los del otro lado: Lauri, Gi, Pau y Ari, por los buenos momentos compartidos dentro y fuera del Ifise.

☞ A los exiliados: Ana, Flor, Eva, Facu y a Cristián por su buena onda.

☞ A Alejandrita Martínez, por su colaboración con las inmunohistoquímicas, y su calidez humana. A Rodolfo Rassia por su asistencia para la realización de los estudios de stopped flow.

☞ Al Dr. Rodolfo Goya y a Ignacio Schwerdt, por su colaboración fundamental para amplificar el vector.

☞ A José Pellegrino, por su colaboración con el confocal y HPLC, y por hacer amenos los momentos de trabajo.

☞ A Elena, donde quiera que estés, por tu cariño y las charlas compartidas.

☞ A todos los integrantes del IFISE, los de antes y los de ahora, por crear un ambiente agradable en el que se disfruta el trabajo cotidiano.

☞ Al Conicet, por la becas otorgadas que me permitieron realizar este trabajo de Tesis.

☞ A mis amigas de la facu: Romi, Maru, Evi, Ro, Mili y Nachi, por su apoyo y amistad incondicional todos estos años.

☞ A Gabi, Flor y Lari, por apoyarme y comprender las ausencias.

☞ A quien me dio la primer oportunidad en este ámbito, por creer en mí y enseñarme los primeros pasos. Por tanto cariño y por su generosidad, y por darme alas para volar. Gracias Patri por siempre.

☞ A mi familia. A mis padres, por apoyarme en toda la carrera. Gracias por estar siempre incondicionalmente. No hubiera podido alcanzar esta meta sin uds. A mis hermanos, por estar siempre. A mi prima y madrina, por su amistad y apoyo incondicional.

☞ A Fede, mi amor y a Katja, por iluminar mi vida y hacerme inmensamente feliz.

FE DE ERRATAS

En la página X, en lugar de decir: "...como una posible estrategia terapéutica para cuadros de colestásicos hepatocelular", debe decir: "...como una posible estrategia terapéutica para cuadros de colestasis hepatocelular".