



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**BIOLOGÍA CELULAR DEL PROCESO DE
INTERNALIZACIÓN ENDOCÍTICA DE
TRANSPORTADORES HEPATOCELULARES
CANALICULARES EN COLESTASIS POR
ESTRÓGENOS**

Presentada por: Lic. Gisel Sabrina Mischczuk

Rosario, Argentina

2016

BIOLOGÍA CELULAR DEL PROCESO DE INTERNALIZACIÓN ENDOCÍTICA DE TRANSPORTADORES HEPATOCELULARES CANALICULARES EN COLESTASIS POR ESTRÓGENOS

Gisel Sabrina Miszczuk
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 - U.N.R - CONICET), Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01 de Marzo de 2012 y el 30 de Junio de 2016, bajo la dirección de los Dres. Fernando A. Crocenzi y Marcelo G. Roma.

Director:

Dr. Fernando A. Crocenzi

Co-Director:

Dr. Marcelo G. Roma

Jurado de Tesis:

Dra. Anabel Brandoni

Dra. Carina Shayo

Dr. Sergio Gradilone

Al esfuerzo y al amor de mi familia

A mis docentes, con o sin título...

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

Artículos Originales:

- **Miszczuk G.S.**, Barosso I.R., Zucchetti A. E., Boaglio A.C., Pellegrino J. M., Sánchez Pozzi E.J., Roma M.G., Crocenzi F.A. *Sandwich-cultured rat hepatocytes as an in vitro model to study canalicular transport alterations in cholestasis. Arch Toxicol 89(6): 979-990, 2015.*
- **Miszczuk G.S.**, Barosso I.R., Boaglio A.C., Larocca M.C., Sánchez Pozzi E.J., Roma M.G., Crocenzi F.A. *Endocytosis of canalicular transporters Abcb11 and Abcc2 induced by the cholestatic estrogen estradiol 17 β -D-glucuronide is a clathrin-dependent process.* Manuscrito en redacción, 2016.

Trabajos presentados en reuniones científicas:

- **Gisel S. Miszczuk**, Ismael R. Barosso, Andrés E. Zucchetti, Andrea C. Boaglio, José M. Pellegrino, Enrique J. Sánchez Pozzi, Marcelo G. Roma y Fernando A. Crocenzi. Cultivos primarios de hepatocitos en "sándwich de colágeno" (CPHS): un nuevo modelo *in vitro* para el estudio de alteraciones funcionales colestásicas. Trabajo presentado en el **XVII Congreso Argentino de Hepatología** Buenos Aires, 6 al 8 de junio de 2013.
- **Miszczuk G.**; Barosso I.; Zucchetti A.; Boaglio A.; Pellegrino J.; Sánchez Pozzi E.; Roma M.; Crocenzi F. Cultivos primarios de hepatocitos en "sándwich de colágeno" (CPHS): un nuevo modelo *"in vitro"* para el estudio de alteraciones de transporte canalicular inducidas por agentes colestásicos. **LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)** Mar del Plata del 20 al 23 de Noviembre 2013.
- **Miszczuk G.**; Boaglio A.; Barosso I.; Larocca C.; Sánchez Pozzi E.; Roma M.; Crocenzi F. Estradiol 17 β -D-glucurónido (E17G) induce endocitosis de Bsep y Mrp2 dependiente de clatrina en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAH). **LIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)** Mar del Plata del 19 al 22 de noviembre 2014.
- **Miszczuk, GS**; Boaglio, AC; Barosso, IR; Larocca, MC; Sánchez Pozzi, EJ; Roma, MG; Crocenzi, FA. Mecanismo de endocitosis de transportadores canaliculares en la colestasis por estradiol 17 β -d-glucurónido. Estudios en duplas aisladas de hepatocitos de rata. **XVIII Congreso Argentino de Hepatología 2015.** Buenos Aires - Argentina 4, 5 y 6 de junio de 2015.

- **Gisel S. Miszczuk**, Ismael R. Barosso, Andrea C. Boaglio, M. Cecilia Larocca, Enrique J. Sánchez Pozzi, Marcelo G. Roma and Fernando A. Crocenzi Estradiol 17 β -D-glucuronide (E17G) induces switch of the canalicular transporters Bsep and Mrp2 from *raft* to *non-raft* microdomains, followed by clathrin-dependent endocytosis. **LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)**. Mar del Plata del 16 al 19 de noviembre 2016.

ÍNDICE GENERAL

<u>ABREVIATURAS</u>	I
----------------------------------	---

<u>RESUMEN</u>	V
-----------------------------	---

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. GENERALIDADES DE VÍAS ENDOCÍTICAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	2
1.1.1. Mecanismo endocítico dependiente de clatrina.....	4
1.1.2. Endocitosis independiente de clatrina.....	4
1.1.2.1. Mecanismo endocítico asociado a caveolina	4
1.1.2.2. Endocitosis independiente de clatrina y caveolina.....	5
1.1.2.3. Mecanismos de internacionalización de grandes volúmenes de membrana	5
1.2. FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA HEPATOBILIAR.....	5
1.2.1. Generalidades.....	5
1.2.2. Secreción biliar.....	7
1.2.2.1. Sistemas de transporte de los hepatocitos.....	7
1.2.2.1.1. Regulación de la actividad de los sistemas de transporte canalicular	10
1.2.2.1.1.1. Generalidades.....	10
1.2.2.1.1.2. Tráfico vesicular y reciclado de transportadores canaliculares ante demandas fisiológicas.....	11
1.2.2.2. Microdominios de membrana canalicular y su rol en la formación de bilis.....	15
1.3. GENERALIDADES DE LA COLESTASIS	16
1.3.1. Internalización endocítica de transportadores canaliculares como mecanismo de colestasis.....	17
1.3.2. Colestasis hepatocelular inducida por drogas y hormonas.....	18
1.3.2.1. Colestasis por EE	19

1.3.2.2.	Colestasis por E17G.....	20
1.3.2.2.1.	Rol de vías de señalización intracelular en la colestasis por E17G	21
1.3.2.2.2.	Rol de vías de señalización intracelular en otros modelos de colestasis	24
1.3.3.	Estrategias terapéuticas anti-colestásicas basadas en la modulación de la localización de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2.....	25
1.4.	MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE TRANSPORTE HEPATOCANALICULAR.....	26
2.	<u>OBJETIVOS</u>	29
2.1.	OBJETIVO GENERAL.....	30
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	31
3.1.	Reactivos	32
3.2.	OBTENCIÓN DE COLÁGENO TIPO I A PARTIR DE COLA DE RATA.....	32
3.3.	ANIMALES	33
3.3.1.	Modelos <i>in vitro</i>	33
3.3.1.1.	Duplas Aisladas de Hepatocitos (DAH)	33
3.3.1.1.1.	Aislamiento, enriquecimiento y cultivo de DAH.....	33
3.3.1.1.2.	Tratamientos realizados a las DAH.....	35
3.3.1.1.3.	Estudios funcionales	36
3.3.1.1.4.	Estudios por Microscopía Confocal.....	36
3.3.1.1.4.1.	Localización de los transportadores Bsep y Mrp2.....	36
3.3.1.1.4.2.	Colocalización entre Mrp2 y proteínas involucradas en la maquinaria endocítica.....	37
3.3.1.2.	Cultivo primario de hepatocitos en sándwich de colágeno (CPHS).....	38

3.3.1.2.1.	Tratamientos en CPHS.....	39
3.3.1.2.2.	Técnicas aplicadas a CPHS.....	39
3.3.1.2.2.1.	Estudio de actividad del transportador canalicular Mrp2	39
3.3.1.2.2.2.	Estudios de microscopía confocal.....	40
3.3.1.2.2.2.1.	Evaluación de la localización de Bsep y Mrp2.....	40
3.3.1.2.2.2.2.	Estudios morfológicos: ancho y volumen canalicular.....	40
3.3.1.2.2.3.	<i>Knock-down</i> de AP2.....	40
3.3.1.2.2.3.1.	Diseño y síntesis de ARN de interferencia (ARNi) para AP2.....	40
3.3.1.2.2.3.2.	Transfección en CPHS.....	41
3.3.1.2.2.3.3.	Expresión de AP2 por <i>Western blot</i> (WB).....	41
3.3.1.2.2.3.4.	Viabilidad celular en la transfección.....	42
3.3.2.	Modelos <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	42
3.3.2.1.	Hígado aislado y perfundido de rata (HAP)	42
3.3.2.1.1.	Procedimiento quirúrgico en HAP.....	42
3.3.2.1.2.	Tratamientos realizados en HAP	42
3.3.2.1.3.	Estudios funcionales de Bsep y Mrp2.....	43
3.3.2.1.3.1.	Determinación de TC en bilis	43
3.3.2.1.3.2.	Determinación de DNP-SG en bilis.....	44
3.3.2.1.4.	Estudios de localización de transportadores canaliculares en HAP	44
3.3.2.1.5.	Fosfoproteómica y Bioinformática	45
3.3.2.1.5.1.	Extracción de proteínas y enriquecimiento en fosfoproteínas.....	45
3.3.2.1.5.2.	Marcaje, corrida en gel bidimensional (2D), análisis de imágenes y digestión de las fosfoproteínas.....	45
3.3.2.1.5.3.	Espectroscopia de masas y análisis bioinformático.....	46

3.3.2.2.	Estudios en animal entero	46
3.3.2.2.1.	Cirugía	46
3.3.2.2.2.	Obtención de membranas plasmáticas	47
3.3.2.2.2.1.	Preparación de fracciones de membrana solubles (<i>no rafts</i>) e insolubles en detergente (<i>rafts</i>)	47
3.3.2.2.3.	Análisis de la expresión de proteínas por WB	47
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
4.	<u>RESULTADOS</u>	49
4.1.	VALIDACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EN SÁNDWICH DE COLÁGENO (CPHS) COMO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES SECRETORAS BILIARES.....	50
4.1.1.	La velocidad inicial de transporte (VIT) es un parámetro sensible para detectar cambios en la actividad de Mrp2 inducidos por compuestos colestásicos y coleréticos.....	50
4.1.2.	El incremento de la VIT de GS-MF inducida por DBAMPc y la prevención mediada por el mismo de la alteración inducida por agentes colestásicos están asociados con cambios en la localización de Mrp2.....	52
4.1.3.	Los diferentes tratamientos modifican el ancho y el volumen de los pseudocanalículos en CPHS.....	54
4.1.4.	La VIT corregida en función del ancho canalicular es un buen estimador de la tasa de excreción biliar en CPHS.....	55
4.2.	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS ENDOCÍTICOS DE TRANSPORTADORES CANALICULARES EN COLESTASIS POR E17G.....	57
4.2.1.	La alteración inducida por E17G en la función de transporte de Bsep y Mrp2 depende de la integridad de clatrina, y no de caveolinas	57
4.2.2.	MDC inhibe la internalización endocítica de Bsep y Mrp2 inducida por E17G	58
4.2.3.	E17G incrementa la colocalización de Mrp2 con proteínas involucradas en la endocitosis dependiente de clatrina	60

4.2.4.	El silenciamiento de AP2 inhibe la endocitosis de Bsep y Mrp2 inducida por E17G.....	61
4.2.5.	MDC previene las alteraciones secretoras biliares y la endocitosis de Bsep y Mrp2 inducida por E17G en el HAP	63
4.2.6.	E17G induce la migración de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 de microdominios <i>raft</i> a <i>no raft</i>	65
4.3.	ESTUDIOS FOSFOPROTEÓMICOS Y BIOINFORMÁTICOS	67
5.	<u>DISCUSIÓN</u>	71
5.1.	EL CPHS ES UN MODELO <i>IN VITRO</i> POLARIZADO DE GRAN UTILIDAD PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS DE ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN SECRETORA BILIAR INDUCIDA POR COMPUESTOS COLERÉTICOS Y COLESTÁSICOS	72
5.2.	E17G INDUCE EL ENRIQUECIMIENTO DE LOS TRANSPORTADORES CANALICULARES BSEP Y MRP2 EN MICRODOMINIOS <i>NO-RAFT</i> Y LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA DE LOS MISMOS	74
5.3.	LOS ESTUDIOS FOSFOPROTEÓMICOS Y BIOINFORMÁTICOS DEMOSTRARON QUE E17G INDUCE CAMBIOS EN EL NIVEL DE FOSFORILACIÓN DE MUCHAS PROTEÍNAS HEPATOCITARIAS, ALGUNAS DE LAS CUALES PODRÍAN CUMPLIR UN ROL MECANÍSTICO EN ESTA COLESTASIS.....	83
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	86
7.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	89
8.	<u>AGRADECIMIENTOS</u>	106

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.1:** Diferentes mecanismos de endocitosis y tráfico endosomal en células de mamífero..... 1
- **Figura 1.2.** Sistemas de transporte en hepatocitos..... 8
- **Figura 1.3** Modelo propuesto para el tráfico vesicular de los transportadores Bsep y Mrp2 en hepatocitos 14
- **Figura 1.4.** Estructura química de las moléculas de estradiol, EE y E17G 18
- **Figura 1.5.** Vías de señalización involucradas en el proceso de internalización endocítica de transportadores canaliculares en la colestasis por E17G..... 20
- **Figura 3.1.** Representación esquemática de la cámara interna de un rotor de centrífuga utilizado para elutriación..... 34
- **Figura 3.2.** Análisis de imágenes para el estudio cuantitativo de la distribución de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 a lo largo de un eje transversal a la vacuola canalicular en DHA..... 36
- **Figura 4.1. A.** Imágenes representativas de transporte canalicular de GS-MF en CPHS en tiempo real. **B.** Curvas representativas de intensidad de fluorescencia canalicular asociada a GS-MF 48
- **Figura 4.2.** Efecto concentración-respuesta del transporte canalicular de GS-MF luego de la exposición a un agente colestásico..... 49
- **Figura 4.3.** Pretratamiento con DBAMPc incrementa la VIT de GS-MF y previene la disminución inducida por el E17G o TLC..... 50
- **Figura 4.4.** DBAMPc previene la internalización endocítica de Mrp2 inducida por E17G y TLC en CPHS..... 51
- **Figura 4.5.** Correlación entre ancho y volumen canalicular..... 52
- **Figura 4.6.** Corrección de las VIT de GS-MF..... 54
- **Figura 4.7.** Correlación entre los valores de VIT corregidos por ancho y volumen canalicular..... 54

- **Figura 4.8.** Efecto de inhibidores de la endocitosis clatrina o caveolina dependiente en la acumulación vacuolar canalicular (AVc) de GS-MF (sustrato de Mrp2, panel A) y de CGamF (sustrato de Bsep, panel B)..... 55
- **Figura 4.9:** La MDC previene la endocitosis de los transportadores canaliculares Mrp2 y Bsep en DAH..... 56
- **Figura 4.10:** Colocalización del transportador Mrp2 con proteínas de la vía endocítica dependiente de clatrina 57
- **Figura 4.11:** Silenciamiento de AP2 en CPHS, y su efecto sobre la internalización de transportadores canaliculares inducida por E17G 59
- **Figura 4.12:** MDC previene la alteración del flujo biliar y la excreción biliar de DNP-SG y TC inducido por E17G en HAPR..... 60
- **Figura 4.13:** MDC previene la endocitosis de Bsep y Mrp2 inducida por E17G en HAP 61
- **Figura 4.14:** Expresión de Bsep y Mrp2 en microdominios canaliculares raft y no-raft..... 63
- **Figura 4.15:** Redes de interacción arrojadas del análisis mediante IPA 66
- **Figura 5.1:** Mecanismos de endocitosis, reciclado y destino de los transportadores canaliculares en colestasis, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio 82

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 4.1.** Cambios en el ancho y volumen canalicular de los CPHS inducidos por diferentes tratamientos 52
- **Tabla 4.2.** Efectos de las correcciones por ancho y volumen canalicular en los valores de VIT en los distintos tratamientos 53
- **Tabla 4.3.** Proteínas que modifican su grado de fosforilación ante la administración *in vivo* de E17G 65

ABREVIATURAS

A

- ABC: transportadores de la superfamilia "*ATP binding cassette*"
- ANOVA: análisis de la variancia
- AC: adenilato ciclase
- AEE: endosomas tempranos, por su siglas en inglés "*apical early endosome*"
- AMP: adenosina 5' monofosfato
- AO: aniones orgánicos
- AP2: proteína adaptadora 2, por sus siglas en inglés "*adaptor protein 2*"
- AQP: aquaporina
- ARE: endosomas de reciclado, por su siglas en inglés "*apical recycling endosome*"
- ARN: ácido ribonucleico
- ASB: albúmina sérica bovina
- AVc: acumulación vacuolar canalicular

B

- BSEP/Bsep: bomba exportadora de sales biliares, por sus siglas en inglés "*bile salt export pump*"

C

- .CDNB: 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno
- CGamF: colil-glicil-amido-fluoresceína
- CMFDA: cloro metil fluoresceína di acetato
- CO: cationes orgánicos
- CPHS: cultivo primario de hepatocitos de rata en configuración sándwich
- Cy2: cianina 2
- Cy3: cianina 3

D

- DAH: duplas aisladas de hepatocitos de rata
- DAPI: diaminio fenil indol
- DBAMPc: dibutiril adenosina 5' monofosfato cíclico
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DNF-G: dinitrofenil-glutación
- DTT: ditionitrosol

E

- E17G: estradiol-17 β -D-glucurónido
- EE: etinil estradiol
- EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EGTA: ácido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-tetraacético
- ERK: del inglés "*extracellular signal-regulated kinases*"
- ERM: ezrina/radixina/moesina
- ES: error estándar

F

- FB: flujo biliar
- FBcISB: flujo biliar canalicular independiente de sales biliares
- FBDSB: flujo biliar dependiente de sales biliares

G

- GPR30: receptor asociado a proteína G 30
- GSH: glutatión reducido
- GS-MF: glutatión-metilfluoresceína
- GSSG: glutatión oxidado

H

- HAP: hígado aislado y perfundido de rata
- HPLC: cromatografía líquida de alta presión

I

- IPA: del inglés "*ingenuity pathway analysis*"

L

- LDH: lactato deshidrogenasa
- LE: endosoma tardío, del inglés "*late endosome*"

M

- MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, por sus siglas en inglés "*Mitogen-activated protein kinase*"
- MDC: monodansil cadaverina
- MDR/Mdr: proteínas de resistencia a multidroga

- MRP/Mrp: proteínas asociadas a la resistencia a multidrogas

N

- NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
- NTCP/Ntcp: polipéptido cotransportador de Na⁺ y taurocolato

O

- OATP/Oatp: polipéptido transportador de aniones orgánicos, por sus siglas en inglés "*organic anion transporting polypeptide*"
- OCT/Oct: polipéptido transportador de cationes orgánicos, por sus siglas en inglés "*organic cation transporter*"

P

- PA: fosfatasa alcalina
- PBS: solución amortiguadora de sales de fosfato
- PC: fosfatidilcolina
- PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa
- PKA: proteína quinasa A
- PKC_c: proteína quinasa C (clásicas)
- PKC_n, proteína quinasa (novel)
- PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
- PE: fosfatidiletanolamina
- PS: fosfatidilserina

R

- RE_α: receptor de estrógenos alfa

S

- SB: sales biliares
- SC: del inglés "*scrambled*"

T

- TC: taurocolato
- TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
- TLC: taurolitocolato

U

- U.A: unidades arbitrarias
- U.F.A: unidades del fluorescencia arbitrarias

V

- VIT: velocidad inicial de transporte

W

- WB: del inglés "*western blot*"

RESUMEN

El estradiol 17 β -D-glucuronido (E17G) es un metabolito endógeno del estradiol cuyos niveles plasmáticos aumentan durante el embarazo, habiendo sido postulado como responsable en la patogénesis de la colestasis intrahepática que ocurre en las mujeres susceptibles embarazadas. La administración de E17G a ratas hembras produce una colestasis dosis-dependiente, aguda y reversible, afectando las fracciones dependiente e independiente de sales biliares del flujo biliar. Nuestro grupo demostró que la alteración secretora biliar inducida por E17G en la rata es críticamente dependiente de la endocitosis de transportadores hepatocelulares canaliculares claves para la formación de bilis, como Bsep y Mrp2. Asimismo, demostramos que este fenómeno está mediado por la activación de varias vías de señalización intracelular, como aquellas dependientes de RE α -cPKC-ERK1/2, PI3K-Akt-p38MAPK y GPR30-AC-PKA. Sin embargo, el mecanismo involucrado en la endocitosis de los transportadores canaliculares es desconocido, y su esclarecimiento representa el objetivo principal de esta tesis.

En una primera etapa, y ante la necesidad de contar con un modelo hepatocelular polarizado para el estudio de estos mecanismos, hemos validado el cultivo primario de hepatocitos de rata en sándwich de colágeno (CPHS) para el estudio de drogas que afecten la formación de bilis a través de la inducción de endocitosis de transportadores canaliculares. Tratando los CPHS con los agentes colestásicos E17G y taurolitocolato, así como con el compuesto colerético y anticoléstásico DBAMPc, demostramos la utilidad de este modelo *in vitro* para detectar y cuantificar cambios en la secreción canalicular tanto de tipo colestásico como colerético, así como los cambios en la localización intracelular de transportadores canaliculares causales de dichas alteraciones funcionales.

En una segunda etapa, el uso de inhibidores específicos de las vías endocíticas dependiente de clatrina y de caveolina en duplas aisladas de hepatocitos aportó evidencia preliminar que E17G induce la endocitosis de Bsep y Mrp2 por un mecanismo dependiente de clatrina. Se obtuvo evidencia adicional de este mecanismo en hígados aislados y perfundidos, donde un inhibidor específico de esta vía endocítica, monodansilcadaverina, previno la caída en el flujo biliar y en la excreción biliar de sustratos de Bsep y Mrp2, así como la endocitosis de dichos transportadores evaluada por microscopía confocal. A modo confirmatorio de la dependencia de clatrina en la endocitosis de estos transportadores inducida por E17G, observamos que el bloqueo de esta vía mediante *knock-down* por RNA interferente de la expresión de AP2 (componente clave de la maquinaria endocítica dependiente de clatrina) en CPHS, llevó a una prevención completa de la función de transporte y de la endocitosis de Bsep y Mrp2. En forma adicional, demostramos que E17G altera la localización de membrana de estos transportadores (originalmente enriquecidos en microdominios *raft*, ricos en colesterol y caveolina), llevando a un enriquecimiento de los mismos en microdominios canaliculares ricos en clatrina (*no rafts*), desde donde puede producirse la endocitosis dependiente de la misma.

Por último, como una primera aproximación a la identificación de los blancos celulares de aquellas proteínas quinasas activadas por E17G que conducen en última instancia a la endocitosis dependiente de clatrina de los transportadores canaliculares, se realizaron estudios de fosfoproteómica para identificar proteínas que modifiquen su grado de fosforilación frente al tratamiento con este estrógeno. Esto llevó a la identificación de numerosas proteínas que incrementan su fosforilación por E17G, dejando abierta así la posibilidad de realizar experimentos tendientes a evaluar su posible rol como intermediarios entre las vías de señalización pro-colestásicas y el proceso final de endocitosis de transportadores canaliculares conducente a la alteración colestásica.

Introducción

1.1. GENERALIDADES DE VÍAS ENDOCÍTICAS EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

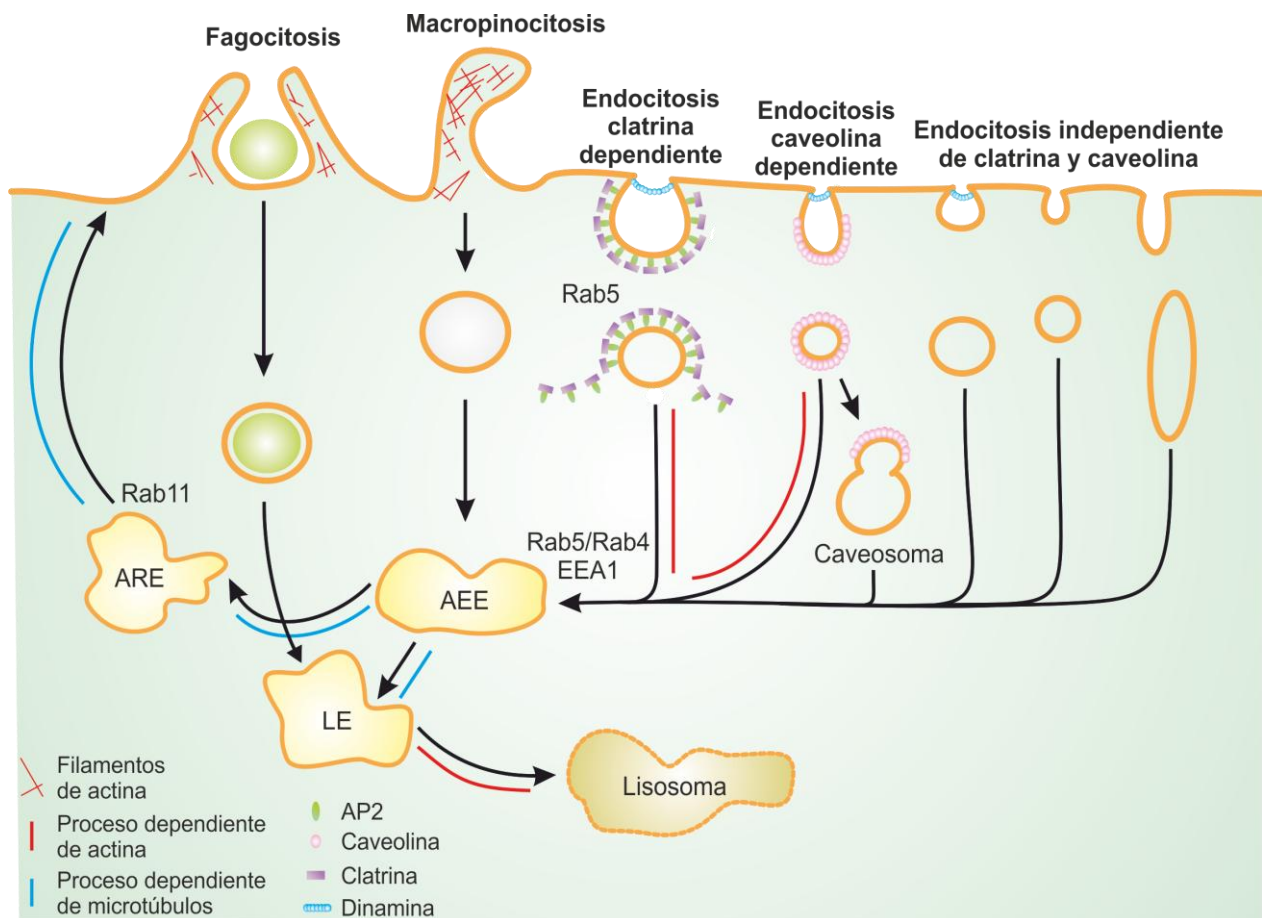


Figura 1.1: Diferentes mecanismos de endocitosis y tráfico endosomal en células de mamífero. Existen múltiples vías endocíticas en las células de mamífero; por ejemplo, dependiente de clatrina, dependiente de caveolina e independiente de clatrina y caveolina. La carga endocitada es dirigida a endosomas donde se clasifica para su direccionamiento a compartimientos de reciclado o hacia otros compartimientos (cuerpos multivesiculares o lisosomas para degradación). En la endocitosis mediada por clatrina, la carga es destinada a endosomas bien caracterizados, en la vía dependiente de caveolina sus cargas no están bien definidas, mientras que se requiere mayor caracterización de las otras vías, las cuales pueden ser tubulares o vesiculares. Abreviaturas: AEE (endosoma apical temprano, del inglés "apical early endosome"), LE (endosoma tardío, del inglés "late endosome"), ARE (endosoma apical de reciclado, del inglés "apical recycling endosome").

La endocitosis es un proceso por el cual la célula introduce moléculas o fluidos englobándolas en una invaginación de la membrana plasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la misma para incorporarse al citoplasma (Figura 1.1). En células simples no polarizadas, las proteínas de membranas y fluidos internalizados son llevados primariamente a compartimientos Rab5 GTPasa positivos y endosomas tempranos antígeno-1 (EEA-1) positivos¹, conocidos como AEE, por su siglas en inglés "apical early endosomes". Luego, mientras que la porción vacuolar de los endosomas tempranos y su fluido asociado maduran a endosomas tardíos para ir a lisosomas, la membrana rica en porciones tubulares de los endosomas tempranos llevan la carga a un endosoma de reciclado (ARE por su siglas en inglés "apical recycling endosome"), donde las proteínas de membrana pueden ser devueltas a la

membrana².

Las células polarizadas tienen mecanismos más complejos de internalización, ya que pueden hacerlo desde la membrana basolateral o desde la membrana apical³, pudiendo ser esta internalización dependiente o independiente de clatrina. Las vesículas endocíticas originadas por este tipo de vías están cubiertas por diferentes tipos de proteínas, las cuales reconocen determinantes estructurales en las diversas cargas. Sin embargo, además de la propia carga, otros determinantes, como la curvatura de la membrana, la composición de lípidos y Rab GTPasas, contribuyen a garantizar el reclutamiento específico de proteínas lo cual posibilita la existencia de los diferentes tipos de membranas intracelulares⁴.

Los destinos post-endocíticos pueden ser variables, pudiendo estas vesículas ser recicladas, sufrir transcitosis o ir a endosomas tardíos y luego a lisosomas⁵, sirviéndose de "rieles" de tubulina o actina para dichos movimientos (Figura 1.1). Las moléculas encargadas de asegurar que las cargas son llevadas correctamente a sus destinos son las Rab GTPasas, una gran familia de GTPasas pequeñas las cuales controlan el cierre, la motilidad, la inmovilidad y la fusión de las vesículas mediante el reclutamiento de proteínas efectoras, tales como proteínas adaptadoras, proteínas inmovilizadoras, quinasas, fosfatasas y proteínas motoras (por ej. dineína y cinesina para los microtúbulos, o miosina para los filamentos de actina). De este modo, se asegura la regulación espacial y temporal del tráfico de vesículas.

En los seres humanos hay más de 60 miembros de la familia Rab que se localizan en distintos compartimientos membranosos intracelulares^{6,7}. No obstante, se han observado tres poblaciones principales: una que contiene sólo Rab5, una que contiene Rab4 y Rab5 y una tercera que contiene Rab4 y Rab11. Hay evidencias de que Rab5 es esencial para la fusión de la vesícula endocítica con endosomas tempranos y que, por otro lado, Rab11 está presente en endosomas de reciclado, interactuando con componentes del citoesqueleto como la miosina V⁴.

Hay muchas vías endocíticas distintas que conviven en células de mamíferos. Ciertas vías se definen mejor por sus dependencias diferenciales de ciertos lípidos y proteínas, incluyendo clatrina, caveolina-1, flotilina-1, GRAF-1 (por sus siglas en inglés para "GTPase Regulator Associated with Focal Adhesion Kinase-1"), quinasas, proteínas G pequeñas, actina y dinamina. Cualquier mecanismo endocítico requiere la acción coordinada de proteínas que son capaces de deformar la membrana plasmática para producir intermediarios altamente curvados y proteínas que pueden inducir la escisión de éstos de la membrana plasmática. Éstas incluyen proteínas de dominio ENTH (por sus siglas en inglés para "*Epsin N-terminal homology*"), proteínas de la superfamilia BAR (por sus siglas en inglés para "*Bin/amphiphysin/Rvs*"), proteínas G pequeñas de la familia ARF (por sus siglas en inglés para "*ADP-ribosylation factor*"), proteínas que nuclean

la polimerización de actina y proteínas de la superfamilia dinamina.

1.1.1. Mecanismo endocítico dependiente de clatrina

El mecanismo de endocitosis mejor dilucidado en células eucariotas involucra la formación de vesículas revestidas con clatrina, proteína que interactúa directamente con lípidos o proteínas de la membrana⁸. Ciertos adaptadores son necesarios para unir el revestimiento de clatrina a la membrana; el proceso implica la formación de un dominio putativo FCH, el FCHO (por sus siglas en inglés para "*Fer/Cip4 homology only*"), complejo de iniciación que madura a través del complejo adaptador 2 (AP2, por sus siglas en inglés para "*adaptor protein-2*"). AP2 es una proteína heterodimérica, y uno de los adaptadores mejor estudiados, está compuesto por 4 subunidades diferentes: α , β 2, σ 2 y μ 2^{9,10}, teniendo éstas una participación crítica en el inicio de la endocitosis por su rol en el reclutamiento de las moléculas de clatrina hacia la membrana. Motivos basados en dileucina y tirosina en la parte citoplasmática de ciertas moléculas transmembrana son reconocidos por AP2, nucleando así las moléculas de clatrina en la zona^{11,12}.

La polimerización de clatrina, junto con la acción de otras proteínas, ayuda en la formación y la constricción del cuello de la vesícula, ayudando a traer a las membranas que rodean el cuello en estrecha aposición. La proteína dinamina es una GTPasa que escinde la vesícula de la membrana, formando un polímero helicoidal alrededor de este cuello constreñido y, tras la hidrólisis de GTP, mediando la fisión de la vesícula¹³ (Figura 1.1). Hay evidencias de que vesículas revestidas de clatrina contienen Rab5, y que la misma cumple un rol previo en la formación de la vesícula promoviendo la desfosforilación de la subunidad μ 2 de AP2¹⁴.

1.1.2. Endocitosis independiente de clatrina

1.1.2.1. Mecanismo endocítico asociado a caveolina

Las caveolas son invaginaciones de la membrana que están presentes en la mayoría de las células, se forman en dominios especializados de la membrana plasmática ricos en colesterol, glicoesfingolípidos y proteínas unidas por GPI (glico fosfatidil inositol), denominados *rafts*, siendo por ello la selección del cargo determinada por la composición lipídica de la membrana¹⁵.

La caveolina es la principal proteína estructural de las caveolas. Hay tres isoformas de caveolina en mamíferos: caveolina-3, específica de tejido muscular, y caveolina-1 y -2 que se encuentran en las células no musculares, exceptuando neuronas y leucocitos que al parecer carecen de caveolina. Caveolina-1 es necesaria, y tal vez suficiente, para la biogénesis caveolar, mientras que caveolina-2 no parece ser necesaria para la formación caveolar pero probablemente juega un rol importante en algunas estructuras. Caveolina-1 es capaz de formar

oligómeros de orden superior, y se une al colesterol y ácidos grasos, que estabilizan la formación de los oligómeros^{16,17}. La dinamina es reclutada en las caveolas, y participa en la internalización de estas estructuras (Figura 1.1). Este proceso requiere el reclutamiento de citoesqueleto de actina, la activación de la familia de tirosina quinanas Src y la activación de proteína quinasa C (PKC)¹⁸⁻²¹.

1.1.2.2. Endocitosis independiente de clatrina y caveolina

Se han descrito otras rutas independientes de clatrina y caveolina, que se han asociado a *rafts* y que difieren de la ruta caveolar en que no existe relación entre las vesículas y la caveolina-1; en algunos casos no participa dinamina, dependen de las GTPasas tipo RhoA o cdc42 (proteínas GPI) y no hay evidencias de que dependan de la actividad de PKC²²⁻²⁵. Este tipo de endocitosis requieren vías endocíticas específicas, la cinética es distinta a la de las proteínas transmembrana y puede pasar por alto compartimentos Rab5-positivos (AEE).

1.1.2.3. Mecanismos de internacionalización de grandes volúmenes de membrana

Algunos tipos celulares son capaces de internalizar grandes cantidades de fluidos vía macropinocitosis, o bien grandes partículas por fagocitosis². La macropinocitosis depende del colesterol, que es necesario para el ensamblaje de Rac1 activa a estos sitios²⁶. Este proceso puede ser estimulado por la activación de los receptores, y es microdominio dependiente.

Los macrófagos y osteoclastos producen endógenamente podosomas²⁷, que son extensiones de membrana ricas en actina implicadas en las primeras etapas de la adhesión célula-matriz, poseyendo adhesión focal a la Src tirosina quinasa, Arp2/3 (acrónimo inglés para "*actin-related proteins 2/3*") y proteínas de regulación de actina. Células fagocíticas profesionales, como macrófagos, monocitos y neutrófilos, dependen de proteínas G pequeñas para internalizar partículas opsonizadas de manera independiente de clatrina (Figura 1.1).

1.2. FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA HEPATOBILIAR

1.2.1. Generalidades

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo, localizado en la región abdominal correspondiente al hipocondrio derecho, y representa un 3 % del peso total de un adulto. Recibe el 25 % del gasto cardíaco a través de una doble irrigación suministrada por la vena porta y la arteria hepática. La arteria hepática contiene la sangre oxigenada; la irrigación portal aporta el 75 % del flujo sanguíneo, y contiene sangre poco oxigenada y rica en nutrientes

proveniente del tracto gastrointestinal y del bazo.

Su interposición entre el tracto digestivo y el resto del organismo le confiere una ubicación preferencial para procesar grandes cantidades de aminoácidos, azúcares, lípidos, vitaminas y xenobióticos que ingresan por vía oral, siendo por lo tanto un órgano clave en los procesos de captación, depósito, metabolización y distribución en sangre y bilis de numerosos sustratos absorbidos en el intestino. Otra función crucial del hígado es la formación de bilis, la cual es esencial para la digestión y absorción normal de lípidos desde la luz intestinal, y es una vía de excreción para una gran variedad de compuestos tales como bilirrubina, colesterol, hormonas y xenobióticos²⁸. En su composición se destacan las sales biliares (SB), esenciales para la metabolización de lípidos en el proceso digestivo.

La célula parenquimatosa del hígado es el hepatocito, una célula epitelial polarizada con forma poliédrica. Su membrana plasmática puede dividirse en dos dominios: *i*) la membrana basolateral o sinusoidal, que relaciona al hepatocito con el espacio de Disse (intersticio) y los capilares sinusoides allí presentes, y *ii*) la membrana apical, también llamada canalicular, que junto a la membrana homónima del hepatocito vecino constituyen el canaliculo biliar, primer conducto de la vía biliar. Estos dominios de membrana expresan distintos sistemas de transporte, los cuales juegan un rol clave en el transporte vectorial de solutos y agua desde la sangre sinusoidal hasta la bilis, contribuyendo así a la formación de la misma y a la excreción biliar de diversas sustancias²⁹ (Figura 1.2). El transporte requiere, además, que los espacios plasmáticos y canalicular no estén libremente conectados; ya que se necesita la conservación de un espacio hermético luminal donde tenga lugar la formación de gradientes osmóticos, dado la naturaleza osmótica del proceso de formación de bilis. Estas propiedades dependen fundamentalmente de las uniones estrechas entre los hepatocitos vecinos, conformando la *zonula occludens*, que separa al canaliculo biliar del espacio de Disse³⁰.

Las SB son un grupo de compuestos derivados del colesterol que son sintetizados en los hepatocitos y excretados a bilis. La mayoría de las SB son reabsorbidas por el intestino delgado, y transportadas nuevamente al hígado por la circulación portal³¹. Las SB primarias son conjugadas con taurina o glicina. Tanto el carboxilo de la glicina como el grupo sulfato de la taurina están ionizados a pH fisiológico, por lo que estas formas conjugadas suelen presentarse en circulación en su forma ionizada y no protonada. Las SB ionizadas son impermeables a las membranas, reduciendo así su citotoxicidad en comparación a las especies no conjugadas.

La acumulación de grandes cantidades de SB hidrofóbicas es tóxica para los hepatocitos y colangiocitos ya que son detergentes, estando por tanto su síntesis, transporte y metabolismo estrictamente regulados³². Las SB alcanzan concentraciones en el canaliculo muy por encima de

la concentración micelar crítica, por lo que predomina el estado de multiagregación micelar y no el monomérico. Esto reduce su citotoxicidad, ya que es su forma monomérica la que puede dar lugar a la solubilización de las membranas, seguido de la muerte celular³³. Además, esta toxicidad puede llevar a la desestabilización de las uniones estrechas de las membranas de los pequeños conductos biliares, lo que conduce a una fuga de bilis, y a una respuesta inflamatoria subsiguiente³⁴. Un mecanismo de protección es la excreción organizada de fosfolípidos para formar micelas mixtas con las SB monoméricas, mediada por ABCB4 (MDR3) en los seres humanos, o la homóloga Abcb4 (Mdr2) en ratones³⁵.

1.2.2. Secreción biliar

La formación de la bilis es un proceso osmótico, cuya fuerza impulsora está dada por la secreción activa de compuestos osmóticamente activos al canalículo biliar³⁶. Para que un soluto sea capaz de promover el transporte primario de agua desde la sangre sinusoidal a la luz canalicular, éste debe ser secretado activamente y concentrado en el espacio canalicular. El transporte de agua transcelular es el más trascendente^{37,38,39}, y se encontraría facilitado por la existencia de canales de agua (aquaporinas, AQP) en los dominios de membrana basolateral y canalicular^{37,39,40}.

De los solutos presentes en la bilis, sólo tres cumplen estos requisitos: las SB, el HCO_3^- y el glutatión. Las SB contribuyen a la fracción del flujo biliar (FB) "dependiente de SB" (FBDSB), mientras que el HCO_3^- y el glutatión son responsables, en gran parte, de la formación de la fracción "canalicular independiente de SB" (FBclSB). Esta bilis primaria secretada a nivel canalicular es luego modificada por los colangiocitos durante su tránsito a través de los conductos biliares. Esta modificación va a ser la resultante de un balance entre la secreción de un fluido rico en HCO_3^- , estimulada por secretina, y la reabsorción constante y obligatoria de agua y electrolitos, dando lugar a la producción de un FB ductular, cuya magnitud depende del grado de ayuno, ya que éste influye en los niveles de secretina circulante (mayor en condiciones posprandiales)^{37,41}.

1.2.2.1. Sistemas de transporte de los hepatocitos

Los transportadores son proteínas transmembrana que intervienen en la translocación de sustancias químicas hacia y desde el interior celular mediante mecanismos activos y pasivos. La secreción biliar es un proceso fisiológico complejo que implica el pasaje de sustancias desde el plasma hasta la bilis, en donde participan transportadores que se hallan en las membranas basolateral y canalicular (Figura 1.2).

Los transportadores de aniones orgánicos OATPs/Oatps (acrónimo inglés para "*organic*

ABCC2/Abcc2)^{49,50}. Este transportador, perteneciente también a la familia de transportadores ABC, también media la excreción biliar de muchos otros aniones orgánicos, incluyendo conjugados con glutatión (por ej., leucotrieno C4, 4-hidroxi-nonal) o con ácido glucurónico (por ej., bilirrubina y estrógenos glucuronizados), así como glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH)⁵¹. Tanto GSSG como GSH son los principales determinantes del FBcISB⁵². Mrp2 tiene una masa molecular de 200 kDa, con múltiples dominios transmembrana y dominios conservados de unión e hidrólisis de ATP^{28,53}. Los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 son los que cumplen una función más relevante en la formación de la bilis^{45,54,55}.

El transporte canalicular de HCO_3^- es mediado por el intercambiador aniónico de Cl^- / HCO_3^- AE2 (acrónimo inglés para "*anion exchanger 2*"), también llamado Slc4a2. Este transportador pertenece a la familia de intercambiadores aniónicos independientes de Na^+ , y funciona regulando el pH intracelular cuando los hepatocitos son expuestos a un medio alcalino. Además, AE2 participa en la generación del FB, dado que la excreción de HCO_3^- es una fuerza impulsora primaria adicional del FBcISB^{53,56}.

La permeabilidad al agua está determinada por AQPs. En mamíferos, se han descrito 13 AQPs, de las cuales se demostró que se expresan en hepatocitos AQP0, AQP8, AQP9 y AQP11. AQP8 y AQP9 son las de mayor relevancia en la determinación del FB, localizándose la AQP9 en la membrana basolateral y la AQP8 en la canalicular^{39,57-59}. AQP8 tendría un rol primordial en la formación de la bilis, facilitando el flujo osmótico de agua^{37,58,60-64}.

Las proteínas ABCB/Abcb (MDRs/Mdrs), grupo al cual pertenece el transportador Bsep, fueron originalmente descritas en líneas celulares cancerosas a las cuales les conferían resistencia a agentes quimioterapéuticos. Además de Bsep, tres productos génicos adicionales han sido identificados en roedores: Abcb1a (Mdr1a), Abcb1b (Mdr1b) y Abcb4 (Mdr2), mientras que dos de ellos han sido identificados en humanos ABCB1 (MDR1) y ABCB4 (MDR3)⁶⁵.

La función de ABCB1/Abcb1 es facilitar el eflujo de una gran variedad de cationes voluminosos anfífilos, junto con otros compuestos hidrofóbicos, como metabolitos, toxinas endógenas y exógenas, hormonas esteroideas, péptidos hidrofóbicos y algunos glicolípidos⁶⁵.

Por su parte, ABCB4/Abcb4 (MDR3, Mdr2 en roedores) es un transportador de fosfolípidos que contribuye a mantener la asimetría de los hemidominios de la membrana canalicular, más pronunciada en esa membrana que en cualquier otra; dicha asimetría es esencial para la fisiología normal del hepatocito, ya que ésta le confiere resistencia contra las altas concentraciones de SB detergentes en la luz canalicular⁶⁶. En efecto, existe una alta predominancia de colesterol y de fosfatidilcolina (PC) en la hemimembrana canalicular externa, lo cual la hace más resistente al efecto solubilizador de las SB tensoactivas presentes en la bilis,

mientras que la hemimembrana interna es rica en aminofosfolípidos, tales como fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE); de haber aminofosfolípidos en la hemimembrana externa, ésta sería mucho más fluida y menos resistente al efecto solubilizador de las SB.

Esta asimetría se debe a la presencia en la membrana canalicular de "flipasas" (translocador hacia capa lipídica interna) y "flopasas" (translocador hacia capa lipídica externa) con selectividad diferencial para los distintos lípidos (PC y colesterol para las "flopasas" y PS y PE para "flipasas"). Incidentalmente, las "flopasas" contribuyen al transporte de lípidos a bilis, ya que al traslocarlos a la capa lipídica externa, pueden ser removidos por el efecto detergente de las SB; esto explica la composición similar de lípidos entre la cara lipídica externa y la bilis⁶⁷.

El transporte activo de fosfatidilcolina (PC) a través de la membrana canalicular es mediado por MDR3/Mdr2; esta proteína es una "flopasa" que transloca PC de la membrana interna a la externa de la membrana canalicular ("*flop*"), desde donde es extraída hacia la luz canalicular por la solubilización mediada por SB. De manera similar, la proteína heterodimérica formada por ABCG5(Abcg5)/ABCG8(Abcg8), ambas pertenecientes a la subfamilia G de transportadores ABC, facilita la excreción biliar de colesterol, translocándolo desde la cara interna a la cara externa de la membrana canalicular y facilitando luego su extrusión hacia el lumen canalicular, para que, en conjunto con la PC y las SB, formen micelas mixtas en bilis; la formación de micelas mixtas permite que las SB vean reducida su concentración monomérica efectiva en la luz canalicular, y resulten menos citotóxicas⁶⁸⁻⁷⁰. Por otro lado, cualquier aminofosfolípido (PS o PE), que llega a la cara externa, se transloca hacia la interna ("*flip*") por FIC1 (ATP8B1/Atp8b1), manteniendo de esta manera la cara externa en su estado "resistente a detergentes".

1.2.2.1.1. Regulación de la actividad de los sistemas de transporte canalicular

1.2.2.1.1.1. Generalidades

La regulación de la actividad de los sistemas de transporte canalicular es de vital importancia para el mantenimiento de una adecuada tasa secretora biliar. La función de los transportadores de tipo ABC puede regularse a tres niveles diferentes: transcripcional, post-transcripcional y post-traduccional; produciendo cambios que se manifiestan en el término de días, horas o minutos, respectivamente. La regulación de la actividad a largo plazo ocurre por cambios en el balance entre síntesis y degradación de los mismos. La regulación post traducciona puede implicar la internalización de los transportadores canaliculares de su dominio de membrana, pudiendo ser parte de un mecanismo fisiológico destinado a regular rápidamente la densidad de los transportadores canaliculares en la membrana plasmática, o al

estar sostenido en el tiempo por causas patológicas, explicando las disminuciones post-transcripcionales en los niveles de transportadores en ciertas patologías colestásicas producto de la posterior degradación lisosomal³⁰. Finalmente, cambios en el estado de fosforilación de los transportadores podrían regular su actividad intrínseca, aun cuando estén apropiadamente localizados en su dominio de membrana.

1.2.2.1.1.2. Tráfico vesicular y reciclado de transportadores canaliculares ante demandas fisiológicas

El reciclado de transportadores desde y hacia la membrana canalicular en respuesta a estímulos específicos representa un mecanismo clave por el cual puede modularse la densidad de los mismos y, por lo tanto la $V_{m\acute{a}x}$ de los procesos secretorios asociados a ellos. Estos mecanismos regulatorios tienen lugar en el orden de minutos, y podrían ser altamente efectivos para modular la secreción canalicular ante diferentes demandas fisiológicas, ya que los Km para el transporte de aniones y cationes orgánicos medidos en vesículas de membrana canalicular sugieren que estos sistemas de transporte estarían trabajando, en situación basal, en condiciones cercanas a la saturación⁵⁵.

Poco se conoce acerca de los eventos moleculares que gobiernan el tráfico vesicular de los transportadores ABC. Estudios recientes realizados por Lam y col.⁷¹ sugieren que, en condiciones fisiológicas, se produce una internalización endocítica constitutiva de Bsep mediada por vesículas revestidas de clatrina, y que en su dominio C-terminal posee una secuencia conservada por todos los transportadores ABC, la cual sería clave en esta internalización constitutiva. Esto permite especular que la endocitosis, no solo de Bsep, sino de otros transportadores ABC, se llevaría a cabo por un mecanismo similar. Adicionalmente, estudios de inmunomarcaje, co-inmunoprecipitación, ensayos de pull-down y análisis de imágenes en tiempo real confirmaron que AP2 interacciona con Bsep en la membrana canalicular a través de un motivo de tirosina en su dominio C-terminal y media la internalización del mismo⁷².

En células Madin-Darby canine kidney (MDCK), la expresión dominante negativa de Eps15, componente de la maquinaria endocítica dependiente de clatrina, aumenta la expresión apical de Bsep, sugiriendo que un mecanismo dependiente de clatrina juega un rol importante en la regulación de Bsep en la superficie de celular. Además, este transportador fue encontrado en fracciones vesiculares enriquecidas en clatrina luego del fraccionamiento de membrana en hepatocitos de rata⁷³.

In vivo, Hayashi y col. demostraron que el tratamiento con 4-fenil butirato (4PBA), el cual disminuye significativamente la expresión de α y μ 2-adaptina, componentes proteicos de

AP2, inhibe la internalización y la subsecuente degradación de Bsep en hígados de rata y humanos⁷⁴. A su vez, se demostró *in vitro* mediante el análisis de 3xFlag-BSEP humano expresadas en células HeLa y en cultivo de hepatocitos humanos en sándwich de colágeno que, al reducir la expresión de AP2 por ARN de interferencia, se inhibe la internalización de Bsep y aumenta su expresión en la superficie canalicular y su función de transporte⁷⁵. Asimismo, Aida y col., utilizando células Flp-In T-Rex 293 (línea estable embrional de riñón humano), demostraron que el tratamiento con 4PBA retrasa la degradación de Bsep y Mrp2 por desubiquitinación. También observaron que la internalización de Bsep era sensible al tratamiento con clorpromacina (inhibidor de la vía dependiente de clatrina), sugiriendo que la ubiquitinación juega un papel en su internalización constitutiva mediada por clatrina⁷⁶.

Aunque el mecanismo molecular subyacente de la internalización endocítica fisiológica de Mrp2 queda por esclarecerse, se ha sugerido a partir de experimentos realizados en células Flp-In T-Rex 293 que la escisión de vesículas que contienen Mrp2 desde la membrana canalicular estaría mediada por dinamina (componente esencial de la endocitosis dependiente e independiente de clatrina, ver ítem 1.1), pero no por clatrina⁷⁶. Un paso previo a dicha escisión podría involucrar a radixina⁷⁶, una proteína de la familia ezrina/radixina/moesina (ERM) que estabiliza varias proteínas de la membrana canalicular, tales como Mrp2, Bsep, Mdr1 y DPPIV, a su dominio de membrana canalicular, como lo demuestra la endocitosis que sufren esas proteínas en CPHS a los que se les silenció radixina⁷⁷; la interacción de Mrp2 con radixina involucra la unión de su dominio PDZ a la proteína adaptadora NHERF-1/EBP50 (por sus acrónimos en inglés "*Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor/ERM Binding Protein 50*"), la cual se une a radixina, y esta última al citoesqueleto de actina⁷⁸. Bsep también se une fuertemente a radixina, pero lo hace directamente, interaccionando con la porción N-terminal de esta proteína (radixina₁₋₃₁₈)⁷⁹.

Los compartimientos endosomales de destino de los transportadores ABC una vez endocitados de la membrana canalicular no están aun completamente caracterizados. Se ha demostrado la existencia de un compartimiento subapical al cual trafican los transportadores endocitados, sobre la base de las siguientes evidencias experimentales: 1) mediante microscopía inmunoelectrónica se demostró que, en los hepatocitos de rata, Bsep puede ser detectada en estructuras vacuolares cercanas a la membrana apical⁴⁷; esta localización pericanalicular pudo demostrarse también para Mrp2, Bsep y Abcb1 mediante tinción inmunofluorescente en el modelo de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAH)⁸⁰; 2) la administración de 35S-metionina *in vivo*, seguida del seguimiento tardío de su incorporación a proteínas, reveló que Bsep se distribuye tanto en la membrana canalicular como en una fracción endosomal combinada; 3) el reciclado entre la membrana canalicular y los endosomas subapicales pudo ser

directamente visualizado para Bsep⁸¹ y Mrp2⁸².

La naturaleza de este compartimiento subapical se encuentra en debate. Estudios realizados por Wakabayashi y col.⁸³ en células WIF-B9, una línea celular híbrida de hepatoma/fibroblastoma humano con polaridad secretora similar al hepatocito, demostraron que Bsep se localiza en la membrana canalicular y en estructuras túbulo-vesiculares adyacentes al centro de organización de microtúbulos o ampliamente distribuidas en el citoplasma, estructuras en las cuales se encuentra colocalizando con Rab11, marcador de ARE. Mediante estudios de “*photobleaching*” mostraron que las moléculas de Bsep residen en la membrana canalicular solo transitoriamente antes de intercambiarse con este compartimiento endosomal. Además, al tratar las células con inhibidores de microtúbulos, tanto el tráfico endocítico desde la membrana canalicular hasta el ARE como el exocítico entre el ARE y la membrana canalicular se ven interrumpidos, siendo por lo tanto el reciclado un proceso dependiente de microtúbulos.

Por otro lado, al tratar las células con disruptores de actina, Bsep tampoco traficó hasta el ARE, indicando que el tráfico entre la membrana canalicular y el ARE es también dependiente de la integridad de actina⁸³. Dado que la distancia a la cual se encuentra el ARE de la membrana canalicular es lo suficientemente grande como para requerir de un transporte mediado por microtúbulos, la dependencia de actina sugiere fuertemente que debe existir un compartimiento endosomal intermediario entre la membrana canalicular y el ARE que se encontraría muy próximo a la membrana; Bsep trafficaría a este compartimiento vía rieles de actina, ya que éstos son capaces de mediar procesos de tráfico vesicular de corta distancia, por poseer la proteína motora miosina⁸⁴. Un compartimiento con estas características que ha sido caracterizado en muchas líneas celulares, incluido los hepatocitos, es el AEE⁸⁵. Si bien no hay evidencia directa del rol de los AEE como compartimentos partícipes en la vía endocítica de Bsep y Mrp2, el AEE es el primer compartimiento endosomal en recibir proteínas internalizadas desde la membrana apical de una manera independiente de microtúbulos⁸⁶. A este proceso endocítico, le seguiría una etapa exocítica que comprendería la transcitosis desde los AEE hacia los ARE de manera dependiente de microtúbulos⁵, y una posterior reinsertión también dependiente de microtúbulos hacia la membrana canalicular, una vez que la demanda ha sido satisfecha⁸⁷ (Figura 1.3). Esta teoría compatibilizaría la evidencia antes descrita de una endocitosis de transportadores canaliculares dependiente de clatrina (la cual es dependiente de actina e independiente de microtúbulos) con el hallazgo de Wakabayashi y col. de la dependencia de microtúbulos para que los transportadores lleguen al ARE, y para que se reinserten en la membrana canalicular cuando la demanda así lo requiera. Este posible mecanismo es sustentado además por las siguientes evidencias: 1) Bsep y Mrp2 colocalizan con Rab11, un marcador de ARE⁸⁶, 2) Mrp2 y Bsep colocalizan en las mismas vesículas con la proteína motora de microtúbulos dineína y con el receptor polimérico de inmunoglobulina

(plgR), una proteína de superficie que experimenta transcitosis desde la membrana basolateral hacia la membrana apical a través de los ARE⁸⁰, 3) la inserción de Bsep desde los ARE hacia la membrana canalicular es un proceso dependiente de microtúbulos⁸³, y 4) los ARE están interconectados de una manera dependiente de microtúbulos con los AEE⁵.

Otra posibilidad es que, mediante un proceso de endocitosis, los transportadores localizados en el AEE puedan ir, vía endosomas tardíos, hacia degradación lisosomal⁴⁵ como se muestra en la Figura 1.3. Esta vía degradativa sería mínima en condiciones fisiológicas, como lo sugiere el elevado tiempo de vida media de los transportadores canaliculares, que puede llegar hasta 5 días.⁸⁸ Esto es debido a que, una vez transportados al ARE, los transportadores no pueden sufrir desde allí degradación lisosomal.⁸⁹ Sin embargo, la vía degradativa podría verse exacerbada en situaciones de internalización masiva y sostenida de los transportadores en condiciones patológicas, como por ejemplo en colestasis (ver más adelante, ítem 1.3.1).

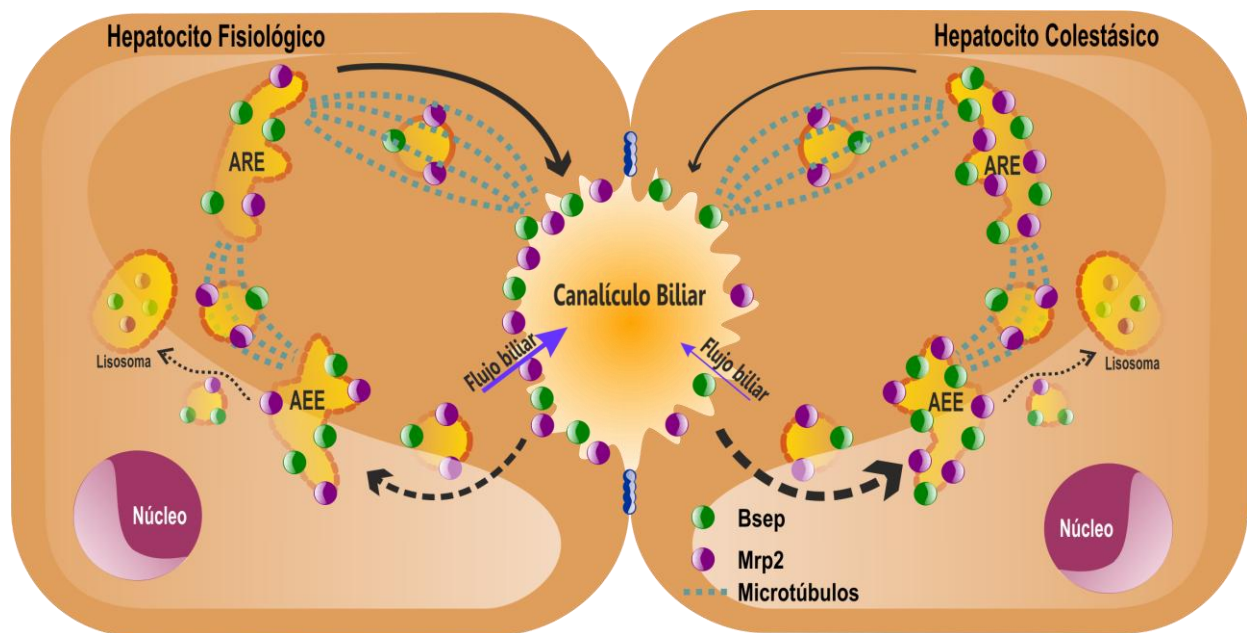


Figura 1.3: Modelo propuesto para el tráfico vesicular de los transportadores Bsep y Mrp2 en hepatocitos. Esquematación del proceso de reciclado fisiológico de transportadores canaliculares entre la membrana canalicular y los compartimentos endosomales tempranos (AEE) y los subapicales de reciclado (ARE) (hepatocito izquierdo). La primera estación involucrada es la endocitosis apical independiente de microtúbulos hacia AEE, seguido de transcitosis desde los AEE hacia los ARE, proceso dependiente de microtúbulos, donde se produce una acumulación de los transportadores y desde donde se pueden reinsertar también a través de microtúbulos en la membrana apical, proceso que puede incrementarse ante una demanda de incremento del transporte de solutos a nivel de dicho dominio de membrana. Por otro lado, un aumento en la endocitosis de los transportadores canaliculares hacia compartimentos que podrían llegar a ser AEE, con la subsiguiente acumulación en los ARE es crucial en la patogénesis de procesos colestásicos (hepatocito derecho). Alternativamente, desde los AEE pueden tomar una posible vía de degradación hacia lisosomas. Las flechas punteadas indican vías postuladas.

1.2.2.2. Microdominios de membrana canalicular y su rol en la formación de bilis

Los detergentes como el Tritón X-100 pueden solubilizar diferencialmente microdominios de membrana con diferentes composiciones lipídicas y proteicas^{90,91}. Los microdominios de membrana insolubles en Triton-X100, también llamados balsas lipídicas o *rafts*, son regiones enriquecidas en colesterol y esfingolípidos dispuestos en una forma ordenada y apretada. La importancia de esta disposición lipídica, y la afinidad de ciertas proteínas por ciertos lípidos o dominios específicos, juegan un papel fisiológico importante en procesos tan diversos como la señalización en la superficie celular, adhesión y motilidad celular, y la clasificación intracelular⁹¹⁻⁹³. Estas balsas lipídicas, además, están enriquecidas en caveolina, proteína que interactúa con la esfingomielina, y en la membrana canalicular de los hepatocitos hay evidencias de que estos microdominios *raft* también contienen AQP8 (canalicular) y AQP9 (basolateral), Mrp2, Bsep y AE2^{94,95}.

Moreno y col.⁹⁶ han postulado que las caveolinas desempeñarían un papel importante en el control de los niveles de colesterol HDL en plasma, así como en el transporte de SB. Asimismo, han descrito un aumento significativo tanto en el FB como en la secreción de los 3 principales lípidos biliares (SB, colesterol y fosfolípidos) en ratones que sobreexpresan caveolina 1 o 2. Esta sobreexpresión induce una mayor expresión de Bsep en la membrana canalicular, aumentando la velocidad secretoria máxima de SB. Es decir, que los microdominios *raft* podrían actuar como estabilizadores de los transportadores de membrana, favoreciendo la secreción biliar de colesterol, fosfolípidos y SB⁹⁶.

Además, Guyot y col. han demostrado que la secreción de SB y lípidos hacia el canalículo biliar es un proceso complejo que implica coordinar las acciones de varios transportadores, y que requiere de una composición lipídica específica de la membrana canalicular del hígado⁹⁷. Esta composición específica protege a la membrana canalicular de la acción detergente asociada a la alta concentración de SB en el canalículo, presentando a estos microdominios como elementos de protección frente a la toxicidad de las SB, siendo el colesterol un factor crucial en esta resistencia⁹⁸.

Por su parte, los microdominios *no raft*, son zonas de la membrana con bajo contenido en colesterol y enriquecidas en clatrina⁹⁹, donde tanto las proteínas integrales de la misma como los transportadores canaliculares están más expuestos, y podrían ser removidos por la acción detergente de las SB presentes en la luz canalicular, arrastrándolos hacia la bilis. Accatino y col. han reportado que, en la colestasis inducida por la obstrucción completa del conducto biliar en la rata, se produce un aumento marcado en la secreción biliar de la fosfatasa alcalina

(proteína integral de la membrana canalicular). Un posible mecanismo propuesto para la liberación de esta enzima a bilis es su remoción de la membrana por la acción detergente de las SB^{100,101}. A partir de esto, se podría especular que, a los transportadores canaliculares como Bsep y Mrp2, pueda ocurrirles lo mismo al cambiar de microdominio, como fuera reportado para Bsep en la colestasis inducida por el estrógeno sintético etinilestradiol (EE)⁹⁴. Sin embargo, este mismo grupo también ha reportado que transportadores canaliculares como Mdr y Mrp2, en contraste con otras proteínas canaliculares como fosfatasa alcalina (PA) y gamma glutamil-transpeptidasa, no se liberan de manera significativa a bilis en condiciones normales, en colestasis obstructiva o inducida por EE¹⁰²⁻¹⁰⁵.

1.3. GENERALIDADES DE COLESTASIS

El término colestasis significa "estancamiento de la bilis", e indica, desde el punto de vista fisiopatológico, un disturbio capaz de provocar una reducción o cese total del FB que llega al duodeno. Este proceso, lleva a la retención de constituyentes biliares en el hígado y en la sangre, conduciendo a manifestaciones clínicas características, como prurito e ictericia, incremento en la sangre de enzimas como fosfatasa alcalina, γ -glutamil transpeptidasa y 5'-nucleotidasa, así como un aumento variable en la bilirrubina, SB y colesterol¹⁰⁶.

Los cuadros colestásicos pueden tener un origen genético o adquirido. Dentro de los genéticos podemos mencionar a aquellos que ocurren durante el desarrollo de los conductos biliares, como: atresia de las vías biliares, síndrome de Alagille, y enfermedad hepática fibropoliquística¹⁰⁷. Las colestasis adquiridas pueden ser de origen obstructivo o hepatocelular. La obstrucción puede deberse a la presencia de cálculos biliares o tumores, mientras que la colestasis hepatocelular es consecuencia de un desorden funcional de los hepatocitos donde se está llevando a cabo la formación de bilis primaria, ya sea debido a enfermedades inmunitarias (cirrosis biliar primaria o colangitis esclerosante primaria), agentes infecciosos (citomegalovirus, colangitis bacteriana o infecciones por *Cryptosporidium*), eventos isquémicos (post-trasplante, estenosis de arteria hepática o rechazo crónico del hígado trasplantado), drogas (ciclosporina A, anticonceptivos estrogénicos, andrógenos, antidepresivos tricíclicos, etc.), embarazo o nutrición parenteral total, entre otros. Estos desórdenes suelen estar asociados a defectos en la función de los sistemas de transporte hepatocelular involucrados en el transporte de sustratos osmóticamente activos al canalículo biliar¹⁰⁷.

Estudios genéticos en el hombre y en animales transgénicos revelaron que la herencia de mutaciones recesivas en los genes que codifican para algunos de los transportadores hepáticos mencionados anteriormente producen fenotipos hepatobiliares; por ejemplo, un defecto en BSEP y ABCB4 produce colestasis intrahepática familiar tipo 2 y 3 respectivamente; un defecto

en MRP2 produce el Síndrome de Dubin Johnson y defectos en ABCG5 o ABCG8 producen sitosterolemia⁸².

1.3.1. Internalización endocítica de transportadores canaliculares como mecanismo de colestasis

Como se describió anteriormente, el mantenimiento de una densidad de transportadores apropiada en la membrana canalicular se encuentra finamente regulado, y es de vital importancia para sostener una tasa secretora biliar adecuada (Figura 1.3).

En condiciones de colestasis, hay pruebas convincentes de que el reciclaje fisiológico de los transportadores de membrana mediante internalización/inserción desde y hacia la membrana canalicular a través de vesículas se ve alterada, disminuyendo conjuntamente la expresión de los mismos en la membrana canalicular y aumentando la misma en compartimentos endosomales, lo que en consecuencia perjudica el transporte de sus sustratos hacia la bilis¹⁰⁸ (Figura 1.3 hepatocito derecho). En efecto, la internalización endocítica de Bsep y Mrp2 es una característica común en aquellas hepatopatías que involucran principalmente el deterioro en la capacidad de los hepatocitos para producir bilis (colestasis hepatocelular). En este caso, estos cambios en la localización de los transportadores pueden llegar a ser un patomecanismo clave para explicar la disminución de la secreción biliar.

En la literatura, hay evidencia convincente que la internalización endocítica de estos transportadores se manifiesta en diferentes colestasis clínicas¹⁰⁹⁻¹¹², así como en colestasis experimentales tales como la colestasis inducida por administración del metabolito endógeno del estradiol, estradiol-17 β -D-glucuronido (E17G)^{113,114}, la sal biliar monohidroxilada taurolitocolato (TLC)^{115,116} o la ciclosporina A¹¹⁷, aquellas inducidas por estrés oxidativo¹¹⁸⁻¹²⁰, lipopolisacárido¹²¹⁻¹²⁴ y la colestasis por ligadura de conducto biliar¹²⁵.

En la actualidad, la naturaleza de la alteración en el proceso de reciclado de transportadores canaliculares que ocurre en procesos colestásicos no se encuentra completamente elucidada. La evidencia disponible sugiere que esta alteración podría deberse efectivamente a un desbalance en el proceso de reciclado fisiológico de los mismos, ya que se ha observado que la internalización de transportadores inducida por ésteres de forbol¹²⁶ o E17G¹²⁷ es independiente de la integridad de microtúbulos. Esta evidencia sugiere que, en condiciones colestásicas, existiría un proceso endocítico exacerbado, el cual llevaría a los transportadores canaliculares hacia los AEE.

El estudio y la comprensión de este mecanismo en la patología colestásica queda aún por esclarecerse, pudiendo involucrar una vía endocítica alternativa a la dependiente de clatrina descrita para el reciclado fisiológico, ya que hay evidencia de que los transportadores

canaliculares se encuentran enriquecidos en microdominios *raft* caveolina positivos y no en microdominios *no raft* clatrina positivos^{97,99,128}. Es por ello, que consideramos de gran interés continuar indagando los mecanismos por los cuales se produce la internalización endocítica de estos transportadores canaliculares en la colestasis inducida por E17G, siendo de gran importancia para el descubrimiento de posibles blancos moleculares para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para un posible tratamiento.

1.3.2. Colestasis hepatocelular inducida por drogas y hormonas

La colestasis por drogas representa la principal causa de colestasis de tipo hepatocelular, y cerca de la mitad de los casos de hepatotoxicidad inducida por drogas. Similarmente, ciertas hormonas, ya sea endógenas o consumidas farmacológicamente bajo la forma de diferentes derivados hormonales, son importantes agentes causales de este tipo de colestasis.

Dentro de estas últimas, son de especial interés aquellas colestasis inducidas por estrógenos, testosterona C17-sustituida y esteroides anabólicos¹²⁹. Los estrógenos (Figura 1.4) son considerados agentes causales de la colestasis intrahepática del embarazo, así como también de aquella asociada a la administración de anticonceptivos orales, o secundaria a la terapia de reemplazo hormonal¹³⁰. Los principales síntomas son prurito y, en menor medida, la ictericia. Los niveles séricos de SB se incrementan^{131,132}, se produce sufrimiento fetal, pudiendo conducir a parto prematuro, e incluso a muerte fetal intrauterina¹³³.

Debido a la importancia de su correlato clínico, la colestasis inducida por estrógenos en roedores, es un modelo experimental de colestasis hepatocelular ampliamente utilizado. La injuria colestásica puede ser generada en el transcurso de días al administrar 17 α -etinilestradiol (EE, Figura 1.4) a ratas, o en minutos por administración de estradiol 17 β -D-glucurónido (E17G, Figura 1.4). Estos estrógenos inducen colestasis reduciendo tanto el FBDSB como el FBcISB¹³⁴.

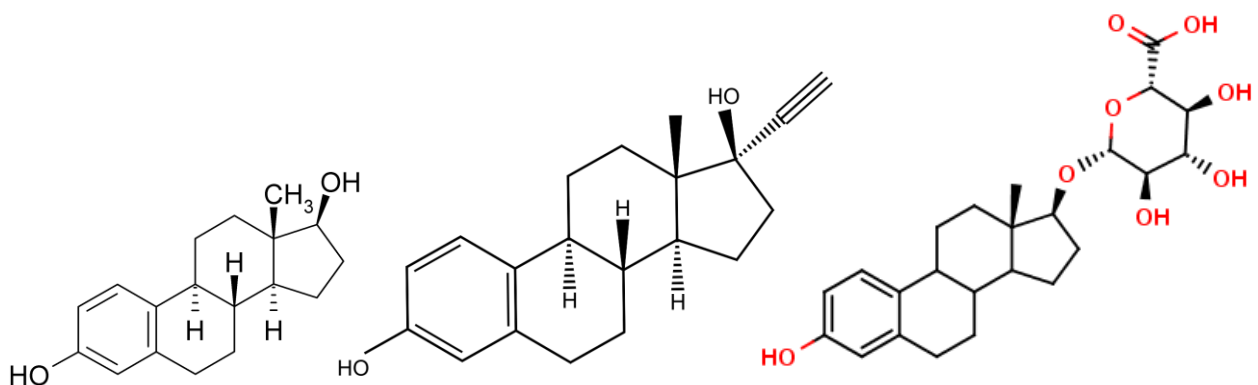


Figura 1.4: Estructura química de las moléculas de estradiol (izquierda), EE (centro) y E17G (derecha).

En América del Sur, las hepatopatías colestásicas, particularmente aquella asociada al embarazo, presentan alta incidencia debido a factores étnicos¹³⁵ o dietarios¹³⁶. Si bien en la Argentina no hay datos estadísticos concretos, en países como Chile se ha observado una incidencia de hasta el 16% de las gestaciones y dentro de la subpoblación india araucana del 28%⁶⁶.

Se cuenta con pocas alternativas terapéuticas para tales patologías, quedando en la práctica reducidas al ácido ursodesoxicólico¹³⁷, de alto costo y uso empírico. Entender los mecanismos moleculares involucrados en la falla secretora en colestasis resulta, por lo tanto, esencial para ampliar las posibilidades terapéuticas y para entender las bases mecanísticas de las ya existentes. Aunque el estudio es de naturaleza básica y experimental, el entendimiento de los mecanismos por los cuales el proceso colestásico ocurre no sólo contribuye al conocimiento de la fisiopatología, sino que permite identificar blancos promisorios para nuevas intervenciones terapéuticas, además de expandir el espectro de posibilidades para su diagnóstico precoz.

1.3.2.1. Colestasis por EE

El EE, administrado subcrónicamente (5 días), disminuye la captación sinusoidal de SB, en parte, por la disminución en la expresión de Ntcp en la membrana basolateral. A nivel canalicular, se demostró que EE disminuye el transporte ATP-dependiente de taurocolato (TC) en preparaciones vesiculares de membrana canalicular debido a una alteración post-transcripcional en la expresión de Bsep^{138,139,140}. Esta expresión se encuentra levemente afectada, mientras que la expresión de Mrp2 disminuye en mayor grado, también a un nivel post-transcripcional¹⁴¹. EE también induce una disminución en la expresión de Oatps, afectando la transcripción de sus genes, junto con una inducción también transcripcional de Mrp3^{139,142}. La disminución en el FBcISB inducida por EE puede deberse a la alteración en la excreción biliar de HCO_3^- ¹⁴³ y GSH¹⁴⁴. La disminución en la excreción biliar de GSH puede, a su vez, estar asociada a una alteración a nivel post-transcripcional en la expresión de Mrp2¹⁴¹. Finalmente, EE incrementa la permeabilidad de las uniones estrechas, con lo cual puede ocurrir reflujo por vía paracelular de los componentes determinantes de ambas fracciones del FB^{141,143-146}.

Un mecanismo clave que podría explicar la disminución postranscripcional en la expresión de Mrp2 y Bsep es la internalización endocítica de Mrp2¹⁴⁷. Esta internalización se asoció a un cambio en el estado de fosforilación y posterior disrupción de la localización de radixina, una proteína que ancla a Mrp2 en la membrana canalicular y cuyo déficit de expresión lleva a endocitosis del transportador (ver ítem 1.2.2.1.1.2). Si bien no se ha estudiado la existencia de un fenómeno endocítico similar para Bsep en la colestasis por EE, el mismo es

factible, ya que radixina también interacciona fuertemente con este transportador, y contribuye decisivamente a su anclaje (ver ítem 1.2.2.1.1.2).

EE no produce colestasis aguda, sino que requiere de varios días para establecerse, razón por la cual se ha postulado la necesidad de la existencia de un proceso metabólico previo que manifieste su efecto colestásico. En efecto, se ha postulado que el efecto colestásico inducido por EE depende en gran medida de su conversión a EE 17 β -glucuronido,^{148,149} que es un potente agente colestásico¹⁵⁰, por lo cual es posible hipotetizar que estarían involucradas vías de señalización similares a las descritas más adelante para la colestasis inducida por E17G.

1.3.2.2. Colestasis por E17G

El E17G es un metabolito endógeno del estradiol glucuronizado en su anillo "D". Los niveles plasmáticos del mismo aumentan durante el tercer trimestre de embarazo, pudiendo éste ser un factor clave en la patogénesis de la colestasis intrahepática que se observa en mujeres susceptibles¹⁵¹.

La administración de E17G en bolo a ratas produce una colestasis dosis-dependiente, aguda y reversible, afectando las fracciones dependiente e independiente de SB del FB. Nuestro grupo realizó numerosos aportes al entendimiento de la colestasis inducida por este metabolito estrogénico. Luego de una única inyección del metabolito por vía i.v., el flujo de bilis disminuye de una manera dependiente de la dosis, con un pico a los 20 min., recuperándose espontáneamente y llegando a niveles normales luego de 2 hs después de la inyección¹⁵². La fase colestásica se asocia con la internalización endocítica de Bsep y Mrp2, mientras que la fase de recuperación es consecuencia de la re inserción espontánea de vesículas que contienen a estos transportadores^{113,114}.

El estudio sobre los cambios en la localización y actividad de Mrp2 en el hígado de ratas tratadas con E17G demostró que la internalización endocítica del transportador es independiente de microtúbulos, y va acompañada de un deterioro en la actividad, evidenciado por una disminución en la capacidad de transporte del sustrato modelo dinitrofenil-glutatin^{113,153}. Además, se evidenció que la re inserción de Mrp2 en la membrana canalicular durante la fase de recuperación sí depende de la integridad de microtúbulos, ya que animales a los que se les pre-administra colchicina no recuperan totalmente el FB ni la velocidad de excreción de bilirrubina, fenómeno asociado a la falla en la re inserción de este transportador¹⁵³. También se observó que la administración de E17G a ratas mutantes que no expresan Mrp2 no induce colestasis; este hecho condujo a postular la existencia de algún tipo de interacción entre E17G y Mrp2 en el momento en que E17G está siendo transportado vía Mrp2 a la bilis. Esta interacción afectaría de algún modo la localización y la actividad de Mrp2, desencadenando, al

menos en parte, los fenómenos colestásicos observados¹⁵⁴. Dado que Bsep es internalizado endocíticamente bajo las mismas condiciones que Mrp2, es posible que exista una asociación cercana entre estos transportadores canaliculares. Se ha propuesto además la existencia de un mecanismo de trans-inhibición de Bsep inducido por E17G¹⁵⁵, aunque su relevancia *in vivo* ha sido cuestionada^{154,114}.

1.3.2.2.1. Rol de vías de señalización intracelular en la colestasis por E17G

La señalización intracelular se ha convertido en un hecho fundamental para explicar el desarrollo de diferentes modelos de colestasis^{118,156-159}. Los cambios en la localización de los transportadores que ocurren en la colestasis dependen de la activación por el agente colestásico de vías de señalización críticas en la regulación del proceso de reciclado de los transportadores canaliculares. Distintas proteínas involucradas en al menos dos vías de señalización independientes están implicadas en la colestasis inducida por E17G (Figura 1.5).

Crocenzi y col¹⁵⁸ demostraron un rol crítico de la isoforma dependiente de Ca^{2+} ("clásica") de PKC (cPKC) en la internalización de Bsep y Mrp2, con la consecuente falla secretora de SB y aniones orgánicos, en la colestasis inducida por E17G. La activación de fosfoinositido 3 quinasa (PI3K) ha sido involucrada también como una pieza clave en la colestasis por E17G. Boaglio y col¹⁵⁹ mostraron que la vía de PI3K, a través de su proteína quinasa efectora, Akt están involucrados en la internalización de Bsep y Mrp2 inducida por E17G. En este caso, PI3K/Akt actúa complementariamente con cPKC. Mientras que cPKC sería responsable de la internalización endocítica de los transportadores canaliculares, PI3K/Akt retrasaría la re inserción espontánea de las vesículas conteniendo los mismos. Cascada abajo de las vías mencionadas, Boaglio y col. demostraron la participación de las proteínas ERK1/2 y p38MAPK, dos Ser/Tre quinasas pertenecientes a la familia de las MAPKs (acrónimo inglés de "mitogen-activated protein kinase")⁸⁶.

Barosso y col. identificaron al receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) como un componente necesario en la vía de señalización cascada abajo de cPKC¹⁶⁰, postulando a la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3)¹⁶¹ como la potencial mediadora de la fosforilación del $RE\alpha$, ya que es activada por cPKC y su inhibición bloquea la fosforilación del $RE\alpha$ ¹⁶². La activación de GSK-3 que ocurre cascada debajo de cPKC se produce por desfosforilación de la quinasa en ser 21 (GSK3 β) o ser 9 (GSK3 α), por lo tanto, PKC no actuaría en forma directa, sino a través de una fosfatasa, ya que es conocido que la actividad recíproca de quinasas y fosfatasas determina el nivel de fosforilación proteica en las células.

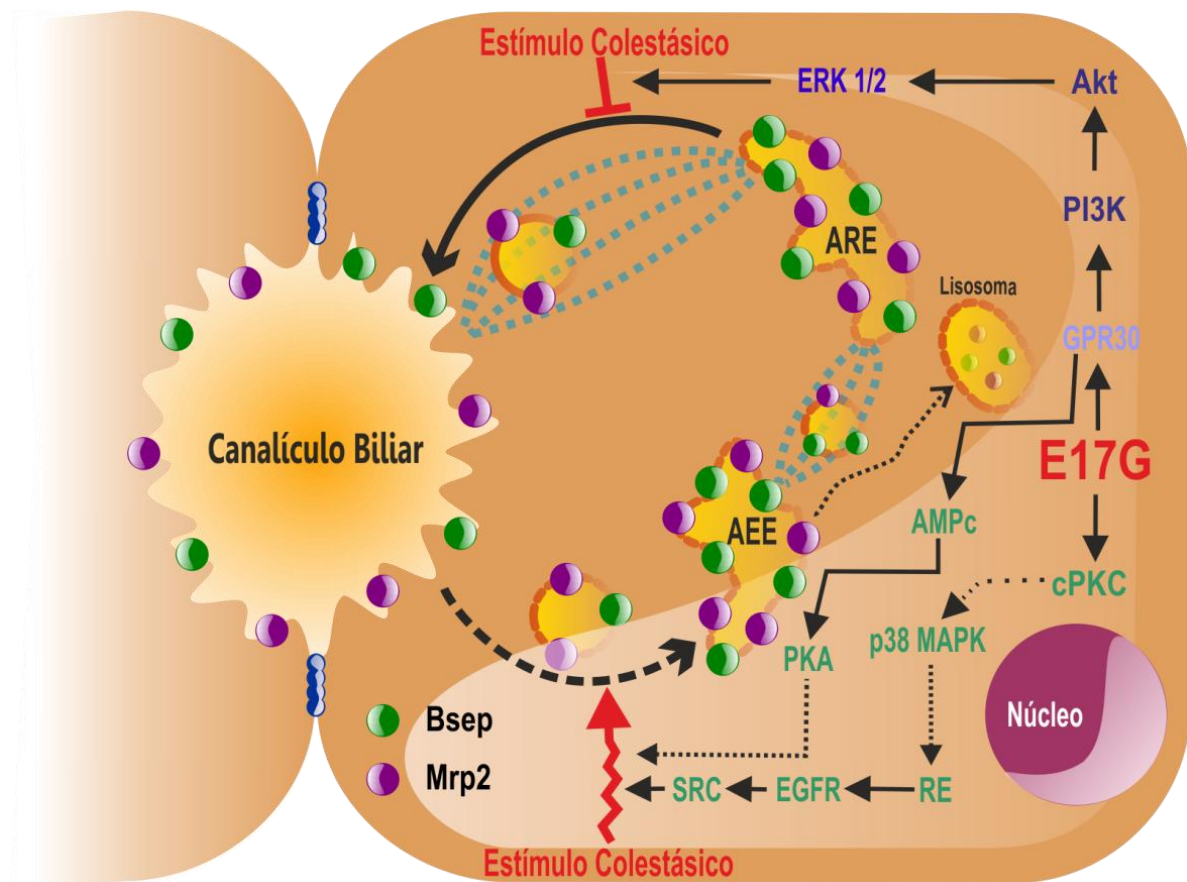


Figura 1.5: Vías de señalización involucradas en el proceso de internalización endocítica de transportadores canaliculares en la colestasis por E17G. Las flechas con líneas continuas indican las proteínas involucradas cascada abajo, mientras que las flechas punteadas indican que podría haber intermediarios aún no identificados.

Además, Barosso y col. también observaron y caracterizaron la participación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, acrónimo en inglés de "epidermal growth factor receptor") en modelos de colestasis por E17G con la particularidad que esta participación ocurre en la misma vía del $RE\alpha$ y el efector de EGFR sería una quinasa Src^{162} . Src podría ser el vínculo de la vía con la internalización de los transportadores canaliculares.

En concordancia con este hallazgo, Cantore y col han observado que la quinasa Fyn, perteneciente a la familia de las quinasa Src, participa de la internalización de los transportadores canaliculares por hiperosmolaridad¹⁶³. Por otro lado, se ha observado que Src puede fosforilar la cadena pesada de clatrina¹⁶⁴ y β -adaptina (Tyr 737), componente del complejo AP2¹⁶⁵, que participan de la formación de vesículas recubiertas de clatrina, vía endocítica que podrían sufrir los transportadores canaliculares en colestasis.

Nuestro grupo de trabajo ha descrito dos roles distintos y opuestos para AMPc en colestasis: el aumento de AMPc que ocurre luego de la estimulación por glucagón o salbutamol,

que induce la re inserción de transportadores previniendo la colestasis por E17G, y el AMPc sintetizado a partir de la acción de E17G sobre *receptor acoplado a proteína G 30* (GPR30, acrónimo en inglés de "G protein-coupled receptor 30"), el cual es esencial para que se produzca la desinserción de los transportadores canaliculares¹⁶⁶, y por lo tanto, el proceso colestásico.

In vitro, Zucchetti y col observaron que la inhibición farmacológica de GPR30 por el antagonista G15 producía un alto grado de protección, indicando que este receptor participa en la alteración funcional que E17G induce sobre los transportadores canaliculares Mrp2 y Bsep. Sin embargo, la activación específica de GPR30 con el agonista G1 no mostró efectos colestásicos a pesar de lograr aumentar AMPc y activar PKA, indicando que la activación de esta vía es necesaria pero no suficiente para producir estas alteraciones colestásicas.

La participación de AMPc fue evaluada mediante la determinación de sus niveles en DAH, en donde se observaron aumentos moderados en presencia de E17G, los cuales fueron revertidos al inhibir GPR30, hecho que confirma que para producir estos aumentos se requiere la activación de este receptor. GPR30 estaría actuando independiente y complementariamente a la vía de RE α , llevando a la internalización de los transportadores canaliculares Mrp2 y Bsep a través de la activación de adenilato ciclasa y PKA¹⁶⁶ e inhibiendo la vías de re inserción al activar la vía PI3K/Akt/ERK1/2^{159,166}. La activación simultánea de todas estas vías llevaría a mantener internalizados a los transportadores canaliculares en la colestasis por E17G.

La activación de quinasas dependientes de Ca²⁺-calmodulina (CaM-K) por medios convencionales requiere la unión del complejo Ca²⁺-calmodulina a la enzima para iniciar el proceso. En las células en reposo, los niveles de Ca²⁺ citoplasmático y nuclear son bajos (aproximadamente 100 nM), mientras que luego de un estímulo adecuado los niveles de Ca²⁺ en el citoplasma y en el núcleo pueden cambiar drásticamente debido a la apertura de los canales de calcio en la membrana extracelular y/o por los canales de inositol trifosfato que se encuentran en el retículo endoplásmico. Este incremento en los niveles de Ca²⁺ es acompañado de un aumento de los niveles del complejo Ca²⁺-calmodulina, llevando a la activación de las enzimas activadas por Ca²⁺-calmodulina como las CaM-Ks¹⁶⁷. Nuestro grupo evidenció que E17G aumenta los niveles de Ca²⁺ intracelular y activa CaM-KII; a su vez se vio que los bloqueadores de Ca²⁺ (nifedipina y verapamilo), los inhibidores de calmodulina (trifluoroperazina y W7) y de CaM-KII (KN62) protegen de la alteración en los transportadores canaliculares inducida por el estrógeno, demostrando un rol de esta vía en la colestasis por E17G¹⁶⁸.

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional reversible que juega

un papel crítico en la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la transducción de señales¹⁶⁹, etc. Como se ha mencionado hasta aquí, en la colestasis por E17G están implicadas varias vías de señalización en la que participan quinasas, lo cual indica que los mecanismos fisiopatológicos involucran la regulación de la fosforilación y la desfosforilación de proteínas. En los últimos años, la fosfoproteómica se ha convertido en una herramienta poderosa, sensible y robusta para poder identificar cambios en el nivel de fosforilación de múltiples proteínas¹⁷⁰, siendo una herramienta de gran utilidad para evaluar los blancos de vías de señalización, mediante el análisis del nivel diferencial de fosforilación de proteínas bajo diferentes condiciones o tratamientos¹⁷¹. Es por ello que, en un esfuerzo por identificar los posibles mecanismos involucrados en la colestasis por E17G, en esta tesis hemos decidido realizar un estudio fosfoproteómico y bioinformático, para poder así detectar proteínas que cambien su estado de fosforilación en respuesta al tratamiento con E17G, y que puedan cumplir un rol en la fisiopatología de esta colestasis.

1.3.2.2. Rol de vías de señalización intracelular en otros modelos de colestasis

Existe evidencia que muchas de las proteínas quinasas mencionadas en las vías de señalización procolestásicas descritas para E17G, participan además en otros tipos de colestasis, es decir, que podrían ser parte de un mecanismo común en la patogenia de cuadros colestásicos.

Algunos ejemplos representativos son la cPKC, principalmente PKC α en hepatocitos. La activación selectiva de cPKC con timeleatoxina induce la internalización endocítica de Bsep y produce colestasis en el hígado de rata aislado y perfundido¹⁷². Coincidentemente, la activación pan específica de las isoformas clásicas y nóveles (nPKC) con forbol-12-miristato-13-acetato también induce la redistribución de Mrp2 canalicular hacia la membrana basolateral en células de hepatocarcinoma humano HepG2¹²⁶.

En concordancia con estos resultados, nuestro grupo también demostró que la participación de cPKC es crítica en la internalización endocítica de Bsep en la colestasis inducida por estrés oxidativo con *tert*-butilhidroperóxido¹¹⁸. Sin embargo, la activación de proteínas quinasas bajo condiciones de estrés oxidativo depende de la magnitud del mismo. Bajas concentraciones de ácido etacrínico, compuesto oxidante, no activan cPKC pero sí isoformas nPKC. En estas condiciones, el compuesto internaliza Mrp2, por un mecanismo probablemente dependiente de Ca⁺². Por el contrario, dosis más altas, posiblemente producen la activación no sólo de nPKC sino también de cPKC, induciendo la internalización de Bsep y Mrp2¹²⁰.

La isoforma de nPKC épsilon (PKC ϵ) es también activada en la colestasis inducida por TLC, y se ha sugerido que participa en el efecto colestásico del mismo, aunque aún no hay evidencias directas¹⁷³. La activación PKC ϵ está mediada por la activación de PI3K inducida por TLC, ya que los productos de PI3K son potentes activadores de la PKC ϵ . Además, la activación de PI3K ha demostrado desempeñar un papel clave en la colestasis inducida por TLC, y en la internalización de los transportadores canaliculares involucrados en este fenómeno¹⁵⁶.

1.3.3. Estrategias terapéuticas anti-colestásicas basadas en la modulación de la localización de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2

Como se mencionó anteriormente, en la colestasis inducida por E17G (ver ítem 1.3.2.2), la internalización de los transportadores hepatocelulares se revierte espontáneamente si el estímulo colestásico es transitorio. Esta reinserción espontánea se produce por una vía dependiente de microtúbulos hacia la membrana canalicular¹⁵³. Basándose en este fenómeno, se han diseñado varios enfoques terapéuticos experimentales para impedir la internalización de los transportadores y/o acelerar esta reinserción, lo cual evitaría consecuencias irreversibles de la internalización sostenida, como la degradación lisosomal de los transportadores. Los compuestos que se ha demostrado que previenen la internalización endocítica de los transportadores canaliculares y/o aceleran su reinserción exocítica incluyen:

- **AMPc**: fue una de las primeras moléculas de señalización probadas por su capacidad para estimular el transporte vesicular en general, y la inserción exocítica de los transportadores canaliculares en particular¹⁷⁴. Las vías de señalización que median la translocación de Mrp2 inducida por AMPc en células hepáticas no han sido completamente esclarecidas, existiendo evidencias contradictorias. Se ha propuesto que AMPc estimula la reinserción de Mrp2 mediada por PI3K mediante su activación dependiente de nPKC¹⁷⁵. Por otra parte, una publicación más reciente involucra la participación de p38 MAPK (isoforma α), la cual es independiente de PI3K¹⁷⁶. Estos resultados, se basan en el uso de inhibidores químicos de las moléculas de señalización estudiadas, los cuales pueden tener reactividad cruzada.

Además de la actividad pro-exocítica de AMPc, se demostró que tiene propiedades anticolestásicas al prevenir/revertir la internalización de transportadores canaliculares del tipo ABC en varios modelos de colestasis hepatocelular experimental. En la colestasis inducida por E17G en hígado de rata aislado y perfundido, la caída inicial tanto del flujo biliar como de la actividad de transporte de Bsep¹¹⁴ y Mrp2¹¹³ que ocurre en la fase aguda de la colestasis puede ser parcialmente prevenida mediante la administración de AMPc o su precursor, dibutiril-AMPc (DBAMPc). Más significativamente, AMPc induce una aceleración de la recuperación espontánea del flujo biliar, así como de la función de transporte y localización de Mrp2 que ocurre durante

la fase de recuperación de esta colestasis¹¹³. Una aceleración similar de la re-inserción de Bsep ha sido descrita por nuestro grupo en colestasis inducida por TLC¹¹⁶. En DAH, se confirmó un efecto preventivo de AMPc tanto en la alteración de la localización como de la función de transporte de Bsep inducida por E17G^{177,178} y TLC^{116,177}. En este caso, la prevención por AMPc fue completa, ya que el modelo de DAH no permite un registro dinámico del fenómeno colestásico y su reversión.

Nuestro grupo también demostró que la modulación hormonal de los niveles intracelulares de AMPc en DAH a través del tratamiento con glucagón y salbutamol (un agonista β -adrenérgico), es capaz de prevenir la alteración en la localización y función de Bsep y Mrp2 inducida por E17G. La prevención producida por glucagón fue dependiente de la activación de la proteína quinasa activada por AMPc (PKA) e independiente de la proteína fijadora de AMPc Epac y de la integridad de microtúbulos. En contraste, la prevención inducida por salbutamol fue independiente de PKA y dependiente de Epac y microtúbulos. Estos efectos anticoléstásicos de glucagón y salbutamol fueron aditivos, lo cual sugiere fuertemente que las diferentes vías involucradas llevan a la elevación de diferentes pools intracelulares de AMPc¹⁷⁹.

- Tauroursodesoxicolato (TUDC): esta sal biliar conjugada con taurina estimula la inserción exocítica de Bsep como parte de su efecto colerético¹⁸⁰. Además, contrarresta la internalización endocítica de Bsep¹⁸¹ y Mrp2¹¹⁵ en la colestasis inducida por TLC. Se ha propuesto que la isoforma dependiente de Ca^{+2} de PKC, PKC α , media el efecto anticoléstásico de TUDC¹¹⁵, a través de un mecanismo cooperativo con PKA¹⁸². Esto está en aparente contradicción con los resultados de que la activación de PKC conduce a la patología colestásica¹⁷²; sin embargo, la respuesta biológica llevada a cabo por la acción combinada de diferentes proteínas quinasas (PKC α / PKA) puede ser diferente de la llevada a cabo por sólo una de ellas (PKC α). Además de estos efectos anticoléstásicos, el TUDC tiene efectos coleréticos cuando se administra a ratas normales, en parte estimulando la inserción de los transportadores en la membrana apical. Aunque se piensa en gran medida que este efecto colerético explica sus efectos anticoléstásicos, este fenómeno implica la participación de proteínas quinasas como las MAPKs ERK 1/2¹⁸³ y p38 MAPK¹⁸⁰, el efecto anticoléstásico de TUDC en la colestasis inducida por TLC no está mediado por MAPKs¹⁸⁴.

1.4. MODELOS *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE TRANSPORTE HEPATOCANALICULAR

La necesidad de estudiar de una manera rápida y reproducible los cambios rápidos producidos en el transporte canalicular de hepatocitos debido a alteraciones en la localización

y/o función de los transportadores de membrana canalicular, minimizando el uso de animales de laboratorio, ha impulsado el desarrollo de modelos hepatocelulares polarizados *in vitro*. Por ejemplo, las DAH es un modelo utilizado con éxito desde principios de 1980 para estudiar las alteraciones, deterioro de la función y la localización de los transportadores inducida por los compuestos tóxicos y/o colestásicos, y su prevención mediante compuestos hepatoprotectores^{174,185,186}. La administración a DAH de E17G^{158,178}, o de la sal biliar TLC^{187,188}, induce una colestasis aguda, acompañada de la internalización endocítica de los transportadores canaliculares Mrp2 y Bsep y de la alteración asociada a este evento en su función de transporte, tal como se observa en la colestasis aguda *in vivo* causada por estos compuestos^{113,178}.

Estas alteraciones se manifiestan con la intervención de varias vías de señalización intracelular^{86,158-160,189,190}, las cuales requieren estudios de activación en el tiempo (por pruebas de actividad enzimática o *Western blot*). Para ello, se requieren cantidades importantes de proteína, difícil de obtener a partir de cultivos de DAH, debido al bajo rendimiento celular de estas preparaciones. Además, para obtener evidencias mecanísticas más directas, se necesita utilizar, por ejemplo, herramientas de silenciamiento (*knock-down*) del gen que codifica el candidato molecular de la vía de señalización en estudio, utilizando la tecnología de ARN de interferencia (ARNi). Estos estudios se realizan por lo general entre 48 y 72 hs después de la transfección con el correspondiente ARNi, lo que hace imposible la utilización de DAH, puesto que sólo mantienen su funcionalidad durante aproximadamente 10 hs¹⁹¹.

Un modelo alternativo *in vitro* es el cultivo primario de hepatocitos en configuración sándwich (CPHS), el cual es un modelo hepatocelular polarizado, basado en cultivo primario de hepatocitos entre dos capas de colágeno gelificado, con alto rendimiento celular y que reproduce las condiciones fisiológicas de mejor manera, adquiriendo y manteniendo durante varias semanas, una morfología más similar a aquella presente *in vivo*, con niveles de secreción fisiológicas de muchas proteínas específicas del hígado y compuestos orgánicos, como la urea, albúmina y SB¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Dos metodologías diferentes se han descrito y aplicado para el estudio del transporte canalicular en CPHS. La primera, se basa en el cálculo del índice de excreción biliar de sustratos radioactivos o fluorescentes del transportador en estudio, mediante la medición de la diferencia entre la cantidad de compuesto fluorescente / radiactivo acumulada en todo el cultivo (células más canalículos biliares) y la cantidad de compuesto retenido en el cultivo después de la exposición a un medio libre de Ca^{+2} , lo cual conduce a la apertura de las uniones estrechas y permite la liberación del contenido canalicular¹⁹⁵. Sin embargo, este método tiene inconvenientes importantes que hacen complicado su uso rutinario, e incluso pueden poner en

duda los resultados obtenidos, ya que: 1) es engorroso, ya que tiene un gran número de etapas, 2) la reproducción de los resultados es difícil, dado que se requieren dos preparados por grupo experimental, 3) no considera los posibles cambios que pueden producir los cambios en los niveles de Ca^{+2} extracelular cuando se evalúan eventos de señalización intracelular, etc.

Una alternativa, más directa y más rápida ha sido utilizada recientemente con éxito para medir los procesos de transporte mediados por Bsep¹⁹⁶ y Mrp2¹⁹⁷. Consiste en medir el aumento en el tiempo de la fluorescencia asociada a un sustrato fluorescente específico para los transportadores en estudio en los canalículos de forma cuantitativa a través de la adquisición de imágenes, con la ayuda de un microscopio de fluorescencia invertido o un microscopio confocal¹⁹⁸. En la actualidad, no se ha evaluado sistemáticamente si las alteraciones funcionales inducidas por compuestos colestásicos o coleréticos pueden reproducirse en CPHS, haciendo a este modelo útil para el estudio de los mecanismos asociados a estas alteraciones.

Objetivos

2.1. OBJETIVO GENERAL

La endocitosis de transportadores canaliculares es un mecanismo fisiopatológico clave de alteración secretora biliar, capaz de explicar la falla secretora aguda producida por drogas u hormonas colestásicas, y de agravar el daño hepatocelular en colestasis sostenidas tanto de tipo hepatocelular como obstructivo, promoviendo la degradación de los transportadores endocitados.

A pesar de la universalidad de este mecanismo en muchos tipos de colestasis clínicas y experimentales, y de los importantes avances en el entendimiento de las vías de señalización que lo regulan, los mecanismos moleculares que explican el fenómeno endocítico en sí son desconocidos.

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo general profundizar en el entendimiento de la biología celular del proceso de endocitosis de transportadores canaliculares en el cuadro colestásico inducido por el agente colestásico modelo E17G en la rata, mediante la identificación de nuevas estructuras celulares que participen en este proceso, así como proponiendo nuevas metodologías y validando modelos celulares "in vitro" para su estudio.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Validar el modelo *in vitro* de cultivo primario de hepatocitos de rata en sándwich de colágeno para la evaluación de drogas que afecten la formación de bilis canalicular mediante mecanismos que alteran la función y localización de transportadores canaliculares hepáticos.
- ✓ Dilucidar el mecanismo mediante el cual se produce la endocitosis de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 en la colestasis inducida por E17G.
- ✓ Identificar, mediante estudios de fosfoproteómica, cambios en el patrón de fosforilación de proteínas hepáticas inducidos por E17G *in vivo*, con la finalidad de identificar posibles blancos hepatocelulares de aquellas proteínas quinasas involucradas en la colestasis inducida por E17G.

Materialles y Métodos

3.1. REACTIVOS

La colil-glisil amido fluoresceína (CGamF) fue generosamente cedida por el Profesor Alan Hofmann (Universidad de California, San Diego). E17G, colagenasa tipo A (de *Clostridium histolyticum*), albúmina sérica bovina (ASB), azul de tripán, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), medio de cultivo L-15, detergente Tritón X-100, medio de cultivo DMEM, dimetil sulfóxido (DMSO), Tritón X-100, dodecil sulfato de sodio, ácido etilen glicol-bis(2-aminoetileter)-N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), acrilamida/bis-acrilamida, ditiotreitól (DTT), persulfato de amonio, uretano, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD⁺), Tween 20, taurocolato (TC), paraformaldehído, N6,2'-O-dibutiriladenosina 3':5'-monofosfato cíclico (DBAMPc) y anticuerpo de ratón anti β -actina, dexametasona, gentamicina, solución de antibiótico 100X (penicilina, estreptomina, anfotericina), uretano, β -NAD, 3- α hidroxisteroide deshidrogenasa, anticuerpo de ratón anti β -actina, monodansylcadaverina (MDC), filipina, taurolitocolato (TLC) y el cóctel de inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los anticuerpos de conejo anti-cadena pesada de clatrina humana, anti-Rab5 humano, anti-caveolina 1 y anti-AP2 humana fueron adquiridos de Cell Signaling. 5-clorometil fluoresceína diacetato (CMFDA), Alexa Fluor 568 faloidina fueron adquiridos de Molecular Probes (Eugene, OR). El Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) y el anticuerpo de ratón anti-MRP2 humano (M2III-6) fueron obtenidos de Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Los anticuerpos de ratón anti-IgG y anti-occludina humana y el anticuerpo de conejo anti-occludina humana fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA). Los anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo conjugados con Cy2 y los anticuerpos anti-IgG de ratón y conejo conjugados con Cy3 fueron adquiridos de Jackson ImmunoResearch (West Baltimore Pike, USA). El anticuerpo de conejo anti-Bsep humano fue adquirido en Kamiya Biomedical Company (Seattle, USA). Todos los otros químicos utilizados en esta Tesis fueron de la mayor calidad disponible comercialmente.

3.2. OBTENCIÓN DE COLÁGENO TIPO I A PARTIR DE COLA DE RATA

Como matriz extracelular para los cultivos celulares se utilizó una base de colágeno tipo I en las placas de cultivo. El colágeno se obtuvo a partir de las colas de cinco ratas hembras de aproximadamente 50 días. Se extrajo el tejido cartilaginoso de las mismas, y se aisló del tejido muscular con ayuda de un bisturí. Luego, se colocó en 250 mL de solución lavadora NaCl 4,5 M; Tris 0,05 mM (pH 7,5) y EDTA 20 mM), la cual se agitó vigorosamente con el objetivo de separar de los restos de tejidos y sangre que hayan quedado del procedimiento anterior. Se lavó tres veces con agua destilada, y se colocó durante 12-24 hs a 4 °C en 250 mL de solución de ácido acético (0,5 M, pH 2,5), con agitación moderada, produciéndose la disolución de la proteína en

cuestión. La solución resultante se filtró a través de una gasa, y se centrifugó 90 min a 37.000 *g* en tubos de 50 mL en una centrífuga Beckman Coulter Avant-J25 (Beckman Ltd, High Wycombe, Inglaterra), recuperándose el sobrenadante. Posteriormente, se procedió a realizar un salting-out para precipitar el colágeno, agregándose lentamente NaCl sólido, en agitación continua y moderada, hasta alcanzar una concentración de 0,7 M, dejándose la preparación en reposo a 4 °C durante 12-24 hs.

Luego de este período, se centrifugó la solución durante 45 min a 37.000 *g*. El pellet se disolvió durante 12-24 hs a 4 °C en 60 mL de ácido acético (0,5 M, pH 2,5) con agitación moderada. En un paso posterior, se centrifugó 90 min a 37.000 *g*, y el sobrenadante resultante se dializó (membrana de diálisis de tamaño de poro de 12kDa) contra ácido acético 0,5 M (pH 2,5) durante 12-24 hs a 4 °C¹⁹⁹. Finalmente, la solución de colágeno obtenida se liofilizó, utilizando un equipo Labconco, (Kansas City, Estados Unidos).

El colágeno obtenido se disolvió en ácido acético 5 mM con agitación moderada toda la noche a 4 °C, y se llevó a pH 7,4 con buffer fosfato salino (Na₂HPO₄ 30 mM; NaCl 100 mM), obteniéndose una concentración de 2,4 mg/mL con la que se prepararon las placas con las que se realizaron los cultivos de DAH. Para los CPHS, el colágeno se disolvió en ácido acético 20 mM con agitación moderada toda la noche a 4 °C, se llevó a pH con NaOH 2M y se agregó DMEM 10x (10 % v/v), llevándose a una concentración de 4mg/mL. Las placas se prepararon cubriendo uniformemente los pocillos con la solución de colágeno utilizando una espátula estéril, seguido de una incubación a 37 °C durante 2 hs y, finalmente expuestas a 1 h a luz UV para su esterilización.

3.3. ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar hembra adultas, endocriadas en el bioterio central de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, y ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Los animales fueron tratados en los experimentos de acuerdo a normas internacionales y a protocolos para el uso y manejo de animales de laboratorio aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R.

3.3.1. Modelos *in vitro*

3.3.1.1. Duplas Aisladas de Hepatocitos (DAH)

3.3.1.1.1. Aislamiento, enriquecimiento y cultivo de DAH

Las DAH se obtuvieron a partir de la perfusión *in situ* de hígados de ratas, de acuerdo al método de doble perfusión con colagenasa²⁰⁰. La suspensión celular obtenida fue luego enriquecida en duplas mediante elutriación²⁰¹.

Este método consiste en digerir de manera incompleta el hígado de rata, primero perfundiéndolo durante 15 min con una solución amortiguadora libre de iones Ca^{2+} , para debilitar las uniones celulares, y luego con el buffer con colagenasa sólo 5 min, y con una concentración de la misma de 1.300 U/L (aproximadamente un 30 % de la usada para obtener hepatocitos aislados). Las perfusiones se realizan a un flujo constante de 20 mL/min. La cantidad de células obtenidas se incrementa al incubar el resto del tejido hepático durante dos disgregaciones mecánicas de 7 min con 30 ml de la solución de colagenasa descrita anteriormente, en un baño de agua a 37° C. Luego de filtrar la suspensión celular obtenida a través de una malla de nylon, se dejan decantar las células durante 15 min en hielo. Luego, se retira el sobrenadante, se resuspenden las células con medio L-15 fresco y se dejan decantar nuevamente durante 15 min en hielo. Finalmente, se descarta el sobrenadante, y se resuspenden las células en un volumen mínimo de L-15 fresco.

La suspensión celular obtenida contuvo aproximadamente un 25% de duplas de hepatocitos con una alta viabilidad (> 90%), determinada mediante exclusión del colorante azul tripán. Esta preparación inicial, conteniendo poblaciones variables de agregados hepatocitarios, fue luego enriquecida en duplas mediante elutriación, según la técnica descrita por Wilton y col.²⁰¹. La elutriación es un proceso físico que consiste en la separación de células (y de partículas en general) de acuerdo con su velocidad de sedimentación, en el cual se utiliza un flujo del propio medio de suspensión celular en sentido contrario a la sedimentación, combinado con la acción de la fuerza centrífuga. Así, las células son sometidas a la acción de dos fuerzas opuestas (ver Figura 3.1), a saber: *i*) la fuerza centrífuga, que trata de llevar a las células hacia la parte externa de la cámara de elutriación, y *ii*) el arrastre en sentido opuesto que provoca un flujo continuo de medio impulsado por una bomba peristáltica que ingresa desde la parte externa de la cámara y sale por la parte interna de la misma, que propulsa las células hacia el centro. Cambiando solamente la velocidad de flujo del medio, mientras que la velocidad del rotor se mantiene constante, podemos recoger las distintas alícuotas de acuerdo al tamaño o el estado de agregación celular que nos interesa seleccionar²⁰². Utilizando un flujo bajo, se recuperan los detritos celulares y luego, a medida que aumenta el flujo, van apareciendo los agregados celulares de menor a mayor velocidad de sedimentación, o sea células agrupadas de a pares, en adelante. La cámara debe mantenerse a temperatura ambiente (21° C) durante todo el proceso, y el medio debe estar frío (aproximadamente 4° C), para conservar la integridad de las células, manteniendo su fluidez de membrana. Las muestras obtenidas son, finalmente, preservadas en hielo.

Para la centrifugación elutriacional, se utilizó una cámara estándar de elutriación montada sobre un rotor JE-6B (Beckman Ltd, High Wycombe, Inglaterra) en una centrífuga Beckman-Coulter Avanti J2-S. Las células se separaron manteniendo la velocidad del rotor a 1.100 rpm, e incrementando secuencialmente el flujo del medio de elutriación (solución amortiguadora de fosfato con una concentración de albúmina de 1 g/L) en la cámara, utilizando una bomba peristáltica.

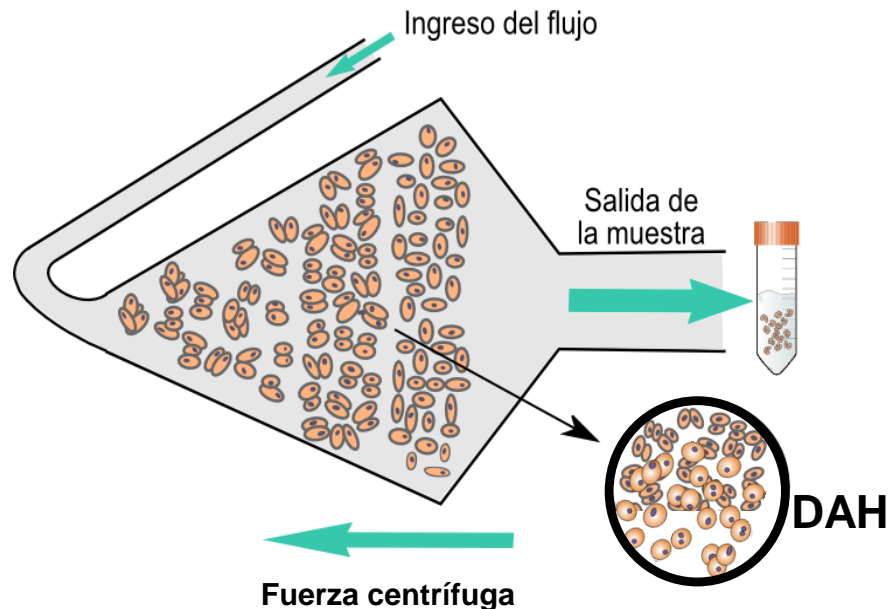


Figura 3.1. Representación esquemática de la cámara interna de un rotor de centrifugación utilizado para elutriación. El aumento gradual de la fuerza centrípeta (flujo de ingreso), frente a una fuerza centrífuga constante permite la separación de poblaciones celulares en función del tamaño de las mismas.

Las DAH fueron cultivadas en placas de 24 pocillos cubiertas con colágeno, a una densidad de 2×10^4 cél/mL, 37°C , 4,5-5 hs en medio de cultivo L-15. Este tiempo es necesario y suficiente para que las duplas restablezcan la polaridad de sus membranas celulares¹⁹¹. La viabilidad de las células fue evaluada por el test de exclusión de azul de tripán. Los estudios se realizaron solo cuando la viabilidad de los hepatocitos fue $> 90\%$.

3.3.1.1.2. Tratamientos realizados a las DAH

Las DAH fueron expuestas al vehículo (DMSO; grupo control) o E17G $200 \mu\text{M}$ por 20 min. Para evaluar el rol de los inhibidores de la endocitosis, se procedió a realizar dos pre-tratamientos que inhiben la endocitosis mediada por clatrina: MDC $100 \mu\text{M}$ por 15 min y depleción de K^+ , este último consiste en un shock hiposmótico con medio DMEM diluido al medio durante 5 min, posteriormente una incubación de 30 min con Medio mínimo sin K^+ (20 mM Heps, 140 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , MgSO_4 , 5,5 mM glucosa, 0,5 % ASB) o su respectivo control con K^+ (10 mM KCl)²⁰³. Por otro lado, para inhibir la endocitosis mediada por caveolina, se preincubaron las DAH con filipina $1 \mu\text{g/mL}$, durante 15 min.

3.3.1.1.3. Estudios funcionales

La actividad de los transportadores Bsep y Mrp2 en las DAH fue evaluada analizando la capacidad de acumulación vacuolar canalicular (AVc) de los sustratos fluorescentes CGamF y glutatión metil-fluoresceína (GS-MF), respectivamente²⁰⁴. El compuesto CGamF es un análogo fluorescente de sal biliar selectivamente transportado por el transportador Bsep²⁰⁵, mientras que GS-MF es un sustrato específico de Mrp2 producido intracelularmente a partir del precursor permeable CMFDA por la acción secuencial de esterasas y glutatión-S-transferasas²⁰⁶.

Para realizar los estudios funcionales, luego de los pretratamientos, las células fueron lavadas dos veces con medio L-15, y después expuestas durante 15 min a 0,3 μ M CGamF o a 2,5 μ M CMFDA. Luego de esta incubación, se removió la CGamF o el CMFDA del medio, realizando dos lavados con medio L-15 a 4° C, y se examinó el porcentaje de duplas que exhibían fluorescencia canalicular, utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 25). Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital (Q-color5, Olympus America Inc, Center Valley, EE.UU). Finalmente, se determinó en 3 campos de microscopio (10 X) el porcentaje de duplas que mostraban fluorescencia verde visible en sus vacuolas canaliculares (AVc), analizando un total de, al menos, 300 duplas por preparación.

3.3.1.1.4. Estudios de microscopía confocal

Las DAH se cultivaron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos. Luego de los tratamientos, se fijaron con paraformaldehído al 3%, y se permeabilizaron con una solución amortiguadora conteniendo 0,2% Tritón X-100 y ASB al 3%. Para estudios de localización, se incubaron las células con un anticuerpo primario anti-MRP2 o anti-Bsep (12 hs), seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con Cy2 y Alexa Fluor 568-faloidina (2 hs). Para estudios de colocalización, se incubaron con anticuerpo primario anti-MRP2 y anticuerpos primarios anti-Rab5, anti-AP2 o anti-clatrina (12 hs), seguido de incubación con anticuerpos secundarios conjugados con Cy2 y Cy3. Finalmente, en ambas preparaciones, se incubó durante 5 min con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para teñir los núcleos celulares.

3.3.1.1.4.1. Localización de los transportadores Bsep y Mrp2

Se tomaron fotografías mediante microscopía confocal (Zeiss Pascal LSM 5, Carl Zeiss, Alemania). Se realizaron análisis densitométricos de las imágenes confocales cuantificando la intensidad de fluorescencia asociada a los transportadores a lo largo de una línea perpendicular al centro de la vacuola canalicular de 8 μ m de longitud (4 μ m hacia cada lado de la vacuola canalicular), mediante el programa Image J 1.50i²⁰⁷ (Figura 3.2). El espacio canalicular se identificó en las DAH inmunoteñidas con Bsep/Mrp2 por superposición de cada imagen

fluorescente con su imagen de contraste de fases correspondiente¹⁴⁹. Cada medición fue normalizada, de modo tal que la sumatoria de intensidades de fluorescencia de cada línea de 8 μm fue igual a 100 unidades arbitrarias. Se analizaron solamente los canalículos que medían entre 1 y 2,5 μm .

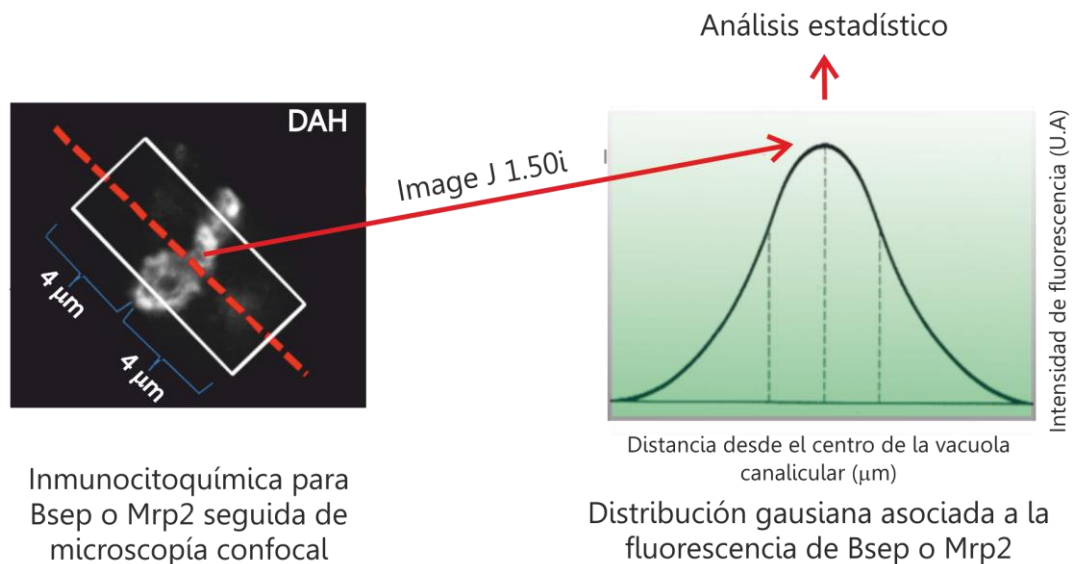


Figura 3.2. Análisis de imágenes para el estudio cuantitativo de la distribución de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 a lo largo de un eje transversal a la vacuola canalicular en DAH. Luego de la inmunocitoquímica para Bsep y Mrp2 en DAH, a partir de imágenes confocales se obtuvieron los perfiles de fluorescencia asociados a Bsep y Mrp2 mediante el software Image J 1.50i. La intensidad de la fluorescencia se cuantificó a lo largo de un eje perpendicular al centro de la vacuola canalicular, en una distancia de 8 μm (4 μm hacia cada lado desde el centro de la vacuola canalicular).

La distribución de la fluorescencia asociada a los transportadores a lo largo del eje transversal a la vacuola canalicular es de naturaleza gaussiana, con un máximo en el centro de la vacuola canalicular (Figura 3.2). El aplanamiento de dicha curva junto con un incremento de los valores de intensidad en zonas más alejadas del centro canalicular resulta indicativo de la internalización de los transportadores desde la membrana canalicular al cuerpo celular.

3.3.1.1.4.2. Colocalización entre Mrp2 y proteínas involucradas en la maquinaria endocítica

Se tomaron "stacks" de las DAH controles y tratadas con E17G mediante microscopía confocal (Zeiss Pascal LSM 5, Carl Zeiss, Alemania). Se analizaron las imágenes mediante el software Image J, y se estimó el porcentaje de colocalización del transportador canalicular Mrp2 con las proteínas AP2, clatrina y con el marcador de endosomas tempranos Rab 5, así como de dichas proteínas con el transportador. Se delimita el área en donde se encuentra Mrp2 y en la misma área se mide la colocalización con las proteínas de interés utilizando la operación "AND" dentro de "Image calculator" y se relativiza al total del transportador o al total de la proteína

clatrina, AP2 o Rab5 para el análisis inverso.

Para las fotografías se realizó una máscara de Mrp2 utilizando la herramienta "Binary", mientras que, para la correspondiente colocalización con clatrina, AP2 o Rab5, se utilizó la operación "AND" de la herramienta "Image Calculator", ambas del software Image J.

3.3.1.2. Cultivo primario de hepatocitos en sándwich de colágeno (CPHS)

Para la realización de los CPHS, los hepatocitos aislados se obtuvieron a partir de hígados de rata mediante la técnica de perfusión con colagenasa²⁰⁰. Brevemente, luego de la cateterización de la vena porta utilizando un catéter 14G (Abocath-T, Venisystem, Abocath Ireland Ltd., Sligo, Irlanda), se perfundió el hígado durante 10 min en un sistema no recirculante con solución de Hanks oxigenada (95 % O₂ / 5 % CO₂) libre de Ca²⁺, pH = 7,47-7,50, suplementada con HEPES (3 g/l) y EGTA (0,24 g/l), cambiándose luego el medio de perfusión a uno conteniendo la misma solución sin EGTA, suplementada con MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM y colagenasa tipo IV (4300 U/l) durante 9 min, a flujo constante de 20 ml/min. Finalmente, se removieron los hígados, y se aislaron las células por disociación mecánica mediante agitación suave con varilla de vidrio durante 3-4 min. Los hepatocitos se separaron de las células no parenquimatosas por centrifugación a baja velocidad (30 *g*, 2 min), seguida de 3 lavados consecutivos con solución de Hanks oxigenada conteniendo CaCl₂ 2,5 mM y Tris 5 mM. La preparación obtenida tuvo un rendimiento de aproximadamente 400-600 x 10⁶ hepatocitos por hígado.

La viabilidad celular fue evaluada mediante la prueba de exclusión del azul tripán. Este método está basado en que las células no viables, que han perdido la integridad de las membranas celulares, no son capaces de excluir el colorante, quedando teñidas de color azul, a diferencia de las células intactas que excluyen el colorante, observándose sin coloración y refringentes al microscopio óptico²⁰⁸. Para realizar esta prueba, se tomó 5 µL de la suspensión de hepatocitos y se diluyó en 50 µL de azul de tripán (1,3 g/L) y 95 µL de solución de Hanks, complementada con HEPES (3 g/L), MgSO₄ (1 mM) y CaCl₂ (2,5 mM). Una alícuota de esta preparación se colocó en una cámara de Neubauer y se observó al microscopio óptico, determinándose el porcentaje de hepatocitos viables. Al comenzar los experimentos, la viabilidad fue siempre mayor a 85 %.

Posteriormente, los hepatocitos fueron sembrados a una densidad de 4,5 x 10⁶ cél/mL en placas de 6 pocillos recubiertas con colágeno gelificado, al cual se le agregó DMEM 10X (10 % v/v) y se llevó a pH con NaOH 2 M. El medio DMEM de cultivo fue suplementado con 10 % de suero fetal bovino, insulina 4mg/mL, glucosa 2g/L, dexametasona 25 mM, gentamicina 10 mg/mL y una mezcla de los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomycinina (100 µg/mL), en

condiciones controladas de temperatura y humedad (37°C, 95 % O₂-5 % CO₂), en un incubador Forma Scientific (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EE.UU); luego de dos horas, se cambió el medio por DMEM modificado, descrito anteriormente, con una reducción en la concentración de glucosa a 1 g/L, y se cultivaron durante 24 hs. Luego, se agregó una segunda capa de colágeno gelificado, y se cultivaron los hepatocitos por 48 hs, tiempo al cual se realizaron los distintos tratamientos.

3.3.1.2.1. Tratamientos en CPHS

Para validar el modelo de CPHS para su utilización en el estudio de mecanismos de acción de compuestos que producen modificación del FB, se realizaron tratamientos con los agentes colestáticos E17G (25-200 µM) y TLC (1-2,5 µM), en medio de cultivo L-15, durante 30 min, o su vehículo (DMSO). Para evaluar la capacidad del AMPc de prevenir los efectos colestáticos de estos compuestos, se pre-incubó con DBAMPc (10 µM) por 15 min.

Para los experimentos de transfección con ARNi, se trató con E17G 200 µM, o con su vehículo en los controles, durante 30 min. Luego de los tratamientos mencionados, se agregó CMFDA (2,5 µM), precursor metabólico del sustrato fluorescente de Mrp2, glutatión-metilfluoresceína (GS-MF).

3.3.1.2.2. Técnicas aplicadas a CPHS

3.3.1.2.2.1. Estudios de actividad del transportador canalicular Mrp2

Se realizaron utilizando la metodología descrita por Nakanishi y col.¹⁹⁸, con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio²⁰⁹. Al cuarto día de cultivo se realizaron los tratamientos y luego se agregó CMFDA (5 µM) sobre una platina termostaticada en un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 25). Se evaluó la acumulación en los pseudocanalículos de GS-MF tomándose fotografías con una cámara digital a intervalos de 1 min durante 8 min. Utilizando el software ImageJ (NIH, EEUU), se seleccionaron entre 70 y 100 pseudocanalículos y se midió la intensidad promedio de fluorescencia en ellos en función del tiempo utilizando el complemento "*Stack T-Functions*", graficándose dichos datos y ajustándose mediante regresión lineal. La pendiente obtenida se consideró representativa de la "velocidad inicial de transporte" (VIT) de Mrp2.

3.3.1.2.2.2. Estudios de microscopía confocal

3.3.1.2.2.2.1. Evaluación de la localización de Bsep y Mrp2

Los CPHS se realizaron sobre cubreobjetos. Luego de los tratamientos se fijaron con paraformaldehído al 3 % en PBS durante 30 min, se bloquearon y permeabilizaron con 3 % de ASB y 0,5 % Tritón X-100 en PBS durante 30 min. Se incubaron con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Bsep (1:100) o un anticuerpo monoclonal de conejo anti-MRP2 (1:100) toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda. Luego se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario de burro, con anti-IgG de conejo conjugado con Cy2 (1:200) o con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (1:200). Para delimitar los canalículos, los filamentos de actina se tiñeron con faloidina Alexa Fluor 568 (1:100, 2 hs). Los núcleos celulares de los hepatocitos también fueron teñidos con DAPI 1,5 µM durante 10 min. Finalmente, las células fueron montadas y examinadas con el sistema de láseres confocales Zeiss Pascal LSM 5. Todas las muestras fueron validadas y calificadas de acuerdo a un criterio morfológico (presencia canalicular y longitud canalicular por célula). Al menos diez áreas de las imágenes obtenidas con células confluentes fueron seleccionadas al azar de cada placa de cultivo y se prosiguió al análisis densitométrico como se describió en el ítem 3.3.1.1.4.1.

3.3.1.2.2.2.2. Estudios morfológicos: ancho y volumen canalicular

Se realizaron CPHS donde se delimitó el canalículo mediante el marcaje inmunofluorescente de actina. El ancho canalicular fue estimado mediante el análisis de imágenes tomadas por microscopía confocal, utilizando el software Imaging NIS Elements Ar 4.0 (Nikon Instruments Inc.).

El volumen canalicular fue estimado mediante el análisis de "stacks" tomados por microscopía confocal. La estimación del volumen fue realizada utilizando el software Image J, utilizando el plugin "Object Counter 3D".

3.3.1.2.2.3. Knock-down de AP2

El modelo de CPHS fue utilizado para silenciar la expresión del AP2 y evaluar la actividad de Mrp2 y la localización de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 en dicha condición.

3.3.1.2.2.3.1. Diseño y síntesis de ARN de interferencia (ARNi) para AP2

Cuatro dúplex dirigidos al ARNm de la proteína adaptadora AP2 subunidad μ (ARNi 1 y 2) y subunidad α (ARNi 3 y 4), de ARN de 19 o 20 nucleótidos (ARNi) fueron diseñados utilizando

el programa de selección WIARNi²¹⁰ ARNi Selection Server: an automated ARNi oligonucleotide prediction server. El ARNi "scrambled" (SC) fue diseñado con una secuencia aleatoria a partir de uno de los nucleótidos de uno de los ARNi, en este caso del ARNi2. Los ANRi fueron sintetizados utilizando el Kit Ambion's Silencer™ ARNi. Las secuencias de los ARNi utilizados fueron las siguientes:

ARNi1: CATGCCTGCCATGCGCTTG

ARNi2: TTGACGCGAAAGGCATCCA

ARNi3: CTGGCCAGTGTGCACATGCT

ARNi4: TTTCCCTTAATTTGTAGG

3.3.1.2.2.3.2. Transfección de CPHS

Los CPHS se obtuvieron como se describió en el punto 3.3.1.2 con algunas modificaciones para producir el silenciamiento de AP2; antes del agregado de la segunda capa de colágeno se optimizó la transfección de los hepatocitos primarios mediante la adición de 5 µL de lipofectamina con una concentración de ARNi de 70 nM por pocillo, seguido de una incubación de 6 hs a 37 °C con medio de cultivo con el agregado de antibióticos (ampicilina + estreptomicina).

Después de la transfección, los hepatocitos se lavaron con medio L-15 y se recubrieron con colágeno gelificado como fue descrito para obtener la polarización de los hepatocitos y se continuó con el cultivo durante 48 hs.

3.3.1.2.2.3.3. Expresión de AP2 por Western blot (WB)

La efectividad de los ARNi sintetizados se evaluó mediante la determinación de la expresión de AP2 por WB en homogenado total a las 48 hs de la transfección con los 4 ARNi sintetizados. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% conteniendo dodecil-sulfato de sodio de alícuotas de lisado total con contenido equivalente de proteínas, determinadas por el método de Lowry²¹¹. Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a membranas de Immobilon-P, y se expusieron durante toda la noche a anticuerpos anti-AP2. Luego, fueron removidos de la membrana, y las mismas re-expuestas a un anticuerpo anti-β-actina como control de carga. Luego de la exposición al anticuerpo secundario correspondiente, y a un compuesto quimioluminiscente, las bandas fueron cuantificadas por densitometría, utilizándose para ello el programa ImageJ¹⁵³.

3.3.1.2.2.3.4. Viabilidad celular en la transfección

La actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue usada como una medida de viabilidad celular²¹². La liberación de LDH en el medio de cultivo fue medido después de 24 hs de la transfección con los ARNi utilizando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Cabe aclarar que las primeras 24 hs de la transfección son las más críticas debido a que la incubación con lipofectamina se hace conjuntamente con medio de cultivo con antibiótico, pudiendo éste ingresar a la célula y provocar daño celular.

3.3.2. Modelos *ex vivo* e *in vivo*

3.3.2.1. Hígado aislado y perfundido de rata (HAP)

Este modelo experimental se utilizó para verificar, en un contexto más fisiológico, los mecanismos caracterizados en los modelos *in vitro*, evitando a su vez los efectos extrahepáticos de los tratamientos que pudieran indirectamente afectar la función hepática.

3.3.2.1.1. Procedimiento quirúrgico en HAP

En ratas Wistar hembra adultas anestesiadas con uretano (1 g/Kg de peso corporal), se aisló y se canuló el conducto biliar con una cánula PE-10 (Intramedic, Clay Adams) y la vena porta con un catéter 14G. Luego, los hígados se perfundieron *in situ* a través de la vena porta, en un modelo no recirculante de un solo paso, con solución amortiguadora Krebs-Ringer bicarbonato a 37 °C, equilibrada con 5 % CO₂/95 % O₂, a una velocidad constante de 30 mL/min utilizando una bomba peristáltica (MasterFlex, Chicago, EE.UU.)¹⁵⁸. La solución de perfusión fue suplementada con TC (2,5 µM) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB, 0,5 µM), para luego realizar estudios de excreción biliar de TC (sustrato de Bsep) y dinitro-fenil-glutatión (DNF-G) (sustrato de Mrp2 que se produce intracelularmente a partir de la conjugación de CDNB con glutatión), como una medida de la actividad de ambos transportadores. Después de un período de 15 min, el cual permite obtener valores estables de flujo biliar basal, se realizaron los diferentes tratamientos que se describirán a continuación.

3.3.2.1.2. Tratamientos realizados en HAP

Para los experimentos de endocitosis, luego del periodo de 15 min de estabilización, se agregó al reservorio de perfusión el inhibidor de la vía endocítica clatrina dependiente MDC (100 µM) o su solvente (DMSO; 370 µL/L), y se mantuvo durante el resto del periodo de perfusión. Quince minutos después del agregado del inhibidor, se administró E17G (2

$\mu\text{mol/hígado}$) o su solvente (DMSO/10% ASB en solución salina), en una única inyección intraportal, administrada durante un periodo de 1 minuto.

Para los experimentos de fosfoproteómica, se recolectó bilis cada 5 minutos durante un período de 15 min (basal). A continuación, se administró el agente colestásico E17G mediante una inyección única intraportal ($2 \mu\text{mol/hígado}$, durante 1 minuto) o su solvente (DMSO/10% ABS en solución salina). La bilis fue luego recolectada a intervalos de 5 min durante un período de 20 min. En este momento se finalizaron los experimentos, obteniéndose muestras de tejido hepático las cuales fueron inmediatamente procesadas para su posterior utilización en los experimentos de fosfoproteómica.

Los experimentos fueron considerados válidos solamente cuando el FB basal fue mayor a $30 \mu\text{L/min/kg p.c}$ (aproximadamente $1 \mu\text{L/min/g hígado}$). El FB fue determinado gravimétricamente asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/mL .

3.3.2.1.3. Estudios funcionales de Bsep y Mrp2

El estado funcional de los transportadores Bsep y Mrp2 fue evaluado mediante la determinación de la excreción biliar de TC y de dinitrofenil-glutatión (DNP-SG, metabolito intrahepático de CDNB), respectivamente.

Se recolectó bilis en intervalos de 5 minutos desde el inicio de la perfusión hasta 20 minutos luego del agregado del compuesto colestásico. Los experimentos se consideraron válidos solo si el flujo inicial de bilis era superior a $30 \mu\text{L/min/kg}$ de peso corporal; el FB fue determinado gravimétricamente asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/mL . La viabilidad del hígado se evaluó monitoreando la liberación de LDH al perfusato; los experimentos con actividades enzimáticas superiores a 20 U/L fueron descartados.

3.3.2.1.3.1. Determinación de TC en bilis

El TC adicionado exógenamente es la única sal biliar que aparecerá en bilis, ya que las sales biliares endógenas fueron depuradas durante el período de estabilización de la perfusión, por lo que puede cuantificarse utilizándose una metodología general de cuantificación de sales biliares totales, tal como es el método de Talalay modificado por Berthelot²¹³. La técnica consiste en la reducción de las sales biliares por medio de la enzima 3- α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y oxidando NAD^+ a NADH, y determinando la producción de NADH espectrofotométricamente.

Para cada muestra de bilis recolectada, se colocó en un tubo tipo "Khan" $2 \mu\text{L}$ de bilis,

100 μ L de hidrato de hidracina 1 M, 50 μ L de β -NAD⁺ 5 mM, 100 μ L de preparación enzimática (3- α hidroxisteroide deshidrogenasa) 0,4 U/mL y 700 μ L de solución de pirofosfato de sodio 0,1 M, dejando en agitación por 50 min a temperatura ambiente y luego se leyó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Pelkin Elmer Lambda2S (Waltham, Massachusetts, EE.UU); el resultado fue asumido como concentración de TC. La excreción de TC fue calculada como el producto entre el flujo biliar y la concentración biliar de esta SB.

3.3.2.1.2. Determinación de DNP-SG en bilis

El contenido total de DNP-SG fue medido en bilis mediante su detección espectrofotométrica asociada a su separación por HPLC, utilizando un equipo Waters 600 HPLC Pump (Milford, EE.UU.)²¹⁴. Cada muestra de bilis recolectada, luego de haber sido desproteinizada por precipitación con ácido perclórico al 70 % v/v, corrió con una fase móvil de acetonitrilo al 25% P/V con ácido fosfórico al 0,1 % P/V, a un flujo de 1 mL/min, en una columna de tamaño 250 x 4,6 mm Phenomenex (CosmoBio, Bs. As., Argentina), detectándose el pico de DNP-SG midiendo la absorbancia a 365 nm. La velocidad de excreción de DNP-SG se calculó como el producto entre el flujo biliar y la concentración biliar del sustrato.

3.2.2.1.4. Estudios de localización de transportadores canaliculares en HAP

Al final del periodo de perfusión, un lóbulo del hígado se cortó, se congeló inmediatamente en isopentano pre-enfriado en nitrógeno líquido, y se almacenó a -70°C¹¹³ para posteriores estudios de inmunofluorescencia y análisis por microscopia confocal de la localización intracelular de Mrp2 y Bsep. Se realizó una tinción de ocludina para demarcar los límites del canalículo en las muestras teñidas para Mrp2 o Bsep^{116,158}.

Los cortes de hígado, obtenidos con un micrótopo crióstato Zeiss Microm HM500, fueron secados al aire y fijados con paraformaldehído al 3% para los estudios de co-tinción de los transportadores y ocludina. Luego de la fijación, los cortes de hígado fueron incubados toda la noche con anticuerpos específicos para Bsep, Mrp2, y ocludina (1:100), seguido de una incubación de 1 hora con anticuerpos anti-IgG de ratón o de conejo conjugados con Cy2 o Cy3 (1:200).

Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss Pascal LSM 5. Para asegurar una tinción y captura de imagen comparable para los diferentes grupos experimentales, los cortes de hígado se prepararon el mismo día, se montaron sobre el mismo portaobjeto y se los sometió al procedimiento de tinción y análisis de microscopia confocal simultáneamente. El análisis de las imágenes para evaluar el grado de internalización endocítica de Bsep y Mrp2 se llevó a cabo con el programa ImageJ, tal como se describió previamente para

DAH (ver ítem 3.3.1.1.4.1 y Figura 3.2).

3.3.2.1.5. Fosfoproteómica y Bioinformática

Se realizaron estudios de Fosfoproteómica y Bioinformática en la Unidad de Proteómica, Genómica y Bioinformática del CIMA (Centro de Investigaciones Médicas Aplicadas) de la Universidad de Navarra, España, bajo la dirección del Dr. Ferrnando Corrales, con la finalidad de identificar posibles blancos moleculares de E17G compatibles con proteínas intracelulares relevantes al proceso de endocitosis y tráfico vesicular, y que pudieran sufrir cambios en su estado de fosforilación como resultado de la activación inducida por este agente colestásico de vías de señalización mediadas por proteínas quinasas o fosfatasa.

3.3.2.1.5.1. Extracción de proteínas y enriquecimiento en fosfoproteínas

Se homogenizaron cortes de hígado con buffer EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 2 mM, Tris 20 mM, adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los homogenados fueron luego liofilizados, para realizar los experimentos que se detallan a continuación. Tres muestras de experimentos independientes fueron procesadas para cada grupo experimental (control y E17G).

Se resuspendieron las muestras en DTT 40 mM, se eliminaron las sales por pasaje a través de columnas de diálisis HiTrap Desalting columns (GE Healthcare) y se enriquecieron en fosfoproteínas utilizando el kit comercial Pierce Phosphoprotein Enrichment (Thermo Scientific). Además, se realizó una limpieza de las muestras con ReadyPrep 2D Cleanup kit y se resuspendieron las mismas en un buffer conteniendo urea 7 M, tiourea 2 M, CHAP 4% y DTT 40 mM. Se siguieron las instrucciones del fabricante en el uso de los kits comerciales mencionados anteriormente.

3.3.2.1.5.2. Marcaje, corrida en gel bidimensional (2D), análisis de imágenes y digestión de las fosfoproteínas

El marcaje de las muestras se realizó con los fluoróforos Cy2, Cy3 o Cy5 correspondientes con el kit comercial Refraction 2D Labeling Kit según las recomendaciones del fabricante, y se corrió un gel 2D toda la noche (80 V, constante). Por cada gel, se corrieron dos muestras y un patrón interno, conformado por un "pool" de todas las muestras a analizar.

Luego de la electroforesis, se escanearon los geles con TyphoonTM Trio Imager (GE Healthcare) a 100 nm de resolución con $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ de 488/520, 532/580, y 633/670 nm para Cy2, Cy3, y Cy5, respectivamente. El análisis de las imágenes correspondientes a los geles

escaneados, con la finalidad de detectar "*spots*" estadísticamente diferentes entre grupos se efectuó con el software DeCyder 6.5 (GE Healthcare). Los "*spots*" estadísticamente diferentes en su intensidad de fluorescencia entre los grupos control y E17G fueron considerados para su análisis mediante espectrometría de masas.

Se tiñeron los geles con SYPRO Ruby (Invitrogen), colorante que tiñe específicamente fosfoproteínas, para la detección y picado de los *spots* seleccionados bajo luz UV en cuarto oscuro. Por último, la digestión de las proteínas de los *spots* seleccionados se llevó a cabo utilizando tripsina.

3.3.2.1.5.3. Espectroscopia de masas y análisis bioinformático

Los péptidos purificados se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF; el análisis se realizó utilizando un espectrómetro LC-MS / MS Q-TRAP 5500 (ABSciex). La adquisición de datos se realizó mediante Analyst 1.5.2 (AB Sciex) y se sometió al Protein Pilot software (ABSciex) contra la base de datos UniProt/swiss-Prot, utilizando el algoritmo Paragon y los parámetros de búsqueda preestablecidos para QTRAP. Para las identificaciones, se aceptaron aquellas con un "unused" mayor de 2, lo cual garantiza un 99% de confianza en la identificación.

Para establecer posibles vías de interacción entre las proteínas identificadas, se utilizó el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, www.ingenuity.com/products/ipa). IPA integra el conocimiento existente en bases de datos sobre los genes, fármacos, productos químicos, tipos de proteínas, procesos y vías, en función de sus interacciones derivadas de la Base de Datos de Ingenuity Pathways²¹⁵.

3.3.2.2. Estudios en animal entero

3.3.2.2.1. Cirugía

Se anestesiaron los animales con uretano (1g/Kg peso corporal), y se cateterizaron la vena femoral y el conducto biliar común con catéteres PE 50 y PE 10, respectivamente. Luego de recoger bilis durante un período de 10 min (basal), se les administró a ambos grupos de animales E17G (15 $\mu\text{mol/kg}$ en DMSO/10 % ASB en solución fisiológica), o su vehículo, por vía vena femoral. Se recogió bilis a intervalos de 5 min hasta los 20 min luego de la administración del E17G, momento en que se extrajo el hígado, se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, para su posterior procesamiento.

3.3.2.2.2. Obtención de membranas plasmáticas

A partir de homogenados de hígado, se centrifugó a 500 *g* 10 min para liberar la preparación de los núcleos, y se prepararon por ultracentrifugación diferencial en gradiente de sacarosa fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas e intracelulares²¹⁶. Para obtener la fracción enriquecida en membranas plasmáticas, a 1 mL de sobrenadante post-nuclear se le agregó 2,85 mL de sacarosa 2 M, de modo de llegar a una concentración final de 1,3 M. Se generó un gradiente discontinuo de sacarosa agregando cuidadosamente 2 mL de sacarosa 0,3 M sobre la preparación anterior, y se centrifugó 1 h a 200.000 *g* a 4°C.

Se removi6 la banda localizada en la interfase del gradiente, correspondiente a las membranas plasmáticas y se diluy6 en agua suplementada con inhibidores de proteasas, hasta una concentración final de sacarosa 0,3 M. Luego se centrifug6 1 h a 200.000 *g* a 4 °C. El pellet de membranas plasmáticas se resuspendió en sacarosa 0,3 M con inhibidores de proteasas y se congel6 a -70°C.

3.3.2.2.2.1. Preparación de fracciones de membrana solubles (*no rafts*) e insolubles en detergente (*rafts*)

Las vesículas de membrana plasmática 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 Trit6n X-100 1% y fueron incubadas en hielo durante 30 min²¹⁷. Los pellets fueron resuspendidos en un buffer de solubilización (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 5 mM EDTA y 1% SDS) y homogenizados. Luego de su precipitación con acetona, las fracciones solubles (*no rafts*) e insolubles (*rafts*) fueron procesadas para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y posterior WB.

3.3.2.2.3. Análisis de la expresión de proteínas por WB

Las fracciones de membrana obtenidas se solubilizaron en un buffer de muestra con agentes reductores durante 10 min a 60°C, y se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de doble densidad (8 y 12 %) ²¹⁸. Luego, las proteínas presentes en los geles se transfirieron eléctricamente a membranas de polivinil difluoruro (PVDF, Perkin Elmer Life Sciences) durante 1 h, a voltaje constante de 100 mV, utilizando un equipo comercial (Mini-Trans Blot Cell, Bio Rad). Las membranas de PVDF se bloquearon luego en leche al 10 % en PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1 %), durante 60 min a temperatura ambiente, y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios dirigidos contra clatrina (1:2500), caveolina-1 (1:2500), Bsep (1:1000) y Mrp2 (1:1000).

Las proteínas inmovilizadas 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 X-OMAT AR). Posteriormente, las bandas se cuantificaron por densitometría (Gel-Pro Analyzer; Media Cybernetics).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar (ES). El análisis estadístico se realizó utilizando el test de análisis de variancia de una vía (*one-way* ANOVA), seguido del test de Newman-Keuls para la comparación entre grupos. Las variancias de los perfiles densitométricos de fluorescencia asociados a Bsep y Mrp2 en DAH y HAP, bajo distintas condiciones, se compararon usando el test de Mann-Whitney. El test t-Student se utilizó para comparación entre dos grupos.

Las variancias de los perfiles densitométricos de la localización de Bsep y Mrp2 fueron comparados con el test de Mann-Whitney U. Los cuatro parámetros de las curvas dosis-respuesta fueron comparados usando el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos).

Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

4.1. VALIDACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS EN SÁNDWICH DE COLÁGENO (CPHS) COMO MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE ALTERACIONES SECRETORAS BILIARES

4.1.1. La velocidad inicial de transporte (VIT) es un parámetro sensible para detectar cambios en la actividad de Mrp2 inducidos por compuestos colestásicos y coleréticos

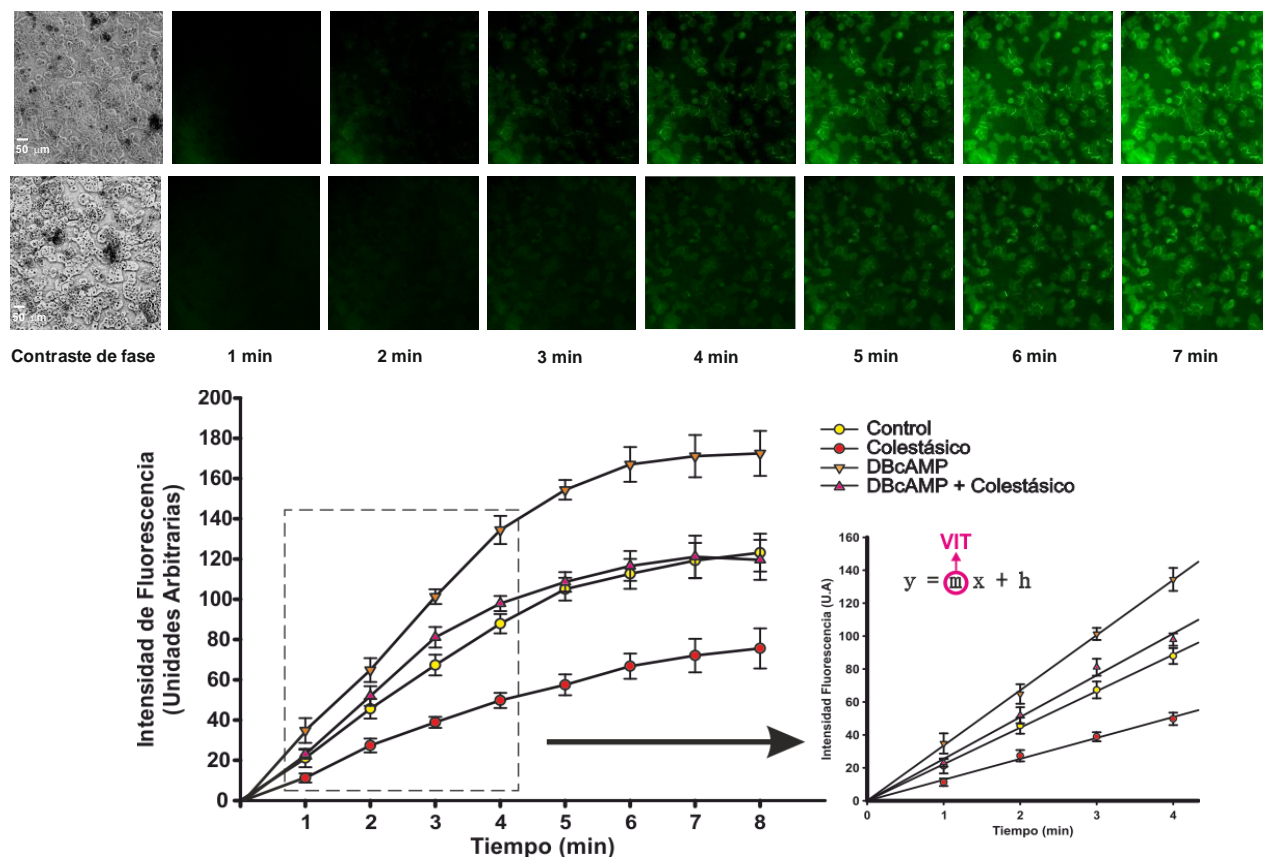


Figura 4.1: A. Imágenes representativas de transporte canalicular de GS-MF en CPHS en tiempo real. Las imágenes representativas del transporte de GS-MF fueron tomadas por microscopía de fluorescencia luego del agregado de CMFDA a CPHS control o expuestas a los agentes colestásicos E17G (200 μM) y TLC (2,5 μM) durante 30 min. Las secuencias representativas muestran la diferencia de intensidad de fluorescencia entre los grupos a diferentes tiempos. B. Curvas representativas de intensidad de fluorescencia canalicular asociada a GS-MF. Las curvas han sido obtenidas graficando el promedio de fluorescencia asociado a 70-100 pseudocanalículos vs. tiempo. El promedio de intensidad de fluorescencia fue estimado con el software ImageJ. CPHS fueron expuestos al vehículo (DMSO, control) o a DBAMPc (10 μM) por 15 minutos, o tratados con los agentes colestásicos (E17G 200 μM o TLC 2,5 μM) durante 30 minutos con o sin pretratamiento con DBAMPc o DMSO. Entre 70-100 pseudocanalículos fueron seleccionados por imagen ($n = 6$, de 3 preparados de CPHS independientes) para calcular el promedio de la intensidad de la fluorescencia. Para calcular la actividad del transportador Mrp2, se seleccionó la zona lineal de cada curva (1-4 min, zona delineada), y se realizó un ajuste mediante regresión lineal ($r^2 > 0,98$, $p < 0,001$, gráfico derecho). La pendiente de la curva representa la "velocidad inicial de transporte" (VIT) de GS-MF. Los datos son promedio \pm ES.

La Figura 4.1 A muestra imágenes representativas del aumento en función del tiempo de la fluorescencia asociada a GS-MF dentro de los pseudocanalículos de CPHS bajo condiciones control, o después de la incubación con los compuestos colestásicos E17G o TLC, en CPHS pretratados o no con DBAMPc. Las alteraciones en el transporte canalicular mediado por Mrp2

pueden ser visualizadas como un retraso en la aparición de fluorescencia intracanalicular asociada a GS-MF; mientras que la señal de fluorescencia ya es visible a los 2 minutos después de la adición de CMFDA en los controles, se observa un minuto más tardío en los CPHS tratados con el compuesto colestásico.

Los cambios en función del tiempo de la fluorescencia promedio acumulada en los canalículos se muestran en la Figura 4.1 B. La "velocidad inicial de transporte" (VIT) se calculó con la pendiente de las curvas de regresión, teniendo en cuenta los puntos de la curva donde la intensidad de fluorescencia mostró un incremento lineal (1-4 min, zona demarcada en el panel izquierdo). El gráfico en el panel derecho muestra las curvas de regresión calculados a partir de los puntos dentro de este lapso temporal; se observa que los compuestos colestásicos inducen una clara disminución de la pendiente de la curva de regresión, y que ésta es prevenida por pre-incubación con DBAMPc, compuesto que aumenta *per se* este parámetro.

Se llevaron a cabo estudios de concentración-respuesta, mediante la variación de la concentración de los compuestos colestásicos en el medio de incubación (25 a 200 μM para E17G y 1-2,5 μM para TLC). Tanto E17G (Figura 4.2 A) como TLC (Figura 4.2 B) disminuyeron significativamente la VIT de GS-MF a partir de una concentración de 50 y 1,5 μM , respectivamente. Incrementos en la concentración tanto de E17G como de TLC produjeron una tendencia hacia una disminución mayor de la VIT, aunque este cambio no alcanzó significancia estadística.

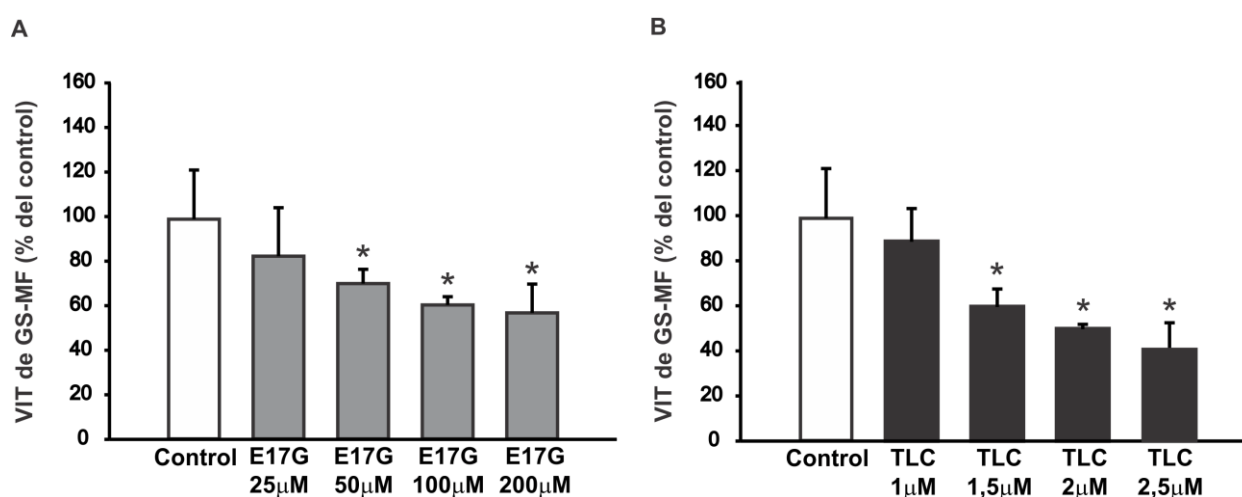


Figura 4.2: Efecto concentración-respuesta del transporte canalicular de GS-MF luego de la exposición a un agente colestásico. CPHS fueron expuestos a diferentes concentraciones de E17G (25-200 μM panel A) o TLC (1-2,5 μM panel B), por 30 min. La pendiente de la curva fue obtenida graficando el promedio de fluorescencia de 70-100 pseudocanalículos asociado a GS-MF vs. tiempo, y fue utilizada para estimar la VIT de GS-MF, medida asociada a la actividad de Mrp2. Los valores de VIT fueron expresados como porcentaje del valor del control ($n = 6$, de 3 preparados de CPHS independientes). * $p < 0,05$ vs. Control. Los datos son promedio

Del análisis estadístico de los valores de VIT (Figura 4.3), se hace evidente que este parámetro refleja adecuadamente los cambios esperados en la función de transporte de Mrp2

en respuesta a los diferentes tratamientos. Así, VIT disminuye por la acción de E17G, un compuesto colestásico que induce en una rápida internalización endocítica de Mrp2 tanto *in vivo*¹¹³ como en DAH¹⁴⁹. Por otro lado, la VIT se incrementa en respuesta al tratamiento con DBAMPc, un hallazgo en concordancia con la propiedad bien establecida del AMPc para estimular la re inserción rápida de Mrp2 al dominio apical^{88,206,204}. Por último, el tratamiento previo con DBAMPc impidió totalmente la disminución de la VIT inducida por E17G, en concordancia con la capacidad de DBAMPc para contrarrestar el efecto inducido por E17G en la función de transporte Mrp2 tanto *in vivo*¹¹³ y en DAH¹⁴⁹. Una disminución similar en VIT inducida por E17G se registró después de la incubación de CPHS con el agente colestásico TLC, efecto que también fue prevenido por el pre-tratamiento con DBAMPc. De nuevo, estos cambios se correlacionan con los reportes anteriores que muestran que TLC afecta de forma aguda la función de transporte de Mrp2, tanto *in vivo*²¹⁹ como en DAH^{149,188,186}.

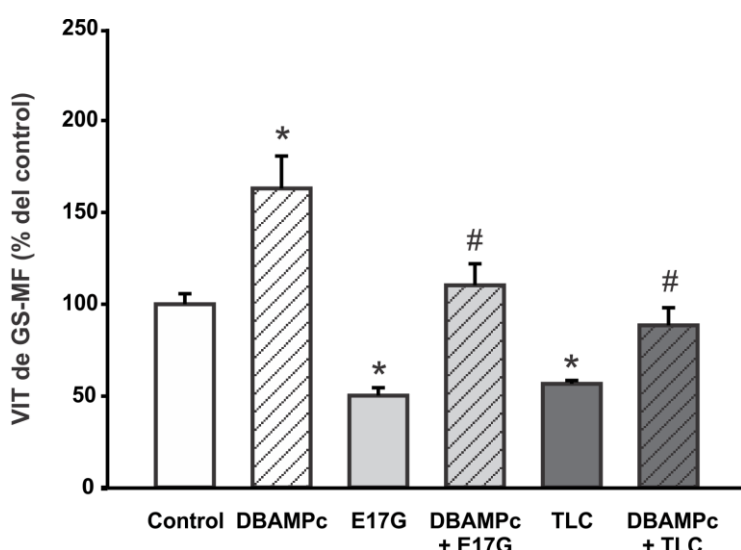


Figura 4.3: Pretratamiento con DBAMPc incrementa la VIT de GS-MF y previene la disminución inducida por el E17G o TLC. CPHS fueron pre incubados con DBAMPc 10 μ M por 15 min, y luego expuestos a E17G 200 μ M o TLC 2.5 μ M por 30 min. La pendiente de la curva fue obtenida graficando el promedio de la fluorescencia de 70-100 pseudo-canalículos asociada a GS-MF vs. tiempo, y fue utilizada para estimar la VIT de GS-MF, medida del transporte de asociada a Mrp2. Los valores de VIT fueron expresados como porcentajes del valor del control ($n = 6$, de 3 preparados de CPHS independientes). * $p < 0.05$ vs. Control; # $p < 0.05$ vs. el grupo colestásico respectivo. Los datos son promedio \pm ES.

4.1.2. El incremento de la VIT de GS-MF inducida por DBAMPc y la prevención mediada por el mismo de la alteración inducida por agentes colestásicos están asociados con cambios en la localización de Mrp2

Estudios previos realizados por nuestro grupo y otros acerca de los efectos colestásicos de E17G y TLC tanto *in vivo*¹¹³, en HAP¹¹⁵ y en DAH¹⁴⁹, así como su prevención por DBAMPc, han demostrado que el grado de internalización endocítica de Mrp2 se ve sistemáticamente reflejado en la actividad del transporte de Mrp2.

Para corroborar si los cambios en la función de transporte Mrp2, evaluados por la VIT de GS-MF, también son consecuencia de cambios en la localización de Mrp2 en el modelo en estudio, se realizaron inmunotinciones seguidas de microscopía confocal de este transportador.

La figura 4.4 muestra imágenes confocales de CPHS incubados con E17G y TLC, en presencia o ausencia de DBAMPc. La F-actina se utilizó para delimitar los límites de la membrana canalicular (rojo), ya que la misma forma una red de distribución pericanalicular en los hepatocitos polarizados¹⁰⁸. El transportador Mrp2 se muestra en verde.

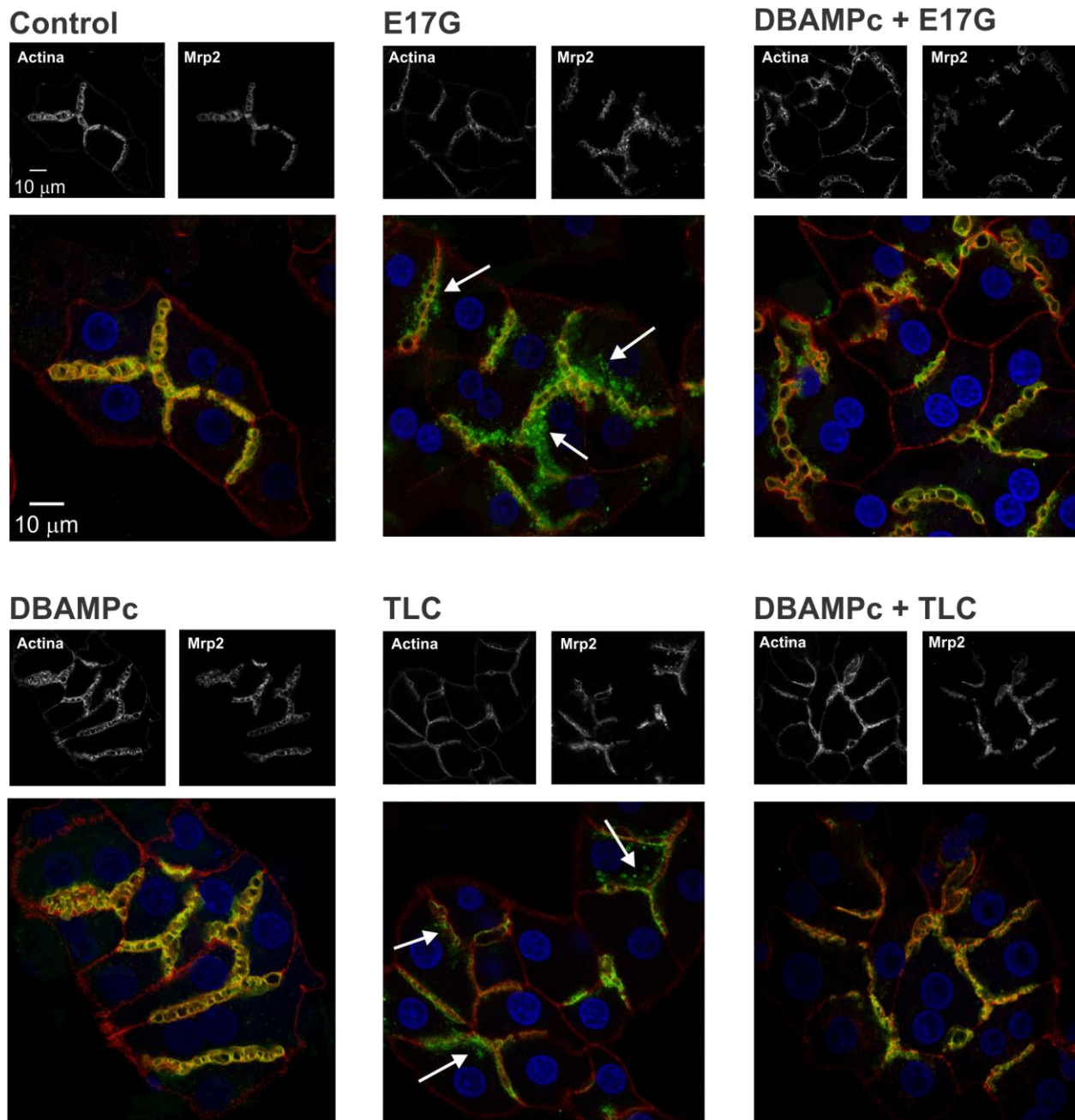


Figura 4.4: DBAMPc previene la internalización endocítica de Mrp2 inducida por E17G y TLC en CPHS. Imágenes confocales representativas muestran la distribución celular de Mrp2, F-actina y la combinación de ambas (Mrp2 en verde, F-actina en rojo y núcleo en azul) en CPHS bajo diferentes tratamientos. Bajo condiciones control, la fluorescencia asociada a Mrp2 está mayormente localizada en el área de la membrana canalicular, delimitada por la red de actina pericanalicular. Los compuestos colestáticos E17G y TLC inducen una clara internalización de vesículas de Mrp2, más allá de los límites de la actina pericanalicular (flechas blancas); este fenómeno es significativamente prevenido por la pre-incubación con DBAMPc 10 μ M. Ninguno de los tratamientos afecta la distribución normal de F-actina, la cual muestra una distribución predominantemente pericanalicular.

La imagen representativa del grupo control muestra que Mrp2 se distribuye principalmente dentro del espacio canalicular delimitado por actina. Los CPHS tratados con DBAMPc exhiben el mismo patrón de distribución. Por otra parte, los tratamientos con E17G y TLC inducen internalización de Mrp2 desde la membrana canalicular hacia compartimientos endosomales pericanaliculares (flechas blancas). Por último, se observa que, en aquellos grupos pre-tratados con DBAMPc, se previene la internalización del transportador inducida por los compuestos colestásicos.

4.1.3. Los diferentes tratamientos modifican el ancho y el volumen de los pseudocanalículos en CPHS

Los canalículos en los CPHS son espacios sellados sin drenaje, motivo por el cual los cambios en el FB pueden reflejarse en cambios en su volumen medio, producto de su distensión. Esta relación ha sido previamente demostrada en otros modelos polarizados hepatocelulares tales como DAH²²⁰ y células HepG2⁴⁰ que, al igual que los CPHS, presentan sellado su espacio luminal. Además, tal fenómeno fue empleado con éxito para cuantificar la formación de bilis canalicular *in vitro*, lo que nos llevó a determinar si esto también es válido en el modelo de CPHS.

La estimación del volumen canalicular en CPHS es algo laboriosa, ya que requiere la adquisición de un *stack* de imágenes confocales y una reconstrucción 3D de los canalículos mediante un software informático. Por el contrario, la estimación del ancho promedio canalicular es más accesible, ya que puede ser fácilmente calculada a partir de imágenes confocales 2D convencionales. Por lo tanto, se evaluó en el modelo CPHS la posibilidad de usar el ancho promedio canalicular como parámetro sustituto del volumen medio canalicular para la cuantificación rápida de los cambios en el volumen canalicular debido a la formación de.

	Ancho canalicular (μm)	Volumen canalicular (μm^3)
Control	2.9 \pm 0.2	4587 \pm 493
DBAMPc	4.0 \pm 0.2*	7113 \pm 562*
E17G	2.4 \pm 0.1*	2743 \pm 247*
E17G+DBAMPc	3.2 \pm 0.1#	4295 \pm 345#
TLC	2.5 \pm 0.1*	3250 \pm 281*
TLC+DBAMPc	3.3 \pm 0.2#	4579 \pm 181#

Tabla 4.1: Cambios en el ancho y volumen canalicular de los CPHS inducidos por diferentes tratamientos. El ancho canalicular fue estimado con NIS-Elements Ar 4.0 software en imágenes confocales 2D, y la estimación del volumen canalicular fue llevada a cabo con el software ImageJ en stacks confocales 3D. Entre 20 y 30 canalículos por grupo experimental fueron medidos de 3 preparaciones experimentales diferentes. * p < 0,05 vs. control. # p < 0,05 vs. E17G o TLC. Los datos son promedio \pm ES.

Como se muestra en la Tabla 4.1, la exposición a DBAMPc dio lugar a un aumento significativo de ambos parámetros, mientras que la exposición tanto a E17G como a TLC indujo un descenso significativo de los mismos. Por otro lado, el tratamiento previo con DBAMPc previno completamente la disminución de estos parámetros debido a la exposición a los agentes colestásicos.

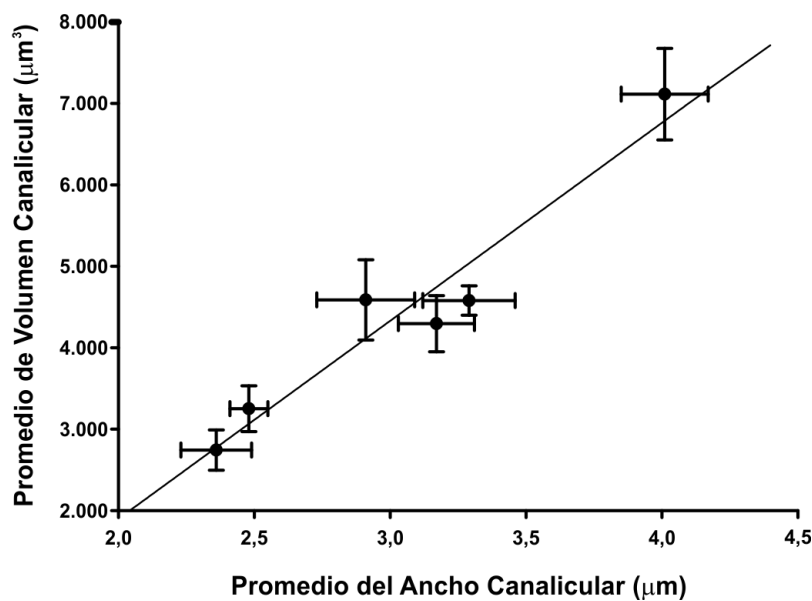


Figura 4.5: Correlación entre ancho y volumen canalicular. Se realizó la correlación entre los valores estimativos de ancho canalicular vs. volumen canalicular de los grupos en estudio. Entre 20 y 30 canalículos por grupo experimental fueron medidos de 3 preparaciones experimentales diferentes. $r^2 = 0.92$. Los datos son promedio \pm ES.

Se obtuvo una correlación altamente significativa entre ambos parámetros cuando se realizó el análisis de correlación entre ambos ($r^2 = 0,92$; $p < 0,002$) (Figura 4.5). A partir de estos resultados, es evidente que cualquiera de los dos parámetros pueden ser utilizados para realizar el ajuste de la VIT en el modelo de CPHS, sustentando el uso del ancho promedio del canalículo como una alternativa más sencilla y rápida para estimar los cambios en volumen canalicular en CPHS.

4.1.4. La VIT corregida en función del ancho canalicular es un buen estimador de la velocidad de excreción canalicular en CPHS

La VIT, calculada como se ha descrito anteriormente, denota solamente el incremento inicial en la concentración canalicular del sustrato fluorescente con el tiempo. Una medida más apropiada de la actividad de un transportador canalicular es la velocidad de excreción del sustrato fluorescente, la cual representa la cantidad (y no la concentración) de un sustrato que se excreta hacia la bilis por unidad de tiempo. Este parámetro, que *in vivo* se calcula como el producto entre el FB y la concentración de un sustrato en bilis, se calcularía aquí como el producto entre la VIT del sustrato (directamente proporcional a la concentración del mismo) y el

ancho o volumen canalicular promedio (parámetro que sería proporcional al FB generado *in vitro*, y análogo al FB producido *in vivo*).

	VIT (% de cambio referido al control)		
	<i>Sin corrección</i>	<i>Corregido por Ancho</i>	<i>Corregido por Volumen</i>
DBAMPc	+ 60 ± 18*	+ 125 ± 24*†	+ 153 ± 28*†
E17G	- 50 ± 4*	- 59 ± 4*†	- 70 ± 3*†
E17G+DBAMPc	+ 10 ± 12#	+ 20 ± 13#	+ 3 ± 11#
TLC	- 43 ± 2*	- 52 ± 2*†	- 60 ± 1*†
TLC+DBAMPc	- 12 ± 10#	0 ± 11#	-12 ± 10#

Tabla 4.2: Efecto de las correcciones por ancho y volumen canalicular en los valores de VIT bajo los distintos tratamientos. Los valores de VIT mostrados en la figura 3 fueron corregidos multiplicando el promedio del valor calculado por el promedio del ancho o volumen canalicular. Los valores de VIT calculados y corregidos fueron presentados como porcentaje de cambio referido al respectivo control. * p < 0,05 vs. control. # p < 0,05 vs. E17G o TLC. † p < 0,05 vs. valor no corregido. Los datos son promedio ± ES (n = 6, de 3 preparados distintos).

La Tabla 4.2 muestra los cambios porcentuales de la VIT en CPHS sometidos a los diferentes tratamientos, comparado con el control. La corrección de VIT por cualquiera de los dos parámetros estudiados modificó significativamente el patrón de cambios en la VIT sin corrección en CPHS tratados con E17G o TLC. De hecho, los porcentajes de disminución de la VIT observados tanto en los grupos E17G como TLC fueron más altos que los obtenidos sin corrección, alcanzando valores que no difieren de aquellos sin corrección cuando estos grupos fueron tratados previamente con DBAMPc. La corrección se hizo crítica cuando estimamos la excreción canalicular del soluto en condiciones coléricas. Mientras que, en el grupo DBAMPc, la VIT aumentó un 63 %, este incremento fue mucho mayor cuando se realizó la corrección por ancho o volumen (125 % y 153 %, respectivamente). Se pueden observar las mencionadas diferencias en la Figura 4.6.

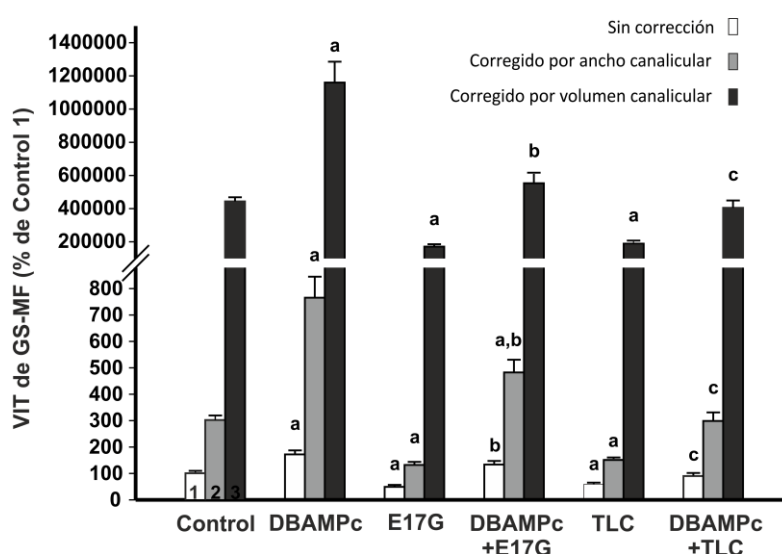


Figura 4.6: Corrección de las VIT de GS-MF. Las VIT de GS-MF de los grupos sin corregir y corregidos por ancho y volumen canalicular fueron relativizados con respecto al Control 1, considerando un valor de 100 para el mismo. ^aSignificativamente diferente de los respectivos controles, ^bsignificativamente diferente del grupo E17G correspondiente, y ^csignificativamente diferente del grupo TLC correspondiente (p<0.05, n = 6, de 3 preparaciones independientes). Los datos son promedio ± ES.

Como se muestra en la Figura 4.7, cuando los valores individuales de VIT pertenecientes a todos los grupos experimentales corregidos por el volumen se grafican en función de su valor correspondiente de corrección por el ancho, se encuentra una fuerte correlación ($r^2 > 0,98$; $p < 0,001$). Esto confirma la viabilidad de la utilización del ancho canalicular como una forma sencilla de corregir la VIT, y estimar mejor la tasa de excreción biliar bajo tratamiento con compuestos que afecten la tasa de producción de bilis canalicular.

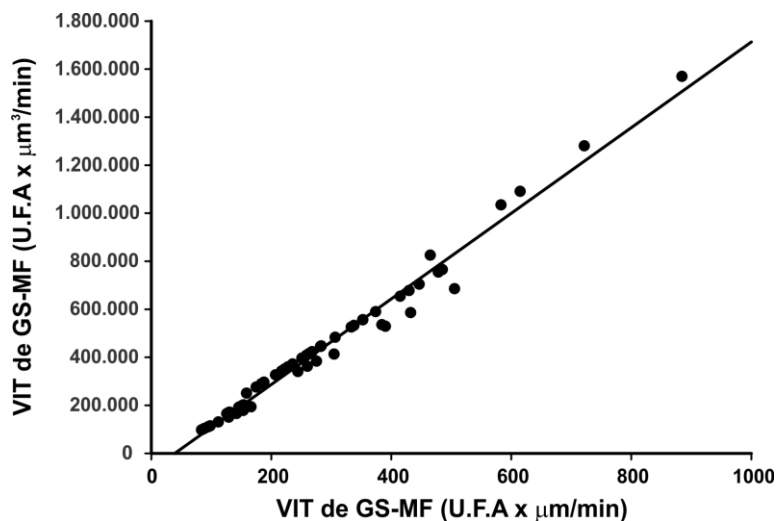


Figura 4.7: Correlación entre los valores de VIT corregidos por ancho y volumen canalicular. Los valores de VIT de GS-MF (U.F.A/min) fueron corregidos por ancho (U.F.A x $\mu\text{m}/\text{min}$) y por volumen (U.F.A x $\mu\text{m}^3/\text{min}$), se correlacionaron los valores y se realizó el análisis de regresión. Entre 20 y 30 canalículos por grupo experimental fueron medidos, de 3 preparaciones independientes. Los datos fueron expresados como el promedio \pm ES y la línea de correlación fue graficada ($r^2 = 0.98$, $p < 0.001$).

4.2. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS ENDOCÍTICOS DE TRANSPORTADORES CANALICULARES EN COLESTASIS POR E17G

4.2.1. La alteración inducida por E17G en la función de transporte de Bsep y Mrp2 depende de la integridad de clatrina y no de caveolinas

La actividad de los transportadores Bsep y Mrp2 en las DAH fue evaluada analizando la AVc de los sustratos fluorescentes CGamF y glutatión metil-fluoresceína (GS-MF), respectivamente^{201,204}. En la Figura 4.8, se observa que la disminución en la AVc de CGamF y GS-MF inducida por E17G es prevenida por la inhibición específica de la endocitosis mediada por clatrina, tanto por exposición a monodansilcadaverina (MDC), un inhibidor específico de esta vía, como aplicando un protocolo de depleción de K^+ . En cambio, cuando se trata a las DAH con el compuesto filipina, un inhibidor específico de la endocitosis mediada por caveolinas, se observa una disminución significativa en la AVc de ambos fluoróforos con respecto al control, de igual magnitud que la inducida por E17G. Vale la pena señalar que se realizaron los controles pertinentes con los inhibidores a la concentración empleada, siendo los resultados similares al control (datos no mostrados).

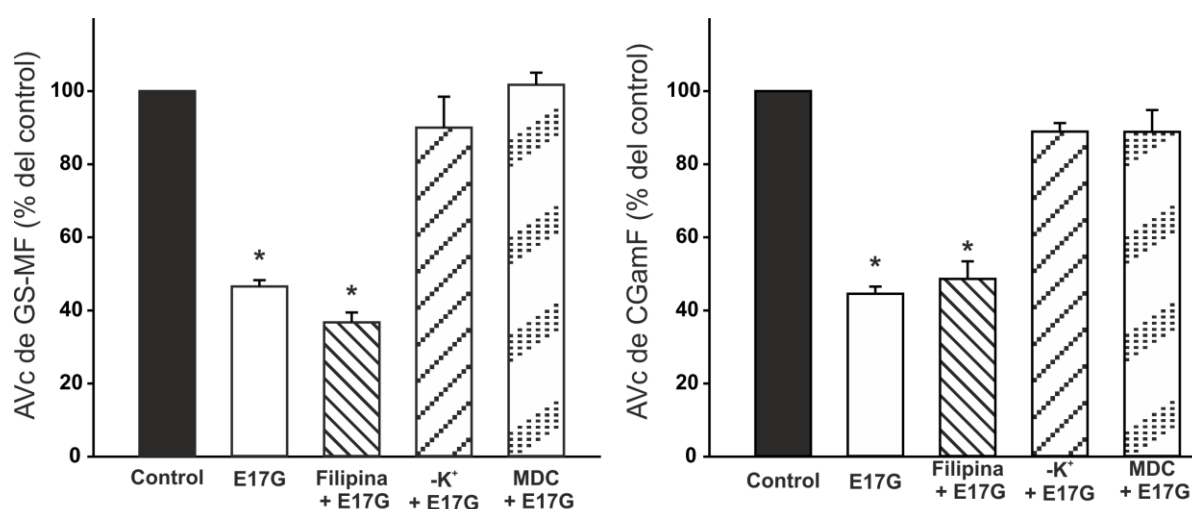


Figura 4.8: Efecto de inhibidores de la endocitosis clatrina o caveolina dependiente en la acumulación vacuolar canalicular (AVc) de GS-MF (sustrato de Mrp2, *panel A*) y de CGamF (sustrato de Bsep, *panel B*). DAH fueron pre-incubadas durante 15 minutos con el vehículo DMSO (control), un inhibidor de la vía dependiente de caveolina (Filipina, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) o inhibidores de la vía dependiente de clatrina: MDC (100 μM) o un protocolo de depleción de K⁺. Luego, se las expuso al agente colestásico E17G por 20 minutos. La AVc fue calculada como el porcentaje de DAH con fluorescencia visible en su vacuola canalicular de un total de al menos 200 DAH por preparación, referidas al valor de AVc control. Los datos son expresados como el promedio \pm ES ($n = 250/300$ duplas por preparada de al menos 3 preparados distintos). *significativamente diferente al control ($p < 0,05$). Ninguno de los tratamientos con los inhibidores afectó per se la AVc (datos no mostrados).

4.2.2. MDC inhibe la internalización endocítica de Bsep y Mrp2 inducida por E17G

La internalización de los transportadores fue analizada por inmunofluorescencia en DAH utilizando microscopía confocal. Imágenes confocales representativas se muestran en la Figura 4.9 A, donde se ve en las DAH expuestas a E17G, una clara internalización de Bsep y Mrp2 (en verde) desde la zona canalicular, delimitada en rojo (red de actina pericanalicular) hacia vesículas intracelulares (flechas blancas). El pre-tratamiento con MDC previno significativamente esta deslocalización, lo cual fue confirmado mediante análisis densitométrico, el cual demostró que el E17G induce una redistribución de los transportadores hacia el interior celular, fenómeno que fue prevenido por el bloqueo de la vía endocítica dependiente de clatrina con MDC (Figura 4.9 B, gráficos a la izquierda). Ninguno de los tratamientos modificó la distribución de actina (Figura 4.9 B, gráficos a la derecha) y se realizaron los controles pertinentes con los inhibidores a la concentración empleada, siendo los resultados similares al control (datos no mostrados).

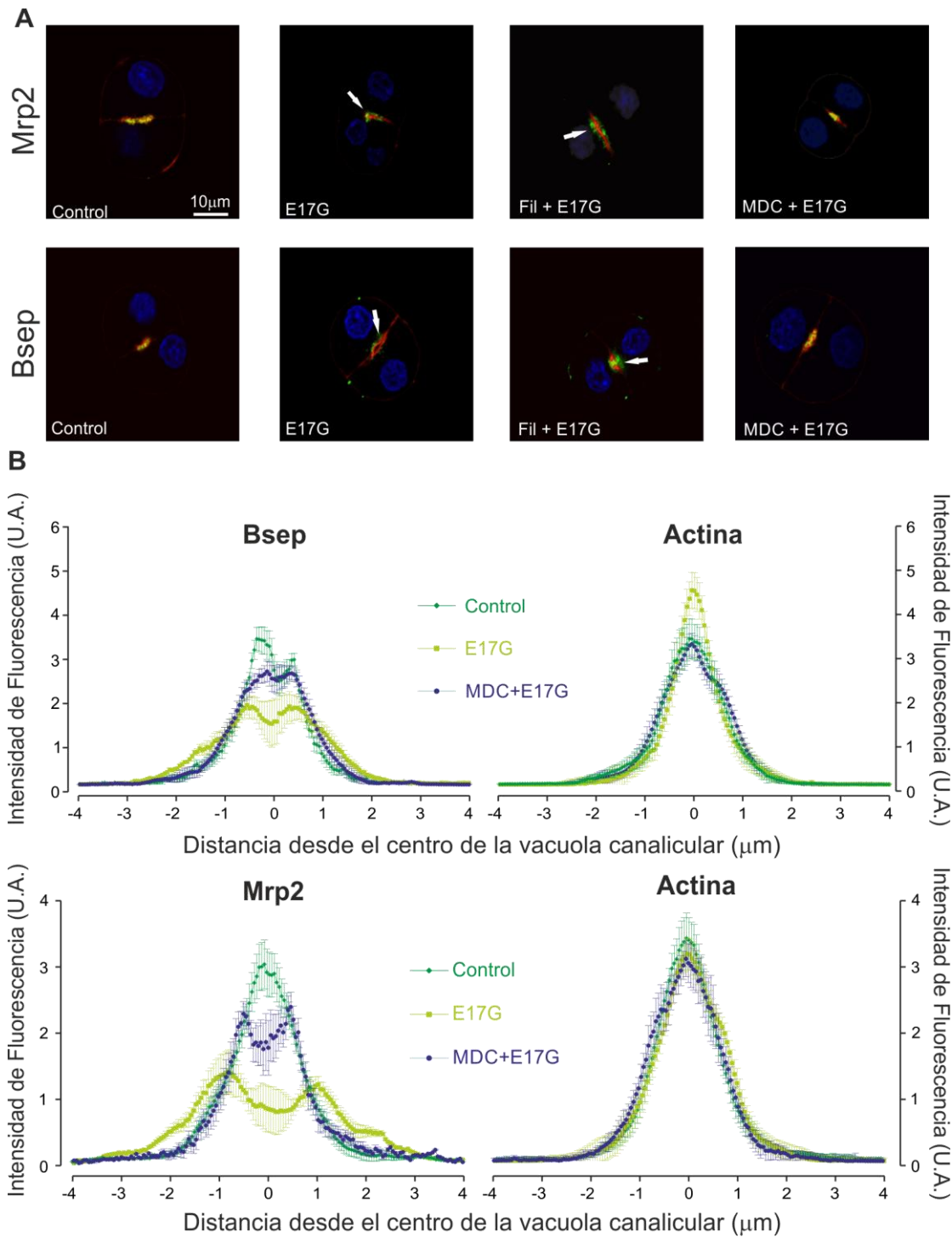
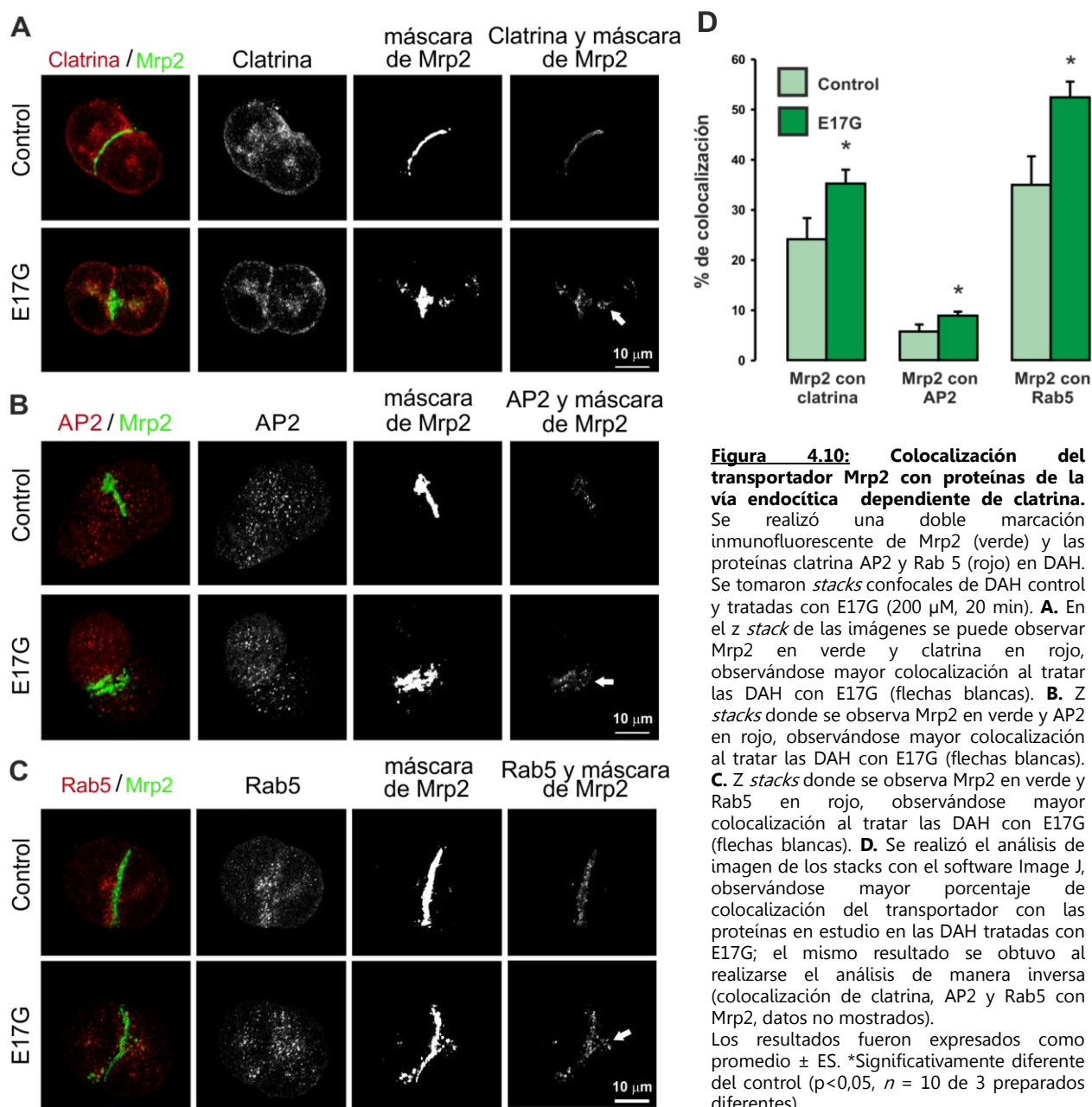


Figura 4.9: La MDC previene la endocitosis de los transportadores canaliculares Mrp2 y Bsep en DAH. **A.** Imágenes confocales representativas de DAH muestran la distribución de Mrp2 y Bsep (verde) y la red de actina pericanalicular (rojo) bajo diferentes tratamientos. Bajo condiciones control, la fluorescencia asociada a los transportadores está mayormente localizada en la zona canalicular delimitada por la red de actina. E17G (200 μM) induce una clara internalización de vesículas conteniendo los transportadores más allá de los límites de actina (flechas blancas), al igual que las DAH pretratadas con filipina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y luego incubadas con E17G. El efecto de E17G fue significativamente prevenido por el tratamiento con MDC (100 μM). **B.** Distribución de la fluorescencia asociada a Mrp2 y Bsep a lo largo de una línea de 8 μm perpendicular a la vacuola canalicular y con centro en la misma. El espacio canalicular fue identificado por la fluorescencia asociada a actina, graficándose la distribución de la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias, U.A.) asociada a actina (derecha) y a los transportadores (izquierda). La distribución de la fluorescencia de Bsep, Mrp2 y actina fue normalizada, y comparada luego estadísticamente usando el test Mann-Whitney. Los resultados son expresados como el promedio \pm ES. $n = 6-8$ vacuolas canaliculares por preparación, de 3 preparaciones independientes. Los análisis estadísticos revelaron una internalización significativa de los transportadores bajo tratamiento con E17G ($p < 0,05$ vs. control), la cual fue completamente prevenida con MDC ($p < 0,05$ vs. E17G). Ninguno de los tratamientos *per se* afectó la distribución normal de actina.

4.2.3. E17G incrementa la colocalización de Mrp2 con proteínas involucradas en la endocitosis dependiente de clatrina



Como fuera expuesto en la Introducción (Figura 1.1), los componentes celulares endocitados a través de la vía dependiente de clatrina deberían encontrarse en vesículas endocíticas junto con componentes esenciales para la formación de las mismas, tales como clatrina, AP2 y Rab5. Así, para obtener mayor evidencia de la participación de este mecanismo endocítico en la colestasis por E17G, realizamos experimentos tendientes a estimar el grado de colocalización de Mrp2 con dichas proteínas. Se realizaron inmunofluorescencias con los

anticuerpos correspondientes, y se tomaron *stacks* de las DAH controles y tratadas con E17G mediante microscopía confocal (Figura 4.10 A).

En la Figura 4.10, se observan imágenes confocales representativas de la colocalización de Mrp2 con clatrina (A), con AP2 (B) y Rab5 (C). Es evidente, al observar las imágenes en la cual se muestra una máscara con la localización de Mrp2, que E17G indujo internalización del transportador. Cuando observamos las imágenes en las cuales se muestra la clatrina, AP2 y Rab5 presentes en el espacio ocupado por Mrp2 (Figura 4.10 A, B y C, paneles de la derecha), podemos ver que bajo tratamiento con E17G, las proteínas pertenecientes a la maquinariaa endocítica de clatrina colocalizan con las moléculas de Mrp2 (flechas blancas) presente en las vesículas endocitadas. La cuantificación de la colocalización entre Mrp2 y estas proteínas dio como resultado un aumento significativo en el porcentaje de colocalización entre las mismas en el grupo E17G (Figura 4.10 D).

4.2.4. El silenciamiento de AP2 inhibe la endocitosis de Bsep y Mrp2 inducida por E17G

Para confirmar que la internalización de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 ocurre por una vía dependiente de clatrina en la colestasis inducida por E17G, se evaluó el estado de localización de los mismos en CPHS transfectados con ARNi contra el ARNm de AP2. Cuatro ARNi fueron sintetizados y testeados, y tres de ellos (ARNi 1, 2 y 3) indujeron una disminución significativa en la expresión de AP2, analizada por WB (Figura 4.11 A), siendo elegido el ARNi 1 para los estudios de función y localización de los transportadores. Las imágenes confocales de los CPHS transfectados muestran, avalando los hallazgos previos, que la alteración en la localización de Bsep y Mrp2 inducida por E17G (flechas blancas) es prevenida en aquellas células transfectadas efectivamente con el ARNi 1 (Figura 4.11 B).

En cuanto a la actividad de los transportadores, el silenciamiento de AP2 previno la alteración funcional de Mrp2 inducida por E17G, medida por la VIT de GS-MF. En efecto, este parámetro arrojó valores no significativamente diferentes de los CPHS control (Figura 4.11 C), mientras que en aquellos tratados con E17G, la VIT cayó un 50% aproximadamente respecto a los valores controles.

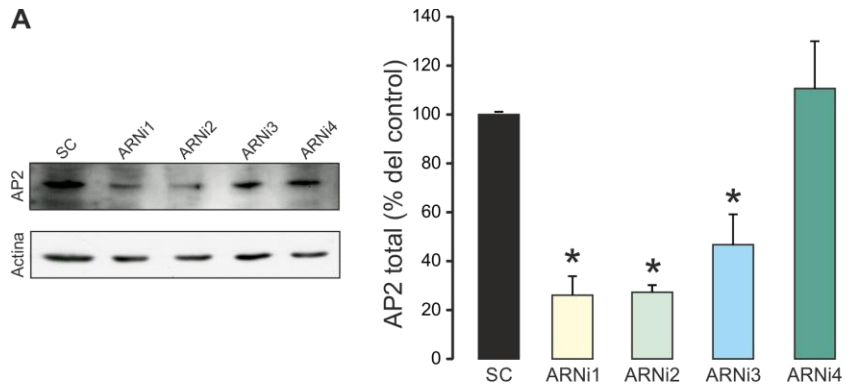
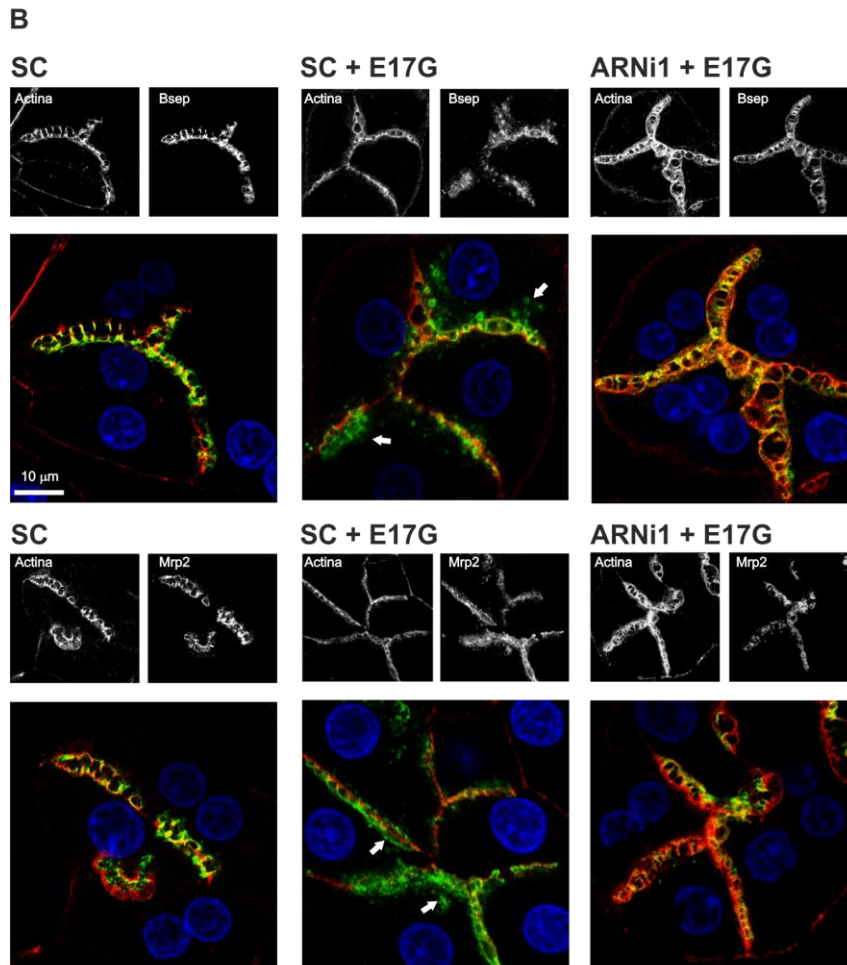
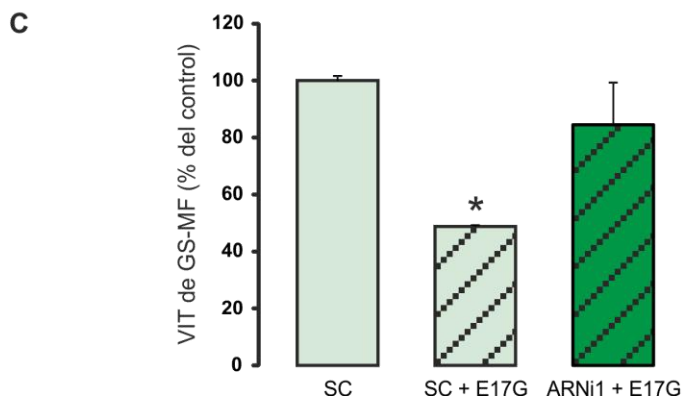


Figura 4.11: Silenciamiento de AP2 en CPHS, y su efecto sobre la internalización de transportadores canaliculares inducida por E17G.

Los CPHS fueron transfectados con el RNAi de AP2, y el RNA SC por 48 hs. **A.** Western Blot representativo de AP2 en CPHS transfectado. Los RNAi 1 y 2 indujeron una mayor diferencia significativa en la disminución de la expresión de AP2. Los resultados son expresados como porcentaje respecto al SC, e indicados como el promedio \pm ES. *Significativamente diferente del SC ($p < 0,05$, $n = 3$) **B.** Imágenes confocales representativas que muestran la distribución celular de Mrp2 y Bsep (verde) en CPHS, bajo los distintos tratamientos. La zona canalicular está delimitada por la proteína ocludina (rojo) y los núcleos se muestran en azul. Bajo condiciones control (SC), la fluorescencia asociada a Mrp2 y Bsep está mayormente confinada al espacio canalicular. E17G indujo una clara internalización de vesículas conteniendo los transportadores, más allá de los límites canaliculares (flechas blancas). En las células tratadas con el RNAi 1, el fenómeno de internalización es claramente prevenido en aquellas células eficientemente transfectadas. El RNAi *per se* no tiene ningún efecto sobre la distribución de los transportadores (datos no mostrados).



C. VIT de Mrp2. Luego de la transfección con los RNAi 1 y SC por 48hs, los CPHS fueron expuestos a E17G (200 μ M) por 30 min, o a su vehículo (DMSO), y luego a CMFDA, precursor de GS-MF. La pendiente de la curva obtenida graficando la intensidad de fluorescencia asociada a GS-MF de 70-100 pseudo-canalículos vs. tiempo de 3 preparados diferentes se usó para estimar la VIT de Mrp2, la cual fue corregida por los valores promedio de ancho canalicular, tal como fuera descrito en el ítem 4.1.4 Los datos son expresados como el promedio \pm ES. *Significativamente diferente al SC ($p < 0,05$).



4.2.5. MDC previene las alteraciones secretoras biliares y la endocitosis de Bsep y Mrp2 inducida por E17G en el HAP

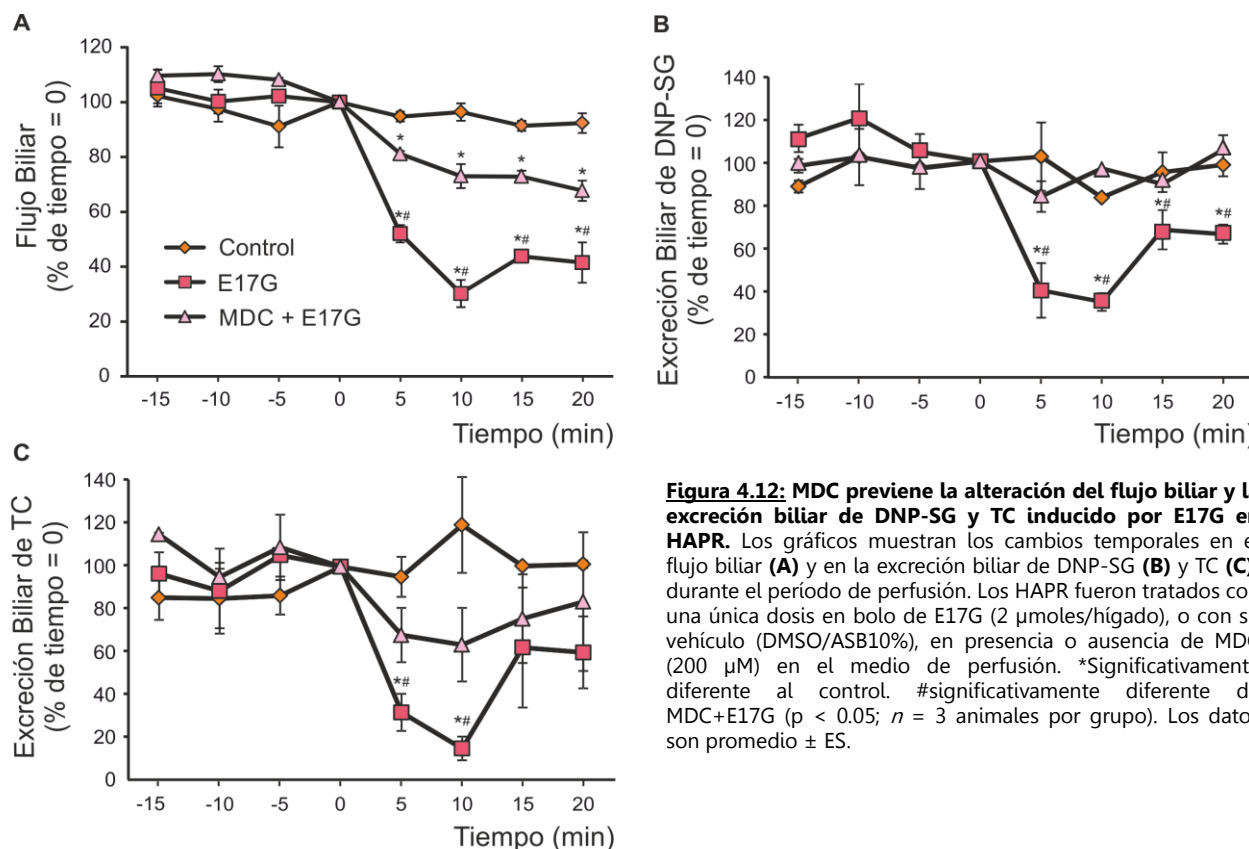


Figura 4.12: MDC previene la alteración del flujo biliar y la excreción biliar de DNP-SG y TC inducido por E17G en HAPR. Los gráficos muestran los cambios temporales en el flujo biliar (**A**) y en la excreción biliar de DNP-SG (**B**) y TC (**C**), durante el período de perfusión. Los HAPR fueron tratados con una única dosis en bolo de E17G (2 μ moles/hígado), o con su vehículo (DMSO/ASB10%), en presencia o ausencia de MDC (200 μ M) en el medio de perfusión. *Significativamente diferente al control. #significativamente diferente de MDC+E17G ($p < 0.05$; $n = 3$ animales por grupo). Los datos son promedio \pm ES.

El modelo de hígado aislado y perfundido (HAP) permite monitorear dinámicamente los cambios en la secreción biliar, en un contexto de integridad de órgano preservado.

La administración de un bolo de E17G produce una rápida caída del FB hasta aproximadamente un 40% del valor basal (Figura 4.12 A). Esta disminución en el FB es acompañada por una disminución significativa en la excreción biliar de los sustratos de Bsep (Figura 4.12 B) y Mrp2 (Figura 4.12 C), TC (70 % del basal) y DNP-glutación (40 % del basal), respectivamente.

La actividad de ambos transportadores comienza a recuperarse luego de 15 minutos de administrado el E17G. En los HAP pre-tratados con MDC para inhibir la vía endocítica mediada por clatrina, se previene en forma parcial, pero altamente significativa, la caída en el FB y la alteración en la excreción de TC producida por Bsep, en tanto que la alteración producida en la excreción de DNP-G, es prevenida totalmente (Figura 4.12).

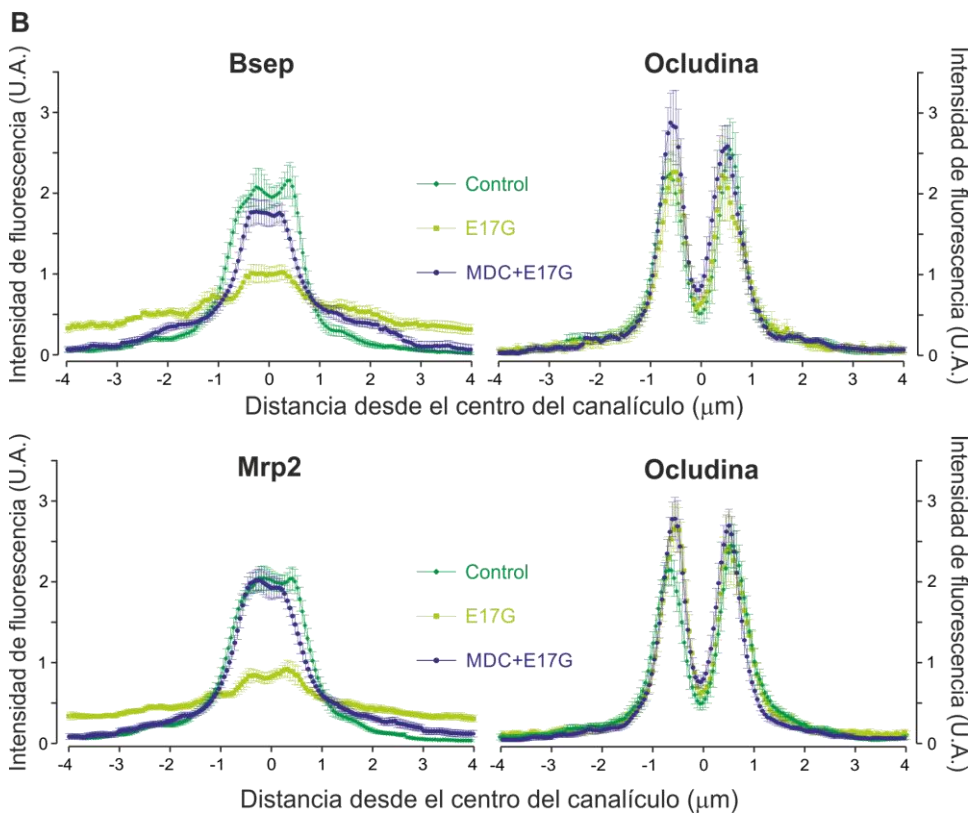
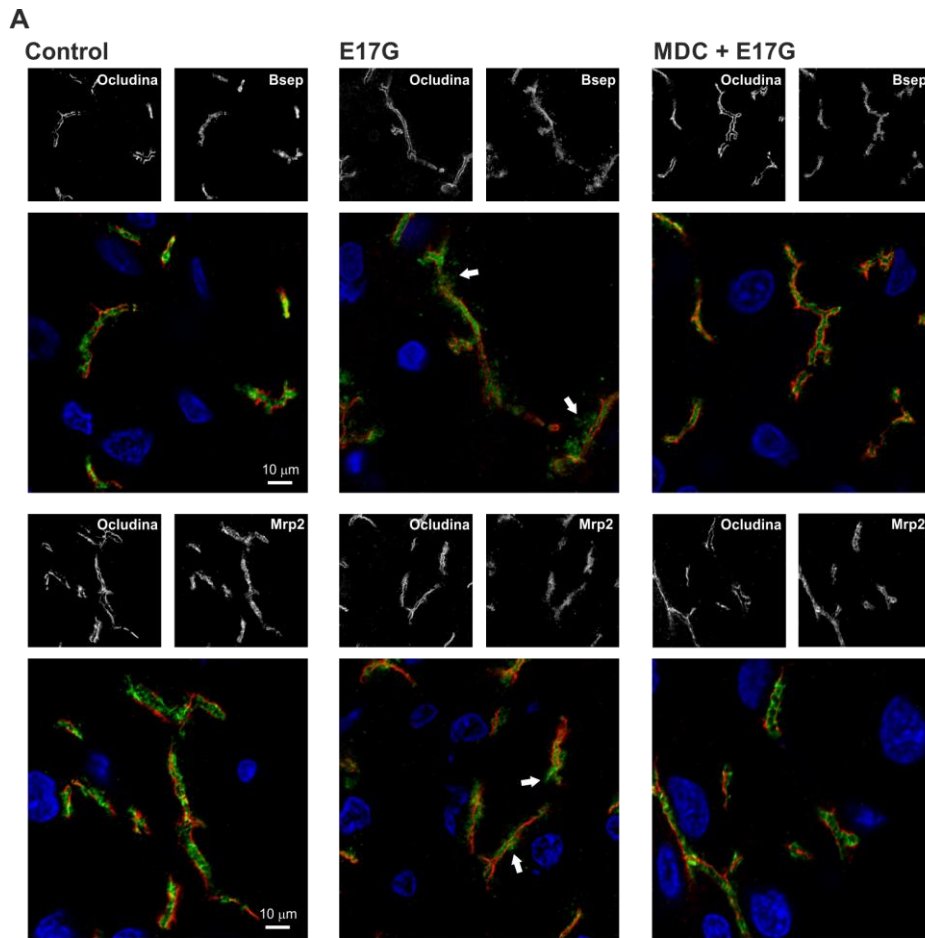


Figura 4.13: MDC previene la endocitosis de Bsep y Mrp2 inducida por E17G en HAP. **A.** Imágenes confocales representativas de la internalización endocítica de Bsep y Mrp2 inducida por E17G, y la protección que le confiere el pre-tratamiento con MDC. Se muestra a Bsep (verde) y ocludina (rojo) en las imágenes superiores, y a Mrp2 (verde) y ocludina (rojo) en las imágenes inferiores. En HAP control, ambos transportadores están circunscritos al espacio canalicular, delineado por ocludina; tras el tratamiento con E17G (2 μ moles/higado), se observan zonas donde los transportadores se encuentran fuera de los límites de los canalículos, en estructuras vesiculares intracelulares. MDC (100 μ M, 15 min previo a E17G y mantenido durante toda la perfusión) impide la internalización de los transportadores canaliculares, observándose un patrón de distribución similar al del control. MDC *per se* no produce ningún cambio en la localización de los transportadores. **B. Análisis densitométricos del perfil de intensidad de fluorescencia asociada a Bsep, Mrp2 y ocludina.** Los gráficos representan la intensidad de fluorescencia asociada a los transportadores (promedio \pm ES) a lo largo de una línea de 8 μ m perpendicular a los canalículos (4 μ m hacia ambos lados del centro canalicular). En HAP control, la fluorescencia asociada al transportador se concentró en el espacio canalicular. La internalización de los transportadores inducida por E17G se tradujo en una disminución de la fluorescencia en la zona canalicular (aplanamiento de la curva), junto con un aumento de la misma a mayor distancia del canalículo ($p < 0.01$ vs. Control). Los perfiles de distribución de Bsep y Mrp2 en los HAP pretratados con MDC y luego con E17G fueron similares a los del control, y significativamente diferentes a los del grupo E17G solo ($p < 0.01$) ($n = 20-50$ canalículos por preparación, de 3 preparaciones independientes). El análisis estadístico de los perfiles de distribución de ocludina, utilizada para delimitar los límites canaliculares, no mostró cambios con ninguno de los tratamientos.

En el panel A de la figura 4.13 se observan imágenes confocales representativas de Bsep (verde) y ocludina (rojo), mientras que las imágenes inferiores del panel A muestran imágenes confocales representativas de Mrp2 (verde) y ocludina (rojo), luego de 20 minutos de la administración de E17G (o su vehículo, DMSO), con o sin el pretratamiento con MDC en HAP. En los HAP tratados con E17G, ambos transportadores son detectados en estructuras intracelulares, compatibles con vesículas endocíticas (flechas blancas). Esta internalización se vio prevenida en aquellos HAP que fueron perfundidos con MDC, los cuales mostraron un patrón similar de distribución de los transportadores en la zona canalicular que aquellos HAP control. En los estudios densitométricos de las imágenes tomadas, se puede observar que, bajo tratamiento con E17G, la curva de distribución de los transportadores Bsep y Mrp2 se vuelve más chata y ancha debido al incremento de la intensidad de fluorescencia verde correspondiente a los mismos en una zona más alejada de la membrana canalicular, hecho consistente con la internalización de los mismos a compartimientos intracelulares (Figura 4.13 B). En aquellos hígados perfundidos con MDC y tratados con E17G, la distribución de ambos transportadores fue casi idéntica a la de los hígados control. Ninguno de los tratamientos modificó la estructura canalicular, evaluada a través de la distribución de ocludina. MDC *per se* no indujo cambios en la distribución de los transportadores (datos no mostrados).

4.2.6. E17G induce la migración de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 de microdominios *raft* a *no raft*

Los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 se encuentran mayoritariamente presentes en microdominios ricos en colesterol (*rafts*)⁹⁹; de hecho, existe una correlación positiva entre el contenido de colesterol de la membrana y la actividad de Bsep¹²⁸. La endocitosis dependiente de clatrina se produce desde microdominios *no raft*, los cuales poseen la maquinaria necesaria para que ocurra este mecanismo. Así, para que E17G pueda inducir la endocitosis dependiente de clatrina de Bsep y Mrp2, los mismos deberían estar enriquecidos en microdominios *no raft*. Para indagar esta posibilidad, se evaluó la expresión de los mismos en microdominios de membrana *raft* y *no raft*. Se aislaron microdominios *raft* (colesterol alto) y *no raft* (bajo en colesterol) en función de su solubilidad en detergente y el enriquecimiento de la proteína caveolina-1 en *rafts*, o de la proteína clatrina en *no raft*, como se describe en Materiales y Métodos 3.3.2.2.1.

Se realizaron WB de microdominios de membrana *raft* y *no raft* provenientes de muestra de hígados de rata tomadas en condiciones basales (a tiempo 0), o luego de 20 minutos de haber inyectado las ratas con E17G, o su vehículo (DMSO). Para analizar la distribución relativa de los transportadores Bsep y Mrp2 en esos microdominios, y para comprobar la pureza de los microdominios, mediante el revelado contra las proteínas caveolina-1 (*rafts*) y clatrina (*no rafts*)

(Figura 4.14 A).

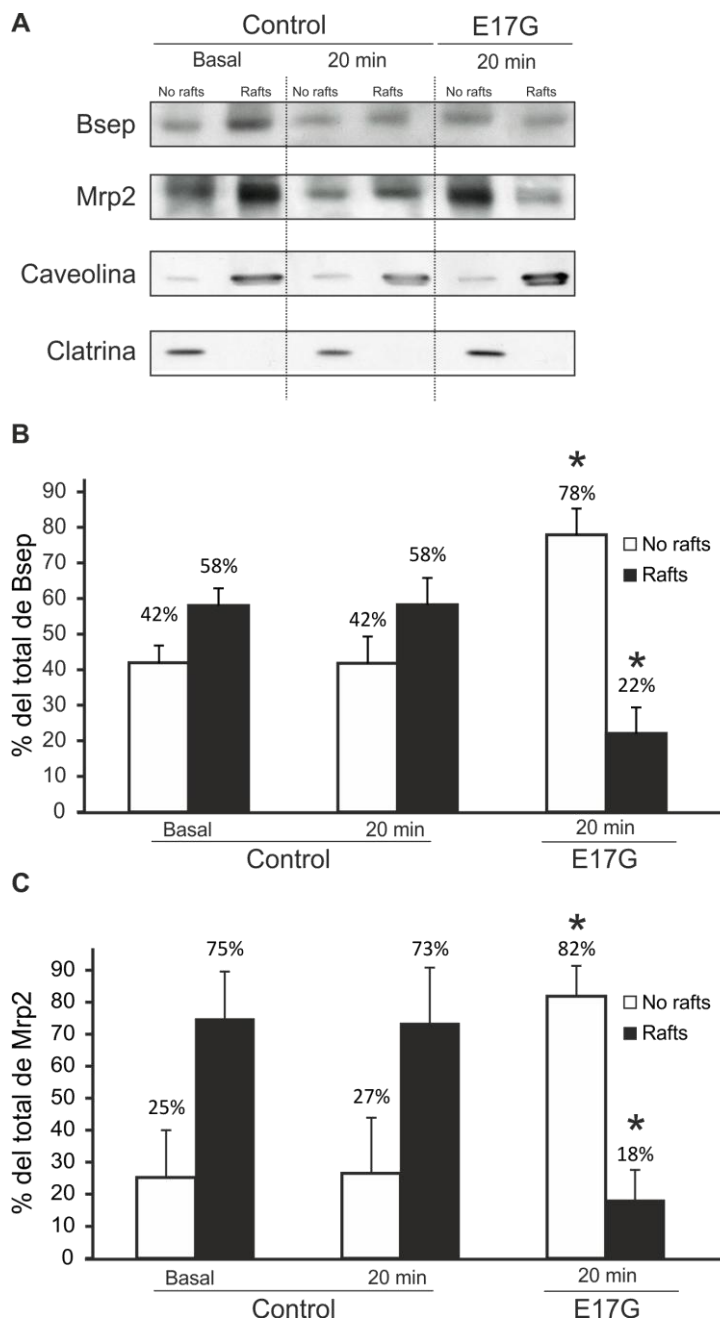


Figura 4.14: Expresión de Bsep y Mrp2 en microdominios canaliculares raft y no raft. Se tomaron muestras de hígado de rata a tiempo 0 y 20 minutos después de haberle inyectado E17G o su vehículo (DMSO). Se obtuvieron microdominios *raft* (colesterol alto) y *no raft* (colesterol bajo) de membranas plasmáticas de hígado altamente purificados. **A.** WB representativos para caveolina-1 (marcador de *rafts*), clatrina (marcador *no raft*), Bsep y Mrp2 en microdominios *raft* y *no raft*. **B.** Porcentaje de Bsep en microdominios *raft* y *no raft*. **C.** Porcentaje de Mrp2 en microdominios *raft* y *no raft*. Los datos se expresan como promedio \pm ES, n=4 de 3 experimentos independientes. *p < 0,05 vs. control.

Los transportadores canaliculares en estudio, tanto en condiciones basales como luego de 20 minutos de inyectado el vehículo, se encuentran más enriquecidos en microdominios *raft* (aproximadamente un 60% Bsep y un 75% Mrp2), comparado con microdominios *no raft* (aproximadamente 40 y 25%, respectivamente) (Figura 4.14 B y C). Sin embargo, en aquellas ratas que fueron inyectadas con E17G, se produce una clara y significativa redistribución de estos transportadores en los microdominios de membrana; Bsep se expresa un 22% en *rafts* y

un 78% aproximadamente en *no rafts* (Figura 4.14 B), mientras que Mrp2 se expresa un 18% y un 82% aproximadamente en *rafts* y *no rafts*, respectivamente (Figura 4.14 C).

4.3. ESTUDIOS FOSFOPROTEÓMICOS Y BIOINFORMÁTICOS

Se identificaron por fosfoproteómica posibles proteínas intracelulares relevantes al proceso de endocitosis y tráfico vesicular que pudieran sufrir cambios en su estado de fosforilación como resultado de la activación de vías de señalización activadas por E17G.

En los geles bidimensionales se detectaron 78 spots significativamente diferentes entre el grupo control y el grupo tratado con E17G. De esos 78 spots, se han podido identificar 48 fosfoproteínas que modificaron su grado de fosforilación entre los grupos estudiados.

En la tabla 4.3 se detallan aquellas proteínas identificadas, el grado de significancia estadística y la proporción en que aumenta (números positivos) o disminuye (números negativos) la fosforilación de cada proteína en el grupo E17G con respecto al grupo control.

E17G vs. CONTROL		
Proteína	t-test	Ratio E17G/Control
C-1-tetrahydrofolate synthase	0.0220	2.16
Alpha-actinin-4	0.0010	3.28
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	0.0032	2.90
Cytoplasmic aconitate hydratase	0.0140	3.07
C-1-tetrahydrofolate synthase	0.0400	3.31
Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0.0220	2.34
Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0.0029	3.69
Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	0.0120	5.05
Elongation factor 2	0.0026	3.43
Radixin	0.0014	6.64
Transketolase	0.0310	1.49
Transketolase	0.0083	3.47
Urocanate hydratase	0.0300	2.13
Histidine ammonia-lyase	0.0011	1.58
Histidine ammonia-lyase	0.0012	2.30
Transketolase	0.0008	1.90
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	0.0010	2.49
Cystathionine beta-synthase	0.0019	4.44
Transketolase	0.0029	3.49
Stress-induced-phosphoprotein 1	0.0270	1.81
Isoform L-type of Pyruvate kinase PKLR	0.0055	2.34
Carboxylesterase 1D	0.0045	1.63
Pyruvate kinase PKLR	0.0032	3.06
Catalase	0.0017	2.40
Catalase	0.0720	1.20

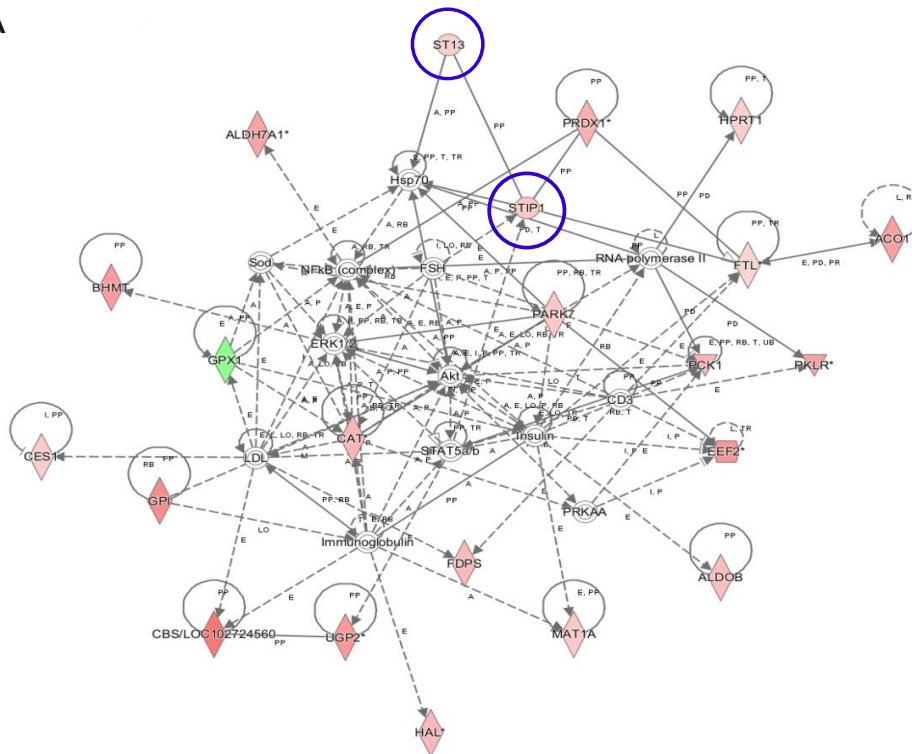
Catalase	0.0150	1.29
Catalase	0.0085	1.40
Catalase	0.0170	2.31
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	0.0035	2.25
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	0.0065	1.69
Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	0.0045	4.84
Dihydropyrimidinase	0.0039	2.10
Aldehyde dehydrogenase family 8 member A1	0.0030	2.36
Dihydropyrimidinase	0.0045	3.48
Glucose-6-phosphate isomerase	0.0007	3.74
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.0077	3.32
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.0022	2.98
Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	0.0022	3.00
Hsc70-interacting protein	0.0015	1.57
S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	0.0120	1.78
Argininosuccinate lyase	0.0001	2.49
Elongation factor 1-gamma	0.0047	2.42
Fumarate hydratase, mitochondrial	0.0042	2.19
Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	0.0096	3.25
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.0350	1.43
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.0170	2.36
Fumarylacetoacetase	0.0160	1.98
Fructose-bisphosphate aldolase B	0.0094	2.13
Arginase-1	0.0028	2.10
Farnesyl pyrophosphate synthase	0.0270	2.26
Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	0.0240	1.44
Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	0.0110	2.31
Proteasome subunit alpha type-1	0.0180	1.72
Alpha-tocopherol transfer protein	0.0140	1.54
Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	0.0280	1.59
Glutathione peroxidase 1	0.0031	-2.51
Protein deglycase DJ-1	0.0043	1.79
Peroxiredoxin-1	0.0370	2.49
Peroxiredoxin-1	0.0260	2.59
Ferritin light chain 1	0.0031	1.15
Ferritin light chain 1	0.0430	1.39
Ribonuclease UK114	0.0057	-4.91

Tabla 4.3: Proteínas que modifican su grado de fosforilación ante la administración *in vivo* de E17G. En la tabla, se puede observar el nombre de cada proteína que modifica su patrón de fosforilación en el grupo E17G con respecto al control, el valor del test de la *t* de Student y la relación de expresión E17G/Control, indicando la cantidad de veces que está aumentada (números positivos) o disminuida (números negativos) la fosforilación al inducir colestasis aguda con E17G en ratas enteras ($n = 4$).

Para obtener una mayor información a partir de los datos hallados, se han cargado los nombres de las proteínas de la Tabla 4.3 en el servidor IPA. IPA es una herramienta de búsqueda de base de datos que se utiliza para determinar la variación de las funciones biológicas y vías de señalización entre diferentes tratamientos. Las redes fueron generadas comparando el número

de proteínas que participan en una función o vía dada, en relación con todas vías almacenadas en la literatura de la base de datos de Ingenuity Pathways.

A



B

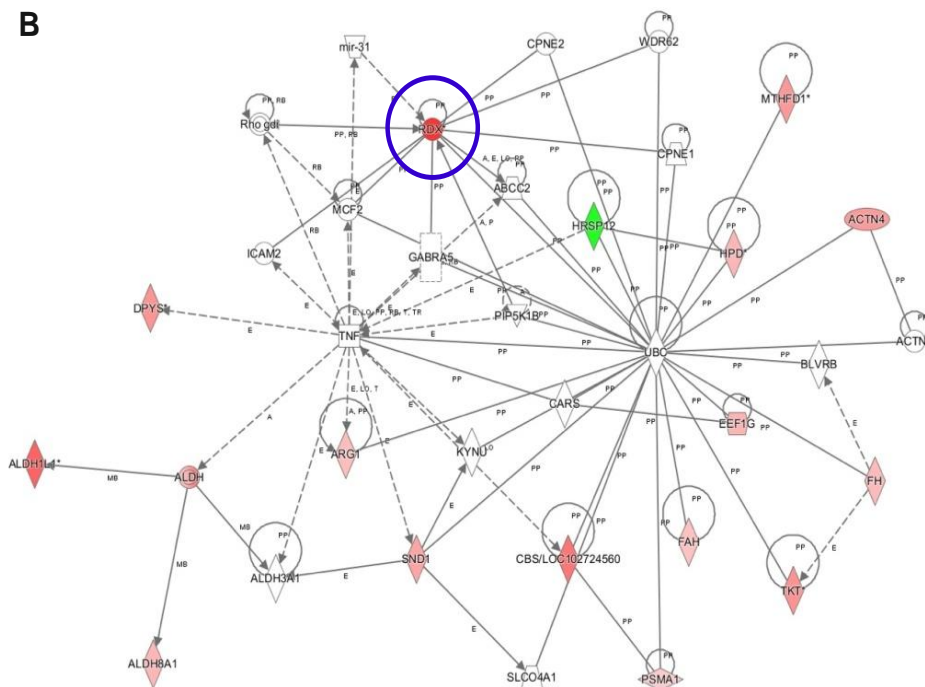


Figura 4.15: Redes de interacción arrojadas del análisis mediante IPA. **A.** Red de interacción que revela 22 moléculas detectadas por nuestro análisis fosfoproteómico y 13 proteínas predichas. **B.** Red de interacción que muestra 17 proteínas detectadas por nuestro análisis y 17 predichas. Dichas redes son arrojadas al analizar el total de las proteínas que se identificaron con un cambio en su grado de fosforilación entre HAP tratados con E17G y el grupo control ingresadas en IPA. Las proteínas con fondo rojo son aquellas que aumentan su grado de fosforilación en el grupo E17G con respecto al control, las proteínas con fondo verde son aquellas que disminuyen su grado de fosforilación en el grupo E17G y las proteínas con fondo blanco son las predichas por IPA. La intensidad de color indica la magnitud del cambio en el nivel de fosforilación de la proteína. Las líneas indican las interacciones, mientras que con las puntas de flecha se indica la direccionalidad. La ausencia de puntas de flecha se refiere a una interacción de unión. La línea punteada indica una interacción inferida o indirecta. **Simbología:** \diamond enzima, \odot grupo o complejo, \circ regulador de la transcripción, ∇ quinasa, \circ otra, \circ enzima de unión a sí misma, \circ grupo o complejo que interactúa con sí mismo, \circ grupo o complejo que interactúa con sí mismo de una manera inferida o indirecta, y \circ molécula de unión a sí misma. Los cambios en el grado de fosforilación de las proteínas resaltadas con un círculo azul (St13 y Stip1 en panel A y radixina en panel B) podrían afectar su participación en la estabilización de proteínas de membrana, pudiendo cumplir algún rol en la endocitosis de los transportadores canaliculares inducida por E17G.

El análisis de los datos fosfoproteómicos de las muestras de hígado de animales tratados con E17G con respecto al control arrojó dos redes con un valor de $p < 0,05$ (Figura 4.15). En estas redes se puede observar el aumento en el grado de fosforilación de ciertas proteínas (fondo rojo) o la disminución del mismo (fondo verde), siendo la intensidad del color directamente proporcional al grado de incremento o disminución en la fosforilación. Asimismo, también se puede observar en estas redes la interacción de las proteínas identificadas en el análisis fosfoproteómico con otras proteínas que no tuvieron un cambio en su grado de fosforilación detectable por este análisis (fondo blanco). Dentro de este último grupo, se pueden observar proteínas involucradas en las vías de señalización descritas anteriormente como implicadas en la colestasis por E17G, como Akt y Erk 1/2 (Figura 4.15 A), o el transportador Mrp2 (Abcc2) (Figura 4.15 B). En cuanto a las proteínas identificadas en estas redes con aumentos significativos en su grado de fosforilación inducido por E17G, se encuentran las proteínas radixina, Hop (también llamada "stress-induced-phosphoprotein 1" [Stip1] o "Hsp70/Hsp90 organizing protein") y Hip (también llamada "Hsc70-interacting protein" o St13), resaltadas en tabla 4.3 y figura 4.15. Estas proteínas cumplen un rol en la correcta maduración y estabilización de proteínas de membrana²²¹⁻²²⁴, habiéndose reportado que cambios en su estado de fosforilación, en el cual podrían estar involucradas algunas de las quinasas que forman parte de las vías de señalización pro-colestásicas activadas por E17G, pueden afectar su función fisiológica.

Discusión

5.1. EL CPHS ES UN MODELO *IN VITRO* POLARIZADO DE GRAN UTILIDAD PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS DE ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN SECRETORA BILIAR INDUCIDA POR COMPUESTOS COLERÉTICOS Y COLESTÁSICOS

Las DAH constituyen un modelo noble e ideal para muchos estudios, el cual nuestro grupo de trabajo, así como otros, utiliza con regularidad para estudios a nivel celular de la patología colestásica. Sin embargo, este modelo *in vitro* queda relegado cuando se necesitan hacer estudios bajo tratamientos subagudos o crónicos (su vida media es de aproximadamente 10 horas), o se necesita aplicar técnicas que requieren alto rendimiento celular. En la primera parte de este trabajo de tesis, hemos logrado validar una metodología basada en CPHS para reproducir *in vitro* alteraciones canaliculares inducidas por compuestos colestásicos de relevancia clínica, tales como E17G y TLC. Además, el efecto colerético y anticoléstásico del compuesto pro-exocítico DBAMPc también se ha evidenciado en CPHS, avalando su uso no sólo como modelo de estudio de alteraciones colestásicas, sino también para investigar tratamientos experimentales anticoléstásicos.

Evidencias presentadas por nuestro grupo y otros demostraron que, en muchas formas de colestasis experimental y clínica, la internalización endocítica de los transportadores canaliculares esenciales para la formación de bilis, como Bsep y Mrp2, es causal fundamental de la falla secretora biliar, siendo clave el rol de vías de señalización intracelular en este fenómeno.²²⁵ Esto hace esencial la investigación a un nivel celular y molecular de este patomecanismo. Sin embargo, esto requiere modelos *in vitro* estables y polarizados de secreción biliar, que mimeticen de la mejor manera posible la condición fisiológica.

El modelo de CPHS es ideal para este propósito, ya que es el único modelo *in vitro* disponible de cultivo primario de hepatocitos que mantiene todas las características de los hepatocitos *in situ* por un período de tiempo suficientemente largo como para realizar estudios de *knock-down* de genes específicos de interés, o estudios de *WB*, ya que el rendimiento de la muestra es suficientemente alto²²⁶. Además, los hepatocitos humanos pueden ser cultivados en configuración de sándwich de colágeno y, hoy en día, se encuentran disponibles comercialmente, lo cual representa una gran ventaja para el estudio de patologías hepáticas humanas.

La incubación con un sustrato fluorescente de un transportador canalicular, tal como GS-MF seguido de captura y análisis de imágenes en tiempo real, ha sido previamente reconocido como una herramienta útil para detectar el deterioro de la actividad del transportador canalicular Mrp2¹⁹⁸. Aunque esta metodología es potencialmente útil para los estudios cinéticos de la función de los transportadores responsables de la formación de bilis (Mrp2, en este caso),

el método sólo se había aplicado a condiciones de "todo o nada" (en ratas Eisai hiperbilirrubinémicas que no expresan Mrp2). De este modo, su uso en condiciones de deterioro parcial en la actividad de transporte inducida por un agente colestásico, o su recuperación después de dicho tratamiento, aún necesitaba ser validada. La minuciosidad de los análisis de datos también era limitada en estos estudios previos. La actividad del transportador era medida como la fluorescencia asociada a un sustrato fluorescente del transportador acumulada en los canalículos biliares hasta un punto de tiempo que no se había establecido rigurosamente, analizando la influencia de los cambios en la linealidad de la señal de fluorescencia en dichos ensayos. De acuerdo con nuestros resultados (ver Figura 4.1.), la acumulación de fluorescencia es lineal por un periodo de tiempo relativamente corto (4-5 min), la cual también depende del tipo de experimento y tratamiento a realizar.

Otro aspecto crítico de esta metodología es que se basa en la medida de la intensidad de fluorescencia en los canalículos biliares, un parámetro que refleja la concentración biliar del sustrato fluorescente en lugar de la tasa de excreción real. De hecho, este parámetro se ve afectado por cambios en el FB que conducen, en este modelo en el cual los canalículos son espacios cerrados, a modificaciones del volumen canalicular preexistente. Tener en cuenta este aspecto es fundamental en los estudios de colestasis o coleresis. La falta de corrección por un aumento del volumen canalicular (coleresis) conduciría a una subestimación de la medida de la actividad de transporte, mientras que la falta de corrección para una disminución del volumen canalicular (colestasis) daría lugar a una sobreestimación de este parámetro. Para superar estos inconvenientes metodológicos, durante esta tesis validamos y aplicamos una serie de modificaciones y correcciones de la técnica reportada originalmente por Nakanishi y col.¹⁹⁸, haciéndola de este modo apropiada para el estudio de transporte canalicular en condiciones de generación de FB variables.

En primer lugar, tomamos ventaja de la naturaleza cinética del transporte canalicular para calcular la actividad del transportador como la velocidad inicial de transporte de un sustrato fluorescente (VIT). Esto se concretó mediante la determinación de la pendiente de las curvas de intensidad de fluorescencia en función del tiempo, durante la fase lineal inicial, donde no hay saturación del sistema de transporte ni saturación de la señal de fluorescencia en la luz canalicular. En segundo lugar, hemos introducido una corrección por los cambios en el volumen canalicular, multiplicando la VIT por el volumen promedio canalicular, calculado mediante el análisis de *stacks* en 3D de imágenes confocales. Además, validamos con éxito el uso del ancho canalicular promedio como un parámetro sustituto del volumen canalicular, cuya determinación sólo requiere la adquisición de imágenes confocales 2D, simplificando significativamente esta metodología. Arribamos a esta conclusión basados en la estrecha correlación que se ha obtenido

entre los cambios que sufren el volumen y el ancho canalicular tanto en condiciones colestásicas como coleréticas (Figura 4.5.).

Otra contribución de este trabajo fue la validación del modelo de CPHS para los estudios funcionales en colestasis. Para este fin, se han utilizado dos compuestos colestásicos bien caracterizados, E17G y TLC, y se ha reproducido con éxito los efectos nocivos que habían sido descritos en ratas enteras^{113,114}, en HAP^{159,115}, y DAH^{74,83,159,152}. Hemos logrado reproducir y cuantificar en este modelo la capacidad de los agentes colestásicos para afectar la formación de bilis canalicular, evaluando y teniendo en cuenta además los cambios en el volumen y el ancho canalicular (Tabla 4.1). Así, pudimos reproducir la capacidad de estos compuestos para inhibir la función de transporte de Mrp2, evaluándose a través de la VIT de GS-MF. Significativamente, la disminución de la VIT de GS-MF en CPHS tratados con E17G 200 μ M y TLC 2,5 μ M (50% y 43%, respectivamente) fueron de magnitud similar a lo reportado para la acumulación vacuolar canalicular de GS-MF en DAH^{159,177}. Además, hemos podido visualizar la internalización endocítica de Mrp2 inducida por ambos agentes colestásicos, un patomecanismo esencial involucrado en sus efectos colestásicos²²⁵.

Por último, se ha reproducido en el modelo de CPHS la capacidad del DBAMPc, compuesto anticoléstásico, de prevenir todas estas manifestaciones de colestasis. Además, el bien conocido efecto colerético de DBAMPc cuando se administra solo han sido evidenciado a través del aumento en los valores de ancho / volumen canalicular (ver Tabla 4.1); este efecto colerético se asocia en parte con la capacidad de AMPc para aumentar la actividad Mrp2, una propiedad que pudo ser reproducida también en este modelo mediante la medición de VIT de GS-MF (véase Tabla 4.2). Estos últimos resultados han demostrado que el modelo de CPHS puede también ser utilizado para estudios asociados a mecanismos de coleresis.

5.2. E17G INDUCE EL ENRIQUECIMIENTO DE LOS TRANSPORTADORES CANALICULARES BSEP Y MRP2 EN MICRODOMINIOS *NO RAFT* Y LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE CLATRINA DE LOS MISMOS

Como mencionamos anteriormente, los transportadores Bsep y Mrp2 son esenciales y determinantes en la formación de bilis. Ambos transportadores sufren un desbalance en su reciclado normal, y son internalizados en distintas patologías colestásicas llevando a la acumulación de los mismos en compartimentos subapicales, fenómeno directamente relacionado con la alteración secretora canalicular y, como consecuencia, con la reducción del FB. A pesar del rol crucial de esta alteración en el establecimiento de la patología colestásica, poco se sabe acerca de los mecanismos que regulan dicho proceso. Es por ello que, durante el desarrollo de este trabajo de tesis, nos enfocamos en el estudio de dichos mecanismos,

analizando las diferentes vías por las cuales se podrían estar endocitando Bsep y Mrp2, utilizando para ello diferentes modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo*.

En esta etapa, hemos reunido evidencias que los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 se estarían endocitando a través de una vía dependiente de clatrina en colestasis inducida por E17G. En un primer estudio realizado en DAH, observamos que al inhibir la vía endocítica mediada por clatrina de dos maneras distintas, con su inhibidor específico MDC o mediante un protocolo de depleción de K^+ que afecta dicha vía, y luego de 20 minutos de tratamiento agudo con E17G, las DAH siguen siendo capaces de transportar los sustratos fluorescentes de Bsep y Mrp2 (CGamF y GS-MF, respectivamente), de manera no significativamente diferente a las DAH controles. Esto indicaría que los transportadores estarían ubicados mayormente en la membrana canalicular, y que seguirían siendo funcionales cuando se inhibe dicha vía endocítica.

Mediante el análisis de imágenes confocales de DAH tratadas con E17G previa inhibición de la vía endocítica dependiente de clatrina, confirmamos que los transportadores canaliculares se mantienen dentro de los límites del canalículo al igual que en DAH controles. Vale destacar que los efectos de E17G en la localización y función de los transportadores canaliculares no fueron prevenidos al tratar las células con filipina, un inhibidor de la vía endocítica dependiente de caveolina, lo cual nos permitiría descartar que los transportadores sean endocitados a través de esta vía.

Por otro lado, hemos realizado estudios de colocalización de Mrp2 con proteínas específicas esenciales para el funcionamiento de la vía endocítica dependiente de clatrina (clatrina, AP2 y Rab5). El análisis de las imágenes confocales de aquellas DAH tratadas con E17G nos permitió evidenciar que la fracción de Mrp2 internalizada mostraba un alto grado de colocalización con clatrina, AP2 y Rab5. En forma adicional, al realizar un análisis cuantitativo del porcentaje de colocalización de Mrp2 con los marcadores endocíticos evaluados, observamos que E17G indujo un aumento significativo en la colocalización de Mrp2 con las tres proteínas en estudio. En concordancia con lo anterior, también aumentó el porcentaje de clatrina, AP2 y Rab5 colocalizando con Mrp2 cuando realizamos el análisis inverso (datos no mostrados). Estos resultados confirman que la endocitosis de Mrp2 inducida por E17G es dependiente de clatrina.

Existen, sin embargo, evidencias en otro modelo celular *in vitro* (células Flp-In T-Rex 293, una línea estable embrional de riñón humano), que la endocitosis constitutiva de MRP2 humana que ha sido expresada *ad hoc* en esas células no dependería de clatrina⁷⁶. De ser válidos estos resultados en hepatocitos, y extrapolables a Mrp2 de rata, los mismos sugerirían que la internalización asociada al reciclado constitutivo de Mrp2 sería diferente de la endocitosis sufrida por el transportador en condiciones de colestasis, volviéndose la clatrina esencial para este

último proceso.

La endocitosis dependiente de clatrina requiere de la interacción de la proteína a ser endocitada con AP2 para su reclutamiento al sitio de formación de la vesícula recubierta. Esta interacción se da normalmente a través de motivos de tirosina o di-leucina presentes en el extremo N- o C-terminal de la proteína a ser endocitada¹¹, tal como fuera descrito para la endocitosis constitutiva de Bsep⁷¹. Para el caso de Mrp2, para el cual se ha reportado que su endocitosis constitutiva sería independiente de clatrina⁷⁶, es posible especular que estos dominios de interacción con AP2 no se encuentran presentes en su estructura, no siendo por lo tanto posible su reclutamiento en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la activación en el contexto colestásico de numerosas vías de señalización que pudieran tener a Mrp2 como blanco podría generar modificaciones postraduccionales en el transportador que posibiliten establecer interacciones no convencionales con clatrina. Sustentando esta posibilidad, se ha reportado recientemente que la endocitosis dependiente de clatrina del canal de K⁺ Kv1.3 en células HeLa depende directamente de la fosforilación del mismo en un residuo treonina de su dominio C-terminal mediada por ERK1/2, luego de la activación de esta quinasa inducida por el factor de crecimiento epidérmico²²⁷. En forma similar, es posible que E17G induzca la endocitosis de Mrp2 por un mecanismo no convencional diferente de la interacción de AP2 con dominios tirosina o di-leucina, interaccionando a través de dominios diferentes habilitados mediante la fosforilación de Mrp2 por alguna de las vías de señalización pro-colestásicas que nuestro grupo ha caracterizado. En este sentido, se ha reportado un sitio de fosforilación por PKC, una quinasa activada por E17G¹⁵⁸, en el extremo C-terminal de Mrp2 (Ser₁₅₄₂)²²⁸.

El incremento en la colocalización en compartimientos intracelulares de Mrp2 con Rab5, un marcador específico de los AEE, bajo tratamiento con E17G sustenta fuertemente la hipótesis planteada por nuestro grupo de trabajo⁸⁶ relacionada con la posibilidad que AEE sea el primer reservorio intracelular de Mrp2 una vez endocitada vía clatrina en condiciones de colestasis, ya que AEE es el destino primario de las vesículas endocíticas recubiertas con clatrina⁴. Además de servir de marcador de estos compartimientos endosomales, Rab5 es una pequeña GTPasa clave para la formación de la vesícula revestida de clatrina. Este hallazgo representa la primer evidencia disponible de la participación de Rab5 y la vía endocítica que lleva a AEE en un modelo de colestasis hepatocelular.

Además, nuestro grupo aportó evidencias acerca de la participación de p38MAPK en la endocitosis de transportadores canaliculares que explica la colestasis por E17G⁸⁶. Se ha reportado que esta quinasa acelera la endocitosis mediada por clatrina de varios receptores de membrana, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)²²⁹, los receptores opioides μ y δ ²³⁰ y el receptor de glutamato²³¹. Al igual que ellos, Bsep se internaliza de manera

dependiente de clatrina a través de un mecanismo que incluye la participación de AP2, proteína cuya fosforilación por p38MAPK es esencial para el reclutamiento de la carga hacia las depresiones revestidas de clatrina en el mecanismo endocítico del EGFR²³². Otro blanco posible de p38MAPK es el inhibidor de la disociación Rab-GDP (Rab-GDI), proteína que estimula el reciclaje de Rab5 entre la membrana y el citosol, aumentando de esta manera la tasa endocítica²³³.

Decidimos ampliar las evidencias aportadas por el modelo de DAH, llevando nuestros estudios a un modelo más fisiológico, el CPHS, validado en la primer parte de esta tesis para estudios colestásicos. En este modelo, hemos podido aplicar con éxito la técnica de *knock-down* de AP2, encargado de reclutar las moléculas de clatrina en la membrana canalicular, mediante el uso de ARNi dirigido hacia la subunidad $\mu 2$ de dicho complejo. Mediante estudios de localización de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 en CPHS controles y tratados con E17G a las 48 hs post-transfección, tiempo al cual se observa una marcada disminución en la expresión de AP2, pudimos observar que los transportadores se mantenían dentro de los límites canaliculares marcados por la red de actina pericanalicular, no observándose la deslocalización característica de los mismos que se produce en las células tratadas con E17G que no fueron transfectadas. Dado el rol de AP2 como proteína adaptadora que interviene en la formación de vesículas recubiertas con clatrina a través de interacciones con la proteína cargo y clatrina²³⁴, estos resultados demuestran de manera concluyente que la vía dependiente de clatrina sería la que mediaría la endocitosis de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 inducida por E17G.

A continuación, decidimos validar la reproducibilidad de los hallazgos en DAH y en CPHS en un modelo de mayor complejidad y relevancia fisiológica, como es el modelo de hígado aislado y perfundido (HAP). El rol de la inhibición de la endocitosis dependiente de clatrina con MDC en la colestasis por E17G se hizo también evidente en el modelo de HAP, donde se pudo observar que al inhibir la vía mencionada que se protege casi completamente del efecto producido por E17G sobre el FB (Figura 4.12 A) y totalmente sobre la velocidad de excreción de sustratos de Bsep (TC) (Figura 4.12 B) y Mrp2 (DNF-SG) (Figura 4.12 C). Se observó además en HAP que, al igual que en las imágenes confocales obtenidas en los modelos de DAH y de CPHS, que el pre-tratamiento con MDC previno de la internalización de los transportadores canaliculares inducida por E17G (Figura 4.13). Estos resultados nos permiten extender el rol crucial de la vía endocítica dependiente de clatrina en la internalización de los transportadores canaliculares Mrp2 y Bsep a un modelo con anatomía hepática conservada, sugiriendo así fuertemente la implicancia de esta vía endocítica en la colestasis por E17G *in vivo*.

A pesar que los resultados presentados hasta el momento acerca del hecho que el mecanismo de endocitosis de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 inducida por E17G

es dependiente de clatrina, hay evidencias que indican que, en condiciones fisiológicas, ambos se encuentran presentes principalmente en microdominios ricos en colesterol o balsas lipídicas, caveolina-1 positivos y clatrina negativos (*rafts*)^{97,99,128}. De este modo, dado que la endocitosis dependiente de clatrina es posible desde microdominios *no raft* (solubles en detergente, clatrina positivos, caveolina negativos y de bajo contenido en colesterol), hipotetizamos que en la colestasis inducida por E17G, las vías de señalización disparadas por el agente colestásico pueden estar modificando la ubicación específica de Bsep y Mrp2 en la membrana canalicular, migrando desde los microdominios *raft*, en donde se encuentran estables y funcionales, a microdominios *no raft*, desde donde pueden ser luego endocitados mediante un mecanismo dependiente de clatrina. Para demostrar esta hipótesis, analizamos mediante *WB* la distribución de Mrp2 y Bsep en fracciones de membrana enriquecidas en *rafts* y *no raft*s obtenidas a partir de muestras de hígados de ratas enteras, a las cuales se les provocó colestasis mediante una única inyección única en bolo de E17G. Hemos encontrado, en concordancia con los reportes previos^{94,95}, que Bsep y Mrp2 se encuentran en hígados controles mayoritariamente en microdominios *raft* (aproximadamente, 60% Bsep y 75% Mrp2), mientras que, luego de 20 minutos de la inyección de E17G, se produce una redistribución significativa de los transportadores, llevando a un enriquecimiento de los mismos en microdominios *no raft* (aproximadamente 80%), quedando sólo un 20% de los mismos en microdominios *raft*. La pureza de la separación de los microdominios de membrana se analizó por *WB* mediante el análisis de la expresión diferencial de caveolina (*rafts*) o clatrina (*no raft*s), no habiéndose detectado alteraciones significativas en la expresión de clatrina o caveolina como consecuencia de los tratamientos.

Marrone y col. han reportado recientemente que Bsep se encuentra en microdominios *raft*, coincidiendo con lo mencionado previamente, y que en la colestasis inducida por EE en ratas se produce una redistribución a microdominios *no raft*, lo cual puede contribuir a la alteración de la expresión y actividad de Bsep en esta patología⁹⁴. Interesantemente, nuestro grupo reportó que la glucuronización de EE es un requisito esencial para que pueda ejercer su efecto colestásico²³⁵. Así, es posible postular que, en la colestasis por EE, su metabolito glucuronizado, el cual es un potente colestásico agudo al igual que E17G¹⁵⁰, sea el responsable de inducir la migración de Bsep de microdominios *raft* a *no raft*, y la colestasis asociada a dicho cambio. Sugestivamente, la colestasis por EE está asociada a cambios en la expresión a nivel proteico, pero no de ARNm, de Mrp2 y Bsep^{140,141}. Esta disminución de la expresión de Bsep y Mrp2 de origen postranscripcional podría deberse a la degradación exacerbada de los mismos debida a la endocitosis inducida por el glucurónido de EE, la cual es sostenida en el tiempo por la constante producción del metabolito glucuronizado colestásico durante todo el período de tratamiento (5 días) con el compuesto que lo origina, EE.

Queda por establecer los mecanismos por los cuales estos metabolitos glucuronizados de estrógenos son capaces de inducir cambios en la distribución de transportadores canaliculares entre diferentes microdominios de membrana. Existen diferentes modos por los que una proteína podría integrarse preferencialmente a microdominios *raft*, a saber: *i*) haber sufrido un proceso metabólico conocido como "lipidación" (acilación de la proteína, unión a glicosilfosfatidilinositol o unión covalente de colesterol), *ii*) tener interacciones proteína-proteína con otras proteínas ancladas a *rafts*, o *iii*) poseer un patrón común de consenso de aminoácidos de reconocimiento e interacción al colesterol, conocido como "dominio CRAC" (por su acrónimo inglés "cholesterol recognition/interaction amino acid consensus"), del tipo: < L/V-(X)₍₁₋₅₎-Y-(X)₍₁₋₅₎-R/K >, donde (X)₁₋₅ representa entre 1 y 5 residuos de cualquier aminoácido²³⁶. Todos estos procesos pueden ser, al menos hipotéticamente, modulados por cambios metabólicos agudos mediados por cascadas de señalización, ya sea inhibiendo por fosforilación enzimas vinculadas con la lipidación o fosforilando *per se* a las proteínas involucradas, de modo de modificar la interacción proteína-proteína o la afinidad del dominio CRAC por el colesterol²³⁷. Por ejemplo, el transportador de dopamina en neuronas está asociado a *rafts* de membrana, y su fosforilación vía PKC estimula su endocitosis por un mecanismo dependiente de clatrina y dinamina²³⁸. De todos los motivos que explican la asociación preferencial de proteínas a microdominios *raft*, la existencia de un dominio CRAC es el más probable para proteínas transmembrana, como lo son los transportadores. Si bien no se ha aún buscado la existencia de dominios CRAC en Mrp2 y Bsep, 5 de dichos dominios existen en otro transportador ABC (BCRP/ABCG2), y esos dominios CRAC son indispensables para explicar la dependencia de su actividad con el colesterol de membrana²³⁷. Teniendo en cuenta que la actividad de transporte tanto de Bsep^{128,239} como de Mrp2²⁴⁰ depende críticamente de la presencia de colesterol en la membrana, la existencia de sitios de interacción con colesterol como los dominios CRAC es altamente probable.

Otro posible blanco de acción de E17G que podría facilitar la transferencia de Bsep y Mrp2 de microdominios *raft* a *no raft* es la bien conocida disrupción de la interacción de los mismos con radixin, una proteína de la familia ERM que ancla Mrp2 y Bsep a la membrana canalicular, uniéndola al citoesqueleto de actina (ver ítem 1.2.2.1.1.2). La desorganización de radixin es un fenómeno que se describió para la colestasis por EE y, dado que en esta patología el glucurónido de EE es el agente causal, es factible que también ocurra lo mismo en la colestasis por E17G. Existen algunas evidencias que sustentan la posibilidad de que la desorganización de radixin afecte la localización de Mrp2 y Bsep en microdominios de membrana. En forma general, el mantenimiento de la compartimentalización de lípidos y proteínas en microdominios *raft* y *no raft* depende crucialmente de la integridad del citoesqueleto de actina, cuya despolimerización lleva a una homogenización de la membrana

plasmática²⁴¹. La disrupción de la distribución hepatocelular de ezrina (otro miembro igual que radixin de la familia ERM pero de localización basolateral) por noqueo de keratina 8 se asoció a cambios profundos en la organización de *rafts* de membrana, y redistribución de una proteína ubicada en microdominios *raft* (FasR)²⁴². Es más, los propios microdominios *raft* como un todo (incluyendo sus componentes lipídicos) se vuelven más móviles cuando se pierde la unión de alguna de sus proteínas constituyentes con el citoesqueleto de actina, como se demostró para el caso de la proteína Cbp/PAR²⁴³.

Si, como hemos descrito, el microdominio *raft* es una zona de autoensamblado de constituyentes de membrana afines entre sí, conformados por ciertos lípidos (colesterol, esfingolípidos, glicosfingolípidos) y proteínas que tienen alta afinidad con esos lípidos o con otras proteínas que sí la poseen, y que ese ensamblaje es críticamente dependiente de sus interacciones intrínsecas y con proteínas asociadas al citoesqueleto de actina (por ej, proteínas de la familia ERM), resulta lógico especular que la pérdida de alguna de estas interacciones afecten al *raft* como un todo, modificando las afinidades de cada uno de sus componentes hacia la estructura de conjunto. Este cambio de afinidad puede ser un factor clave para explicar la migración de microentorno (*rafts* a *no rafts*) de Mrp2 y Bsep, ya sea secundaria a la desorganización de radixin, cambios en la afinidad de los mismos con lípidos enriquecidos en *rafts* (por ej., por cambios en el dominio CRAC), o cambios de afinidad, o incluso pérdida, de otras proteínas que pudieran retenerlos en dicho entorno. Claramente, muchos más estudios son necesarios para dilucidar el mecanismo, incluyendo la búsqueda de dominios aminoacídicos de interacción en esos transportadores con componentes *raft*, la caracterización de los cambios en la distribución de proteínas asociadas al citoesqueleto de actina en la colestasis por E17G y estudios biofísicos y moleculares que posibiliten un mejor entendimiento de los mecanismos y dinámica de formación/desensamblado de los microdominios *raft*.

Más allá de estimular la endocitosis dependiente de clatrina, la movilización a microdominios *no raft*, por el cambio del microentorno lipídico que eso conlleva, puede afectar la actividad intrínseca de los transportadores canaliculares que pudieran quedar transitoriamente retenidos en dicho microentorno. Por ejemplo, la actividad de transporte de Bsep se relaciona positivamente con el contenido de colesterol en la membrana, siendo ésta mucho mayor en los microdominios *raft*, lugar donde Bsep está localizado en condiciones fisiológicas^{128,239}. Aunque los mecanismos que explican esta modulación no han sido aún aclarados, se ha hipotetizado que el colesterol sería un modulador alostérico de BSEP, o que simplemente actuaría por cambios en la fluidez de membrana²³⁹. En cambio, la función de transporte de Mrp2 parece no ser influenciada por el microdominio de inserción (*raft* o *no raft*), como se demostró en células HepG2 donde se indujo movilización del transportador de

microdominios *raft* a *no raft* por depleción aguda de colesterol en membrana, sin que esto altere su función de transporte²⁴⁰. Esta afectación diferencial de la actividad intrínseca de Bsep y Mrp2 por su movilización a microdominios *no raft* podría explicar por qué la inhibición de la endocitosis mediada por clatrina con MDC en el HAP no previno completamente la disminución en excreción de sales biliares inducida por E17G, pero sí la del sustrato de Mrp2 DNP-SG (Figura 4.12). Si, como es esperable, MDC no previene la movilización de Bsep a esos microdominios sino sólo su posterior internalización, la mayor proporción de Bsep en microdominios *no raft* debiera redundar en una menor actividad secretora de sales biliares. Otro posible factor que podría explicar la inhibición selectiva de Bsep por E17G en HAP expuestos a MDC es la transinhibición de Bsep por el E17G excretado al canalículo biliar vía Mrp2¹⁵⁵; en este trabajo, se estudió la cinética de transporte de Bsep en presencia de E17G en vesículas de membrana plasmática de células Sf9 a las que se les hizo expresar Bsep o Bsep y Mrp2 simultáneamente, observándose sólo en el último caso una inhibición en la función de transporte de Bsep. Esto sugiere que E17G puede ejercer efectos inhibitorios sobre Bsep sólo luego de ser excretado vía Mrp2 (transinhibición). En nuestro modelo, donde la inhibición de la función de transporte de Mrp2 por E17G es completamente prevenida por MDC, dicha transinhibición podría ser totalmente operativa.

Mientras que la migración de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 hacia microdominios *no raft* sería esencial para explicar su endocitosis dependiente de clatrina inducida por E17G, este cambio de microdominio en la membrana canalicular, reportado también en la colestasis inducida por EE⁹⁴, podría explicar porqué proteínas de membrana canalicular localizadas exclusivamente en microdominios *raft* como la γ -glutamyl-transpeptidasa y la PA, la primera unida a microdominios *raft* por tetraspaninas²⁴⁴ y la última por glicosilfosfatidilinositol²⁴⁵, pueden ser encontradas en bilis en colestasis inducida por EE¹⁰⁴, a diferencia de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2, que no se encuentran en cantidades detectables²⁴⁶.

En condiciones colestásicas, las SB debido a su efecto detergente, podrían desestabilizar los microdominios *raft*, haciendo posible la pérdida de proteínas de membrana por bilis como las mencionadas anteriormente. En cambio, los transportadores canaliculares, debido a su migración a microdominios *no raft*, pueden ser endocitados; Este mecanismo endocítico podría contribuir a que los mismos no se pierdan en bilis por la acción de las SB, dejándolos disponibles en un pool intracelular para su posible reinserción en la membrana canalicular por vías endocíticas de reciclado, o bien recuperando los aminoácidos constituyentes en caso de degradación lisosomal.

Se muestra en la Figura 5.1 un esquema resumiendo los mecanismos puestos en

evidencia por nuestros estudios, que explican los cambios de localización, reciclado y destino de los transportadores canaliculares en colestasis por E17G.

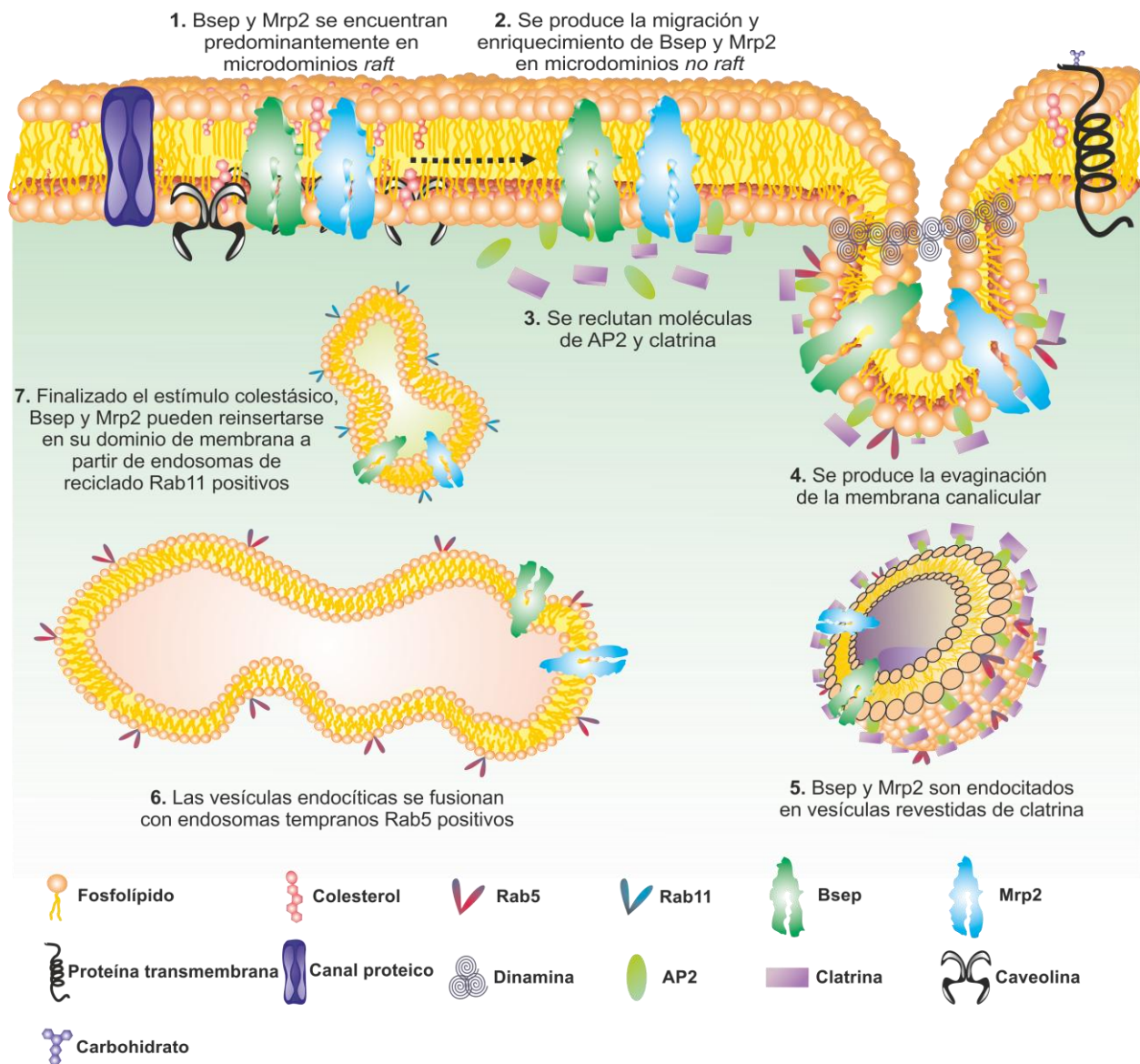


Figura 5.1: Mecanismos de endocitosis, reciclado y destino de los transportadores canaliculares en colestasis, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio.

5.3. LOS ESTUDIOS FOSFOPROTEÓMICOS Y BIOINFORMÁTICOS DEMOSTRARON QUE E17G INDUCE CAMBIOS EN EL NIVEL DE FOSFORILACIÓN DE MUCHAS PROTEÍNAS HEPATOCITARIAS, ALGUNAS DE LAS CUALES PODRÍAN CUMPLIR UN ROL MECANÍSTICO EN ESTA COLESTASIS

Por lo aquí expuesto, resulta de gran interés el estudio de los disparadores mecanísticos de los fenómenos evidenciados. En las vías de señalización involucradas en la colestasis por E17G participan muchas quinasas, actuando normalmente la fosforilación como un interruptor molecular rápido que regula las actividades de moléculas de señalización y de proteínas diana corriente abajo implicadas en el control de una amplia gama de procesos celulares. Es por ello que en el desarrollo de esta tesis se ha decidido hacer un análisis diferencial de la fosforilación de proteínas involucrada en colestasis por E17G mediante estudios fosfoproteómicos.

A partir de estos estudios, hemos identificado 48 proteínas que cambian su estado de fosforilación en respuesta a la administración de E17G. Además de estas proteínas, pueden no haber sido identificadas muchas otras, debido a limitaciones en la sensibilidad del método. En la misma, entra en juego la solubilización en mayor o menor medida de algunas proteínas (siendo más difícil la solubilización por ejemplo de proteínas de membrana), la sensibilidad de detección de los spots en los geles, los niveles de detección del espectrómetro de masa y la concentración de las proteínas fosforiladas en la muestra (por ejemplo, las proteínas involucradas en vías de señalización generalmente se encuentra en baja concentración con respecto a muchas otras). Es por ello que, para completar nuestro análisis, se ha utilizado el IPA para poder integrar la información obtenida por los análisis fosfoproteómicos y establecer posibles vías de interacción entre las proteínas identificadas.

Las vías personalizadas reveladas por IPA (Figura 4.14) tienen importantes implicancias para la comprensión de la patogénesis de la colestasis por E17G. El análisis de estas vías nos ha abierto un abanico de posibilidades para ampliar el estudio de los mecanismos inducidos por E17G a nivel molecular.

Del estudio de estas redes, hemos considerado de particular interés hacer un enfoque acerca de la posibilidad de que vías de señalización pro-colestásicas produzcan, vía activación de Rho-quinasa, una alteración del estado de fosforilación y de la función normal de proteínas de la familia ERM, en particular radixina (principal proteína de esta familia expresada en hepatocitos, y con una predominante localización canaliculada²⁴⁷), ya que se puede observar un marcado incremento en la fosforilación de radixina en una de las redes de interacción arrojadas por IPA (Figura 4.14 B). Las proteínas ERM son de vital importancia en la estabilización de proteínas de membrana apical debido a su rol como estructuras de entrecruzamiento entre la

membrana plasmática y los filamentos de actina. Se observó que ratones transgénicos a los que se les ha silenciado el gen que codifica para radixina presentan una marcada internalización de Mrp2 con alteraciones funcionales del mismo⁷⁷. En el mismo sentido, el silenciamiento del mismo gen en CPHS de rata provocó una similar relocalización de transportadores canaliculares, encontrándose éstos asociados a endosomas de reciclado, como lo sugiere su colocalización con Rab11, un marcador de estos compartimientos vesiculares²⁴⁷. Finalmente, se ha reportado una alteración en la colocalización de Mrp2 y radixina en modelos subagudos de colestasis en ratas (colestasis por ligadura de conductos biliares y colestasis por EE)¹¹², así como en varias hepatopatías crónicas en humanos, tales como la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la colestasis inducida por drogas, la colestasis obstructiva y la hepatitis autoinmune^{109,111,112,147}. En su estado nativo, las proteínas ERM poseen enmascarado sus dominios de unión tanto a membrana como a actina, siendo la fosforilación de radixina en su residuo Thr564 NH₂-terminal por Rho-quinasa necesaria para transformarla en su forma activa capaz de interactuar con la membrana y los filamentos de actina²²¹. Sin embargo, ha sido reportado que la expresión de una forma mutada de radixina que mimetiza una fosforilación constitutiva de la misma lleva a una pérdida de la misma de la membrana canalicular y redistribución en toda la célula²⁴⁸; los autores de este reporte especularon que sería necesario un ciclo de fosforilación y defosforilación continuo para el normal funcionamiento de radixina, ya que la fosforilación continua le conferiría una especie de "promiscuidad", llevándola a asociarse a la actina presente en toda la célula. A partir de este hallazgo, es posible especular que la activación de una vía que lleve a un rápido y sostenido incremento en la fosforilación de radixina pueda llevar a una alteración en la localización apical de la misma, y como consecuencia, de los transportadores canaliculares. En este sentido, varias vías de señalización involucradas en la patogénesis de la colestasis por E17G han sido involucradas como responsables de la activación de Rho-quinasa, tales como las dependientes de PKC^{249,250}, PI3K²⁵¹ y del receptor de estrógenos GPR30²⁵², lo cual hace altamente probable que Rho-quinasa sea un intermediario de la colestasis por E17G.

Otra posibilidad que se desprende del análisis fosfoproteómico, es indagar en el posible rol del E17G en la regulación de la expresión y función de proteínas de shock término (heat shock protein, Hsp), como las chaperonas moleculares Hsp70 y Hsp90, y sus co-chaperonas, como Hop y Hip, siendo estas últimas dos, proteínas con un aumento en su nivel de fosforilación en otra de las redes arrojadas por IPA (Figura 4.14 A). Todas estas proteínas mencionadas actúan en conjunto facilitando la correcta maduración y estabilización de proteínas de membrana, tales como receptores y transportadores²²²⁻²²⁴. Hsp90 y Hsp70 son chaperonas moleculares requeridas para el correcto plegamiento y tráfico de muchas proteínas involucradas en la traducción de señales²⁵³⁻²⁵⁵. En relación con esto, Hsp70 previene la alteración del transporte de

aniones orgánicos y SB inducido por lipopolisacárido a un nivel post-transcripcional, preservando la expresión apical de Mrp2 y Bsep^{256,257}, en contraste con la internalización endocítica de los mismos observada bajo este tratamiento^{258,124}. De hecho, se ha propuesto una interacción directa de las Hsp con los transportadores en la membrana plasmática como la explicación más probable para la protección observada. Esto es apoyado por la observación que Hsp70 se encuentra presente en membranas plasmáticas aisladas, y que ambos transportadores poseen un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos que se unen preferentemente a Hsp70²⁵⁷. La actividad de Hsp70 y Hsp90 como chaperonas moleculares es regulada por co-chaperonas como Hop y Hip²⁵⁹. Tanto Hop²⁶⁰ como Hip²⁶¹ son regulables por fosforilación, habiendo sido recientemente reportado que la fosforilación de Hop conduce a la inhibición de su función como co-chaperona²⁶⁰. Ha sido descrito que p90rsk es responsable de la fosforilación de Hop²⁶², mientras que tanto ERK1/2²⁶³ como PKC²⁶⁴, dos quinasas que se activan y participan en la colestasis por E17G^{86,158}, fueron capaces de activar p90rsk. Nuevamente, esta evidencia avala fuertemente la posibilidad de que este fenómeno se manifieste en la colestasis por E17G.

Claramente, nuevos posibles intermediarios de la colestasis por E17G han sido identificados en nuestros estudios de fosfoproteómica, lo cual abre expectativas para profundizar en el entendimiento de los mecanismos subyacentes a la endocitosis de transportadores canaliculares en esta colestasis. Dicho concimiento, podrá seguramente explicar muchas otras formas de colestasis de gran relevancia clínica, en las que este mecanismo endocítico de los transportadores canaliculares ha sido también descrito, por lo que estrategias terapéuticas emergentes basadas en su atenuación tienen altas probabilidades de ser trasladadas a la práctica clínica.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis soportan claramente la utilidad de los CPHS como un modelo *in vitro* para el estudio de cambios en la formación de bilis canalicular inducida ya sea por compuestos colestásicos como coleréticos. A tal fin, hemos proporcionado aquí una forma simple y eficaz para cuantificar los cambios en la generación de FB canalicular y la actividad de los transportadores involucrados en este fenómeno. Además, logramos reproducir, usando agentes colestásicos de relevancia clínica, el principal mecanismo fisiopatológico por el cual muchos compuestos colestásicos conducen a insuficiencia en la secreción biliar canalicular, esto es, la internalización endocítica de los transportadores canaliculares. Dado que en la actualidad existe un aumento en la demanda de modelos *in vitro* bien caracterizados y eficaces para el estudio del transporte polarizado hepatocelular a nivel molecular, tanto bajo condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, con los recursos metodológicos aquí desarrollados, el modelo de CPHS puede convertirse en una herramienta de elección para este propósito.

Los hallazgos realizados en la segunda parte de este trabajo, aportan evidencias sólidas en los diferentes modelos de estudio utilizados, incluyendo los CPHS, de que la endocitosis de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 en la patología colestásica inducida por E17G dependería de una redistribución de estos transportadores en su dominio de membrana desde microdominios *raft* a microdominios *no raft*, desde donde los mismos pueden ser endocitados en forma dependiente de clatrina y llevados hacia endosomas tempranos; desde allí, estos transportadores pueden ir de manera dependiente de microtúbulos hacia los endosomas de reciclado, para luego, de la misma manera, ser reinsertados en la membrana canalicular o ir a una vía degradativa lisosomal.

Los resultados obtenidos en los experimentos de fosfoproteómica y el posterior análisis bioinformático revelaron que E17G induce cambios en el estado de fosforilación de numerosas proteínas. Como fuera discutido anteriormente, alguna de estas proteínas podrían cumplir un rol en la estabilización de los transportadores canaliculares en su dominio de membrana, representando así potenciales blancos de las quinasas pro-colestásicas activadas por E17G, las cuales pueden producir cambios en las mismas que las lleven a cumplir un rol activo en la fisiopatología del proceso endocítico de transportadores canaliculares que ocurre en este, y potencialmente en otros modelos de colestasis.

Estos nuevos hallazgos concernientes a la mecanística asociada a la alteración en el transporte canalicular inducida por E17G, representan un importante avance para el completo entendimiento de los mecanismos patogénicos de la colestasis por estrógenos, pre-requisito para la concepción y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más efectivas capaces de contrarrestar las alteraciones postranscripcionales de los transportadores relevantes para la formación de bilis en esta patología. Considerando que la endocitosis y posterior degradación

de estos transportadores es el principal mecanismo que puede explicar estos cambios postranscripcionales, y dada la universalidad de este fenómeno, descrito virtualmente en todas las patologías colestásicas experimentales y clínicas²²⁵, las terapéuticas basadas en contrarrestarlo pueden ser de aplicación clínica generalizada. En el ser humano, las alteraciones postranscripcionales de transportadores hepatocelulares en colestasis son más frecuentes que las transcripcionales²⁶⁵, y si bien se cuenta con una amplia gama de posibilidades terapéuticas para aumentar su expresión a través del uso de nuevos y más potentes ligandos de factores de transcripción²⁶⁶, resulta necesario el desarrollo de estrategias terapéuticas complementarias que le confieran estabilidad en membrana a los transportadores sintetizados *de novo*, garantizando así su apropiada localización y funcionalidad.

Bibliografía

1. Christoforidis, S, McBride, HM, Burgoyne, RD and Zerial, M (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**: 621–5.
2. Mukherjee, S, Ghosh, RN and Maxfield, FR (1997). Endocytosis. *Physiol. Rev.* **77**: 759–803.
3. Bomsel, M, Prydz, K, Parton, RG, Gruenberg, J and Simons, K (1989). Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **109**: 3243–58.
4. Stenmark, H (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 513–25.
5. Apodaca, G (2001). Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**: 149–159.
6. Schwartz, SL, Cao, C, Pylypenko, O, Rak, A and Wandinger-Ness, A (2007). Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* **120**: 3905–10.
7. Zerial, M and McBride, H (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 107–17.
8. Maldonado-Báez, L and Wendland, B (2006). Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends Cell Biol.* **16**: 505–513.
9. Collins, BM, McCoy, AJ, Kent, HM, Evans, PR and Owen, DJ (2002). Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell* **109**: 523–535.
10. Jackson, LP, Kelly, BT, McCoy, AJ, Gaffry, T, James, LC, Collins, BM, *et al.* (2010). A Large-Scale Conformational Change Couples Membrane Recruitment to Cargo Binding in the AP2 Clathrin Adaptor Complex. *Cell* **141**: 1220–1229.
11. Sorkin, A (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 392–399.
12. Marks, MS, Woodruff, L, Ohno, H and Bonifacino, JS (1996). Protein targeting by tyrosine- and dileucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J. Cell Biol.* **135**: 341–54.
13. Praefcke, GJK and McMahon, HT (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 133–47.
14. Semerdjieva, S, Shortt, B, Maxwell, E, Singh, S, Fonarev, P, Hansen, J, *et al.* (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J. Cell Biol.* **183**: 499–511.
15. Simons, K and Ikonen, E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569–72.
16. Dietzen, DJ, Hastings, WR and Lublin, DM (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* **270**: 6838–42.
17. Monier, S, Dietzen, DJ, Hastings, WR, Lublin, DM and Kurzchalia, T V. (1996). Oligomerization of VIP21-caveolin in vitro is stabilized by long chain fatty acylation or cholesterol. *FEBS Lett.* **388**: 143–149.
18. Minshall, RD, Tirupathi, C, Vogel, SM, Niles, WD, Gilchrist, A, Hamm, HE, *et al.* (2000). Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J. Cell Biol.* **150**: 1057–70.
19. Pelkmans, L, Püntener, D and Helenius, A (2002). Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**: 535–9.

20. Pelkmans, L and Helenius, A (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic* **3**: 311–20.
21. Sharma, DK, Brown, JC, Choudhury, A, Peterson, TE, Holicky, E, Marks, DL, *et al.* (2004). Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3114–22.
22. Sabharanjak, S, Sharma, P, Parton, RG and Mayor, S (2002). GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct cdc42-Regulated, Clathrin-Independent Pinocytotic Pathway. *Dev. Cell* **2**: 411–423.
23. Damm, E-M, Pelkmans, L, Kartenbeck, J, Mezzacasa, A, Kurzchalia, T and Helenius, A (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* **168**: 477–88.
24. Kirkham, M and Parton, RG (2005). Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1745**: 273–286.
25. Cheng, Z-J, Singh, RD, Sharma, DK, Holicky, EL, Hanada, K, Marks, DL, *et al.* (2006). Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipid requirements. *Mol. Biol. Cell* **17**: 3197–210.
26. Grimmer, S, van Deurs, B and Sandvig, K (2002). Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J. Cell Sci.* **115**: 2953–62.
27. Marchisio, PC, Cirillo, D, Naldini, L, Primavera, M V, Teti, A and Zamboni-Zallone, A (1984). Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* **99**: 1696–705.
28. Hooiveld, GJ, van Montfoort, JE, Meijer, DK and Muller, M (2000). Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur J Pharm Sci* **12**: 13–30.
29. Tsuboi, K, Tazuma, S, Nishioka, T and Chayama, K (2004). Partial characterization of cytoprotective mechanisms of lecithin against bile salt-induced bile duct damage. *J Gastroenterol.* **39**: 955–960.
30. Anderson, JM (1993). Hepatocyte tight junctions in health and disease. *Prog.Liver Dis.* **11**: 45–68.
31. Kalaany, NY and Mangelsdorf, DJ (2006). LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **68**: 159–91.
32. Alnouti, Y (2009). Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol. Sci.* **108**: 225–46.
33. Mauad, TH, van Nieuwkerk, CM, Dingemans, KP, Smit, JJ, Schinkel, AH, Notenboom, RG, *et al.* (1994). Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am. J. Pathol.* **145**: 1237–45.
34. Fickert, P, Fuchsbichler, A, Wagner, M, Zollner, G, Kaser, A, Tilg, H, *et al.* (2004). Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* **127**: 261–74.
35. Cai, SY, Wang, L, Ballatori, N and Boyer, JL (2001). Bile salt export pump is highly conserved during vertebrate evolution and its expression is inhibited by PFIC type II mutations. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**: G316–22.
36. Sperber, I (1959). Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharmacol.Rev.* **11**: 109–134.
37. Huebert, RC, Splinter, PL, Garcia, F, Marinelli, RA and LaRusso, NF (2002). Expression and Localization of Aquaporin Water Channels in Rat Hepatocytes. Evidence for a role in canalicular

- bile secretion. *J. Biol. Chem.* **277**: 22710–22717.
38. Jessner, W, Zsembergy, A and Graf, J (2008). Transcellular water transport in hepatobiliary secretion and role of aquaporins in liver. *Wien. Med. Wochenschr.* **158**: 565–9.
 39. Marinelli, RA, Tietz, PS, Caride, AJ, Huang, BQ and LaRusso, NF (2003). Water transporting properties of hepatocyte basolateral and canalicular plasma membrane domains. *J. Biol. Chem.* **278**: 43157–62.
 40. Larocca, MC, Soria, LR, Espelt, M V, Lehmann, GL and Marinelli, RA (2009). Knockdown of hepatocyte aquaporin-8 by RNA interference induces defective bile canalicular water transport. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **296**: G93–100.
 41. Marinelli, RA and Larusso, NF (1996). Solute and water transport pathways in cholangiocytes. *Semin. Dis.* **16**: 221–229.
 42. Kullak-Ublick, GA, Beuers, U and Paumgartner, G (2000). Hepatobiliary transport. *J.Hepatol.* **32 Suppl 1**: 3–18.
 43. Kullak-Ublick, GA, Baretton, GB, Oswald, M, Renner, EL, Paumgartner, G and Beuers, U (2003). Expression of the hepatocyte canalicular multidrug resistance protein (MRP2) in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* **23**: 78–82.
 44. Gatmaitan, ZC and Arias, IM (1995). ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol. Rev.* **75** : 261–275.
 45. Borst, P and Elferink, RO (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **71**: 537–592.
 46. Kullak-Ublick, GA, Stieger, B, Hagenbuch, B and Meier, PJ (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin. Dis.* **20**: 273–292.
 47. Gerloff, T, Stieger, B, Hagenbuch, B, Madon, J, Landmann, L, Roth, J, *et al.* (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* **273**: 10046–10050.
 48. Arrese, M and Ananthanarayanan, M (2004). The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* **449**: 123–131.
 49. Akita, H, Suzuki, H, Ito, K, Kinoshita, S, Sato, N, Takikawa, H, *et al.* (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim.Biophys.Acta* **1511**: 7–16.
 50. Kullak-Ublick, GA, Ismail, MG, Stieger, B, Landmann, L, Huber, R, Pizzagalli, F, *et al.* (2001). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* **120**: 525–533.
 51. Yang, B and Hill, CE (2001). Nifedipine modulation of biliary GSH and GSSG/conjugate efflux in normal and regenerating rat liver. *Am. J. Physiol.* **281**: G85–G94.
 52. Ballatori, N and Truong, AT (1992). Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am. J. Physiol.* **263**: G617–G624.
 53. Crocenzi, FA, Mottino, AD and Roma, MG (2004). Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis: Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr Med Chem* **11**: 501–524.
 54. Esteller, A (2008). Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol* **14**: 5641–5649.
 55. Gatmaitan, ZC, Nies, AT and Arias, IM (1997). Regulation and translocation of ATP-dependent

- apical membrane proteins in rat liver. *Am. J. Physiol.* **272**: G1041–G1049.
56. Roma, MG, Crocenzi, FA and Sánchez Pozzi, EA (2008). Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin.Sci.(Lond)* **114**: 567–588.
 57. Elkjaer, M, Vajda, Z, Nejsum, LN, Kwon, T, Jensen, UB, Amiry-Moghaddam, M, *et al.* (2000). Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **276**: 1118–1128.
 58. Garcia, F, Kierbel, A, Larocca, MC, Gradilone, SA, Splinter, P, LaRusso, NF, *et al.* (2001). The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **276**: 12147–12152.
 59. Calamita, G, Mazzone, A, Bizzoca, A, Cavalier, A, Cassano, G, Thomas, D, *et al.* (2001). Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *Eur. J. Cell Biol.* **80**: 711–719.
 60. Banales, JM, Arenas, F, Rodríguez-Ortigosa, CM, Sáez, E, Uriarte, I, Doctor, RB, *et al.* (2006). Bicarbonate-rich choleresis induced by secretin in normal rat is taurocholate-dependent and involves AE2 anion exchanger. *Hepatology* **43**: 266–275.
 61. Kagawa, T, Misra, S, Varticovski, L and Arias, IM (2000). The mechanism whereby cAMP activates PI 3-kinase which regulates canalicular spgp. *Hepatology* **32**: 306A.
 62. Webster, CR and Anwer, MS (1999). Role of the PI3K/PKB signaling pathway in cAMP-mediated translocation of rat liver Ntcp. *Am. J. Physiol.* **277**: G1165–G1172.
 63. Cosentino, C, Di Domenico, M, Porcellini, A, Cuozzo, C, De Gregorio, G, Santillo, MR, *et al.* (2007). p85 regulatory subunit of PI3K mediates cAMP-PKA and estrogens biological effects on growth and survival. *Oncogene* **26**: 2095–103.
 64. Soria, LR, Gradilone, SA, Larocca, MC and Marinelli, RA (2009). Glucagon induces the gene expression of aquaporin-8 but not that of aquaporin-9 water channels in the rat hepatocyte. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**: R1274–81.
 65. Muller, M and Jansen, PL (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* **272**: G1285–G1303.
 66. Elferink, R, Paulusma, C and Groen, A (2006). Hepatocanalicular Transport Defects: Pathophysiologic Mechanisms of Rare Diseases. *Gastroenterology* **130**: 908–925.
 67. Cohen, DE, Angelico, M and Carey, MC (1990). Structural alterations in lecithin-cholesterol vesicles following interactions with monomeric and micellar bile salts: physical-chemical basis for subselection of biliary lecithin species and aggregative states of biliary lipids during bile formation. *J. Lipid Res.* **31**: 55–70.
 68. Trauner, M, Fickert, P and Wagner, M (2007). MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Semin. Liver Dis.* **27**: 77–98.
 69. Klaassen, CD and Aleksunes, LM (2010). Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* **62**: 1–96.
 70. Wittenburg, H and Carey, MC (2002). Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J. Clin. Invest.* **110**: 605–9.
 71. Lam, P, Xu, S, Soroka, CJ and Boyer, JL (2012). A C-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology* **55**: 1901–11.
 72. Hayashi, H, Mizuno, T, Horikawa, R, Nagasaka, H, Yabuki, T, Takikawa, H, *et al.* (2012). 4-

- Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocanicular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J. Hepatol.* **56**: 1136–44.
73. Ortiz, DF, Moseley, J, Calderon, G, Swift, AL, Li, S and Arias, I (2004). Identification of HAX-1 as a Protein That Binds Bile Salt Export Protein and Regulates Its Abundance in the Apical Membrane of Madin-Darby Canine Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 32761–32770.
74. Hayashi, H and Sugiyama, Y (2007). 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* **45**: 1506–1516.
75. Hayashi, H, Inamura, K, Aida, K, Naoi, S, Horikawa, R, Nagasaka, H, *et al.* (2012). AP2 mediates BSEP internalization and modulates its hepatocanicular expression and transport function. *Hepatology* doi:10.1002/hep.25591.
76. Aida, K, Hayashi, H, Inamura, K, Mizuno, T and Sugiyama, Y (2014). Differential roles of ubiquitination in the degradation mechanism of cell surface-resident bile salt export pump and multidrug resistance-associated protein 2. *Mol Pharmacol* **85**: 482–491.
77. Kikuchi, S, Hata, M, Fukumoto, K, Yamane, Y, Matsui, T, Tamura, A, *et al.* (2002). Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat. Genet.* **31**: 320–325.
78. Li, M, Wang, W, Soroka, CJ, Mennone, A, Harry, K, Weinman, EJ, *et al.* (2010). NHERF-1 binds to Mrp2 and regulates hepatic Mrp2 expression and function. *J. Biol. Chem.* **285**: 19299–19307.
79. Przybylla, S, Stindt, J, Kleinschrodt, D, Schulte am Esch, J, Häussinger, D, Keitel, V, *et al.* (2016). Analysis of the Bile Salt Export Pump (ABCB11) Interactome Employing Complementary Approaches. In: Szakacs, G (ed.). *PLoS One* **11**: e0159778.
80. Soroka, CJ, Pate, MK and Boyer, JL (1999). Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver. *J. Biol. Chem.* **274**: 26416–26424.
81. Sai, Y, Nies, AT and Arias, IM (1999). Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J. Cell Sci.* **112**: 4535–4545.
82. Wakabayashi, Y (2006). Transporters on Demand: Intracellular Reservoirs and Cycling of Bile Canalicular ABC Transporters. *J. Biol. Chem.* **281**: 27669–27673.
83. Wakabayashi, Y, Lippincott-Schwartz, J and Arias, IM (2004). Intracellular Trafficking of Bile Salt Export Pump (ABCB11) in Polarized Hepatic Cells: Constitutive Cycling between the Canalicular Membrane and rab11-positive Endosomes. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3485–3496.
84. Bi, GQ, Morris, RL, Liao, G, Alderton, JM, Scholey, JM and Steinhardt, RA (1997). Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺-regulated exocytosis. *J Cell Biol.* **138**: 999–1008.
85. Hoekstra, D, Tyteca, D and van, IJSC (2004). The subapical compartment: a traffic center in membrane polarity development. *J Cell Sci* **117**: 2183–2192.
86. Boaglio, AC, Zucchetti, AE, Toledo, FD, Barosso, IR, Sánchez Pozzi, EJ, Crocenzi, FA, *et al.* (2012). ERK1/2 and p38 MAPKs are complementarily involved in estradiol 17 β -D-glucuronide-induced cholestasis: crosstalk with cPKC and PI3K. *PLoS One* **7**: e49255.
87. Kipp, H and Arias, IM (2002). Trafficking of Canalicular ABC Transporters in Hepatocytes. *Annu. Rev. Physiol.* **64**: 595–608.
88. Kipp, H, Pichetshote, N and Arias, IM (2000). Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J. Biol. Chem.* **276**: 7218–7224.

89. Grant, BD and Donaldson, JG (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 597–608.
90. Rietveld, A and Simons, K (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 467–79.
91. Brown, DA and London, E (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111–36.
92. Brown, DA and London, E (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* **164**: 103–14.
93. Brown, DA and London, E (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **275**: 17221–4.
94. Marrone, J, Soria, LR, Danielli, M, Lehmann, GL, Larocca, MC and Marinelli, RA (2016). Hepatic Gene Transfer of Human Aquaporin-1 Improves Bile Salt Secretory Failure in Rats with Estrogen-Induced Cholestasis. *Hepatology* doi:10.1002/hep.28564.
95. Tietz, P, Jefferson, J, Pagano, R and Larusso, NF (2005). Membrane microdomains in hepatocytes: potential target areas for proteins involved in canalicular bile secretion. *J. Lipid Res.* **46**: 1426–32.
96. Moreno, M, Molina, H, Amigo, L, Zanlungo, S, Arrese, M, Rigotti, A, *et al.* (2003). Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice. *Hepatology* **38**: ajhep09011.
97. Guyot, C and Stieger, B (2011). Interaction of bile salts with rat canalicular membrane vesicles: evidence for bile salt resistant microdomains. *J. Hepatol.* **55**: 1368–76.
98. Carey, MC and Small, DM (1978). The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J. Clin. Invest.* **61**: 998–1026.
99. Ismail, MG, Hausler, S, Stuermer, CA, Guyot, C, Meier, PJ, Roth, J, *et al.* (2009). 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.
100. Billington, D, Evans, CE, Godfrey, PP and Coleman, R (1980). Effects of bile salts on the plasma membranes of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **188**: 321–327.
101. Godfrey, PP, Warner, MJ and Coleman, R (1981). Enzymes and proteins in bile. Variations in output in rat cannula bile during and after depletion of the bile-salt pool. *Biochem. J.* **196**: 11–6.
102. Arrese, M, Pizarro, M, Solís, N, Koenig, C and Accatino, L (1995). Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in ethynylestradiol-induced cholestasis. Effects of ursodeoxycholic acid administration. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 1223–32.
103. Wielandt, AM, Pizarro, M, Solís, N, Arrese, M and Accatino, L (1993). Postcholestatic alkaline phosphatase activity after relief of bile duct obstruction in the rat. *Hepatology* **18**: 179–87.
104. Accatino, L, Figueroa, C, Pizarro, M and Solís, N (1995). 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.
105. Accatino, L, Pizarro, M, Solís, N and Koenig, CS (1995). Association of canalicular membrane enzymes with bile acid micelles and lipid aggregates in human and rat bile. *Biochim. Biophys. Acta* **1243**: 33–42.
106. Shaffer, EA (2002). Cholestasis: the ABCs of cellular mechanisms for impaired bile secretion--transporters and genes. *Can. J. Gastroenterol.* **16**: 380–9.
107. García, C. Fisiopatología de la colestasis. *Med Int Mex* **22**, 411-421.

108. Hoshino, M, Tanaka, A, Hayakawa, T, Ohiwa, T, Katagiri, K, Miyaji, M, *et al.* (1996). Enhancing effects of vasoconstrictors on bile flow and bile acid excretion in the isolated perfused rat liver. *Biochem Pharmacol.* **52**: 489–495.
109. Kojima, H, Nies, AT, König, J, Hagmann, W, Spring, H, Uemura, M, *et al.* (2003). Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* **39**: 693–702.
110. Shoda, J, Kano, M, Oda, K, Kamiya, J, Nimura, Y, Suzuki, H, *et al.* (2001). The expression levels of plasma membrane transporters in the cholestatic liver of patients undergoing biliary drainage and their association with the impairment of biliary secretory function. *Am. J. Gastroenterol.* **96**: 3368–78.
111. Watanabe, N, Takashimizu, S, Kojima, S, Kagawa, T, Nishizaki, Y, Mine, T, *et al.* (2007). Clinical and pathological features of a prolonged type of acute intrahepatic cholestasis. *Hepatol. Res.* **37**: 598–607.
112. Kojima, H, Sakurai, S, Uemura, M, Kitamura, K, Kanno, H, Nakai, Y, *et al.* (2008). Disturbed colocalization of multidrug resistance protein 2 and radixin in human cholestatic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* **23**: e120–8.
113. Mottino, AD, Cao, J, Veggi, LM, Crocenzi, F, Roma, MG and Vore, M (2002). Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* **35**: 1409–1419.
114. Crocenzi, FA, Mottino, AD, Cao, J, Veggi, LM, Sánchez Pozzi, EJ, Vore, M, *et al.* (2003). Estradiol-17 β -D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**: G449–59.
115. Beuers, U, Bilzer, M, Chittattu, A, Kullack-Ublick, GA, Keppler, D, Paumgartner, G, *et al.* (2001). Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C–dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* **33**: 1206–1216.
116. Crocenzi, FA, Mottino, AD, Sánchez Pozzi, EJ, Pellegrino, JM, Rodríguez Garay, EA, Milkiewicz, P, *et al.* (2003). Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut* **52**: 1170–7.
117. Roman, ID, Fernandez-Moreno, MD, Fueyo, JA, Roma, MG and Coleman, R (2003). Cyclosporin A induced internalization of the bile salt export pump in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicol Sci* **71**: 276–281.
118. Perez, LM, Milkiewicz, P, Elias, E, Coleman, R, Sanchez Pozzi, EJ and Roma, MG (2006). Oxidative Stress Induces Internalization of the Bile Salt Export Pump, Bsep, and Bile Salt Secretory Failure in Isolated Rat Hepatocyte Couplets: A Role for Protein Kinase C and Prevention by Protein Kinase A. *Toxicol. Sci.* **91**: 150–158.
119. Schmitt, M, Kubitz, R, Wettstein, M, vom Dahl, S and Haussinger, D (2000). Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol.Chem* **381**: 487–495.
120. Sekine, S, Ito, K and Horie, T (2006). Oxidative stress and Mrp2 internalization. *Free Radic. Biol. Med.* **40**: 2166–2174.
121. Dombrowski, F, Kubitz, R, Chittattu, A, Wettstein, M, Saha, N and Haussinger, D (2000). Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J* **348 Pt 1**: 183–188.
122. Elferink, MG, Olinga, P, Draaisma, AL, Merema, MT, Faber, KN, Slooff, MJ, *et al.* (2004). LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process. *Am J*

- Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**: G1008–16.
123. Vos, TA, Hooiveld, GJEJ, Koning, H, Childs, S, Meijer, DKF, Moshage, H, *et al.* (1998). Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* **28**: 1637–1644.
 124. Zinchuk, V, Zinchuk, O and Okada, T (2005). Experimental LPS-induced cholestasis alters subcellular distribution and affects colocalization of Mrp2 and Bsep proteins: A quantitative colocalization study. *Microsc. Res. Tech.* **67**: 65–70.
 125. Paulusma, CC, Kothe, MJ, Bakker, CT, Bosma, PJ, van, BI, van Marle, J, *et al.* (2000). Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* **31**: 684–693.
 126. Kubitz, R, Huth, C, Schmitt, M, Horbach, A, Kullak-Ublick, G and Haussinger, D (2001). Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology* **34**: 340–350.
 127. Mottino, AD, Hoffman, T, Crocenzi, FA, Sánchez Pozzi, EJ, Roma, MG and Vore, M (2007). Disruption of function and localization of tight junctional structures and Mrp2 in sustained estradiol-17 β -D-glucuronide-induced cholestasis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **293**: G391–G402.
 128. Paulusma, CC, de Waart, DR, Kunne, C, Mok, KS and Elferink, RPJO (2009). Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content. *J. Biol. Chem.* **284**: 9947–54.
 129. Chitturi, S and Farrell, GC (2001). Drug-induced cholestasis. *Semin. Gastrointest. Dis.* **12**: 113–24.
 130. Dourakis, SP and Tolis, G (1998). Sex hormonal preparations and the liver. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* **3**: 7–16.
 131. Bacq, Y, Myara, A, Brechot, MC, Hamon, C, Studer, E, Trivin, F, *et al.* (1995). Serum conjugated bile acid profile during intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J. Hepatol.* **22**: 66–70.
 132. Laatikainen, T and Tulenheimo, A (1984). Maternal serum bile acid levels and fetal distress in cholestasis of pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **22**: 91–4.
 133. Geenes, V and Williamson, C (2009). Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J. Gastroenterol.* **15**: 2049–66.
 134. Schreiber, AJ and Simon, FR (1983). Estrogen-induced cholestasis: clues to pathogenesis and treatment. *Hepatology* **3**: 607–613.
 135. Reyes, H, Gonzalez, MC, Ribalta, J, Aburto, H, Matus, C, Schramm, G, *et al.* (1978). Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in Chile. *Ann. Intern. Med.* **88**: 487–93.
 136. Kauppila, A, Korpela, H, Mäkilä, UM and Yrjänheikki, E (1987). Low serum selenium concentration and glutathione peroxidase activity in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* **294**: 150–2.
 137. Lazaridis, KN, Gores, GJ and Lindor, KD (2001). Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J. Hepatol.* **35**: 134–146.
 138. Bossard, R, Stieger, B, O'Neill, B, Fricker, G and Meier, PJ (1993). Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J. Clin. Invest.* **91**: 2714–2720.
 139. Simon, FR, Fortune, J, Iwahashi, M, Gartung, C, Wolkoff, AW and Sutherland, E (1996). Ethinylestradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters. *Am. J. Physiol.* **271**: G1043–G1052.

140. Lee, JM, Trauner, M, Soroka, CJ, Stieger, B, Meier, PJ and Boyer, JL (2000). Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **118**: 163–172.
141. Trauner, M, Arrese, M, Soroka, CJ, Ananthanarayanan, M, Koepfel, TA, Schlosser, SF, *et al.* (1997). The rat canalicular conjugate export pump (Mrp2) is down-regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* **113**: 255–264.
142. Geier, A, Dietrich, CG, Voigt, S, Kim, SK, Gerloff, T, Kullak-Ublick, GA, *et al.* (2003). Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* **38**: 345–354.
143. Alvaro, D, Gigliozzi, A, Piat, C, Carli, L, Fraioli, F, Romeo, R, *et al.* (1997). Inhibition of biliary bicarbonate secretion in ethinylestradiol-induced cholestasis is not associated with impaired activity of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the rat. *J.Hepatol.* **26**: 146–157.
144. Bouchard, G, Yousef, IM and Tuchweber, B (1994). Decreased biliary glutathione content is responsible for the decline in bile salt-independent flow induced by ethinylestradiol in rats. *Toxicol. Lett.* **74**: 221–233.
145. Forker, EL (1969). The effect of estrogen on bile formation in the rat. *J. Clin. Invest.* **48**: 654–663.
146. Elias, E, Iqbal, S, Knutton, S, Hickey, A and Coleman, R (1983). Increased tight junction permeability: a possible mechanism of oestrogen cholestasis. *Eur J Clin Invest* **13**: 383–390.
147. Kojima, H, Sakurai, S, Yoshiji, H, Uemura, M, Yoshikawa, M and Fukui, H (2008). The role of radixin in altered localization of canalicular conjugate export pump Mrp2 in cholestatic rat liver. *Hepatol. Res.* **38**: 202–210.
148. Sánchez Pozzi, EJ, Crocenzi, FA, Pellegrino, JM, Catania, VA, Luquita, MG, Roma, MG, *et al.* (2003). Ursodeoxycholate reduces ethinylestradiol glucuronidation in the rat: role in prevention of estrogen-induced cholestasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**: 279–286.
149. Crocenzi, FA, D'Andrea, V, Catania, VA, Luquita, MG, Pellegrino, JM, Ochoa, JE, *et al.* (2005). Prevention of Mrp2 activity impairment in ethinylestradiol-induced cholestasis by ursodeoxycholate in the rat. *Drug Metab. Dispos.* **33**: 888–91.
150. Vore, M, Hadd, H and Slikker Jr., W (1983). Ethinylestradiol-17 α D-ring glucuronide conjugates are potent cholestatic agents in the rat. *Life Sci.* **32**: 2989–2993.
151. Vore, M, Liu, Y and Huang, L (1997). Cholestatic properties and hepatic transport of steroid glucuronides. *Drug.Metabol.Rev.* **29**: 183–203.
152. Meyers, M, Slikker, W, Pascoe, G and Vore, M (1980). Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 beta-D-glucuronide in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**: 87–93.
153. Mottino, AD, Crocenzi, FA, Pozzi, EJ, Veggi, LM, Roma, MG and Vore, M (2005). Role of microtubules in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced alteration of canalicular Mrp2 localization and activity. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **288**: G327–G336.
154. Huang, L, Smit, JW, Meijer, DKF and Vore, M (2000). Mrp2 is essential for estradiol 17-b(b-D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology* **32**: 66–72.
155. Stieger, B, Fattinger, K, Madon, J, Kullak-Ublick, GA and Meier, PJ (2000). Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* **118**: 422–430.
156. Beuers, U, Denk, GU, Soroka, CJ, Wimmer, R, Rust, C, Paumgartner, G, *et al.* (2003). Tauro lithocholic Acid Exerts Cholestatic Effects via Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanisms in Perfused Rat Livers and Rat Hepatocyte Couplets. *J. Biol. Chem.* **278**: 17810–17818.

157. Kubitz, R, Sutfels, G, Kuhlkamp, T, Kolling, R and Haussinger, D (2004). Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology* **126**: 541–553.
158. Crocenzi, FA, Sanchez Pozzi, EJ, Ruiz, ML, Zucchetti, AE, Roma, MG, Mottino, AD, *et al.* (2008). Ca(2+)-dependent protein kinase C isoforms are critical to estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in the rat. *Hepatology* **48**: 1885–1895.
159. Boaglio, AC, Zucchetti, AE, Sanchez Pozzi, EJ, Pellegrino, JM, Ochoa, JE, Mottino, AD, *et al.* (2010). Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is involved in estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis: complementarity with classical protein kinase C. *Hepatology* **52**: 1465–1476.
160. Barosso, IR, Zucchetti, AE, Boaglio, AC, Larocca, MC, Taborda, DR, Luquita, MG, *et al.* (2012). Sequential Activation of Classic PKC and Estrogen Receptor α Is Involved in Estradiol 17 β -D-Glucuronide-Induced Cholestasis. *PLoS One* **7**.
161. Medunjanin, S, Hermani, A, De Servi, B, Grisouard, J, Rincke, G and Mayer, D (2005). Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J. Biol. Chem.* **280**: 33006–14.
162. Barosso, IR, Zucchetti, AE, Miszczuk, GS, Boaglio, AC, Taborda, DR, Roma, MG, *et al.* (2015). EGFR participates downstream of ER α in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced impairment of Abcc2 function in isolated rat hepatocyte couplets. *Arch. Toxicol.* **90**: 891–903.
163. Cantore, M, Reinehr, R, Sommerfeld, A, Becker, M and Häussinger, D (2011). The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane. *J. Biol. Chem.* **286**: 45014–45029.
164. Wilde, A, Beattie, EC, Lem, L, Riethof, DA, Liu, S-H, Mobley, WC, *et al.* (1999). EGF Receptor Signaling Stimulates SRC Kinase Phosphorylation of Clathrin, Influencing Clathrin Redistribution and EGF Uptake. *Cell* **96**: 677–687.
165. Zimmerman, B, Simaan, M, Lee, M-H, Luttrell, LM and Laporte, SA (2009). c-Src-mediated phosphorylation of AP-2 reveals a general mechanism for receptors internalizing through the clathrin pathway. *Cell. Signal.* **21**: 103–110.
166. Zucchetti, AE, Barosso, IR, Boaglio, AC, Basiglio, CL, Miszczuk, G, Larocca, MC, *et al.* (2014). G-protein-coupled receptor 30/adenylyl cyclase/protein kinase A pathway is involved in estradiol 17 β -D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* **59**: 1016–29.
167. Howe, CJ, Lahair, MM, McCubrey, JA and Franklin, RA (2004). Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **279**: 44573–81.
168. Zucchetti, A., Toledo, FD, Barosso, IR, Ochoa, J., Crocenzi, FA and Sánchez Pozzi, EJ (2010). Role of calcium-calmodulin pathway in estradiol-17 β -glucuronide induced impairment of canalicular secretion in isolated rat hepatocyte couplets. *J. Hepatol.* **52**: 386.
169. Macek, B, Mann, M and Olsen, J V (2009). Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**: 199–221.
170. Aebersold, R and Mann, M (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**: 198–207.
171. Eyrich, B, Sickmann, A and Zahedi, RP (2011). Catch me if you can: mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies. *Proteomics* **11**: 554–70.
172. Kubitz, R, Saha, N, Kuhlkamp, T, Dutta, S, vom Dahl, S, Wettstein, M, *et al.* (2004). Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* **279**: 10323–10330.
173. Beuers, U, Probst, I, Soroka, C, Boyer, JL, Kullak-Ublick, GA and Paumgartner, G (1999). Modulation

- of protein kinase C by tauroolithocholic acid in isolated rat hepatocytes. *Hepatology* **29**: 477–482.
174. Roma, MG, Crocenzi, FA and Mottino, A (2008). Dynamic localization of hepatocellular transporters in health and disease. *World J.Gastroenterol.* **14**: 6786–6801.
175. Schonhoff, CM, Gillin, H, Webster, CRL and Anwer, MS (2007). Protein kinase C δ mediates cyclic adenosine monophosphate-stimulated translocation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and multidrug resistant associated protein 2 in rat hepatocytes. *Hepatology* **47**: 1309–1316.
176. Schonhoff, CM, Webster, CR and Anwer, MS (2010). Cyclic AMP stimulates Mrp2 translocation by activating p38{alpha} MAPK in hepatic cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G667–74.
177. Crocenzi, FA, Basiglio, CL, Perez, LM, Portesio, MS, Sanchez Pozzi, EJ and Roma, MG (2005). Silibinin prevents cholestasis-associated retrieval of the bile salt export pump, Bsep, in isolated rat hepatocyte couplets: possible involvement of cAMP. *Biochem. Pharmacol.* **69**: 1113–1120.
178. Crocenzi, FA, Mottino, AD, Cao, J, Veggi, LM, Sánchez Pozzi, EJ, Vore, M, *et al.* (2003). Estradiol-17 β -D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **285**.
179. Zucchetti, AE, Barosso, IR, Boaglio, A, Pellegrino, JM, Ochoa, EJ, Roma, MG, *et al.* (2011). Prevention of estradiol 17beta-D-glucuronide-induced canalicular transporter internalization by hormonal modulation of cAMP in rat hepatocytes. *Mol. Biol. Cell* **22**: 3902–15.
180. Kurz, AK, Graf, D, Schmitt, M, vom Dahl, S and Häussinger, D (2001). Tauroursodesoxycholate-Induced Choleresis Involves p38MAPK Activation and Translocation of the Bile Salt Export Pump in Rats. *Gastroenterology* **121**: 407–419.
181. Dombrowski, F, Stieger, B and Beuers, U (2005). Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab. Investig.* **86**: 166–174.
182. Wimmer, R, Hohenester, S, Pusl, T, Denk, GU, Rust, C and Beuers, U (2008). Tauroursodeoxycholic acid exerts anticholestatic effects by a cooperative cPKC alpha-/PKA-dependent mechanism in rat liver. *Gut* **57**: 1448–1454.
183. Schliess, F, Kurz, AK, vom Dahl, S and Haussinger, D (1997). Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* **113**: 1306–1314.
184. Denk, GU, Hohenester, S, Wimmer, R, Böhländ, C, Rust, C and Beuers, U (2008). Role of mitogen-activated protein kinases in tauroursodeoxycholic acid-induced bile formation in cholestatic rat liver. *Hepatol. Res.* **38**: 717–726.
185. Coleman, R and Roma, MG (2000). Hepatocyte couplets. *Biochem Soc.Trans.* **28**: 136–140.
186. Milkiewicz, P, Roma, MG, Elias, E and Coleman, R (2002). Hepatoprotection with tauroursodeoxycholate and á-muricholate against tauroolithocholate induced cholestasis: involvement of signal transduction pathways. *Gut* **51**: 113–119.
187. Crocenzi, FA, Sanchez Pozzi, EJ, Pellegrino, JM, Rodriguez Garay, EA, Mottino, AD and Roma, MG (2003). Preventive effect of silymarin against tauroolithocholate-induced cholestasis in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 355–364.
188. Milkiewicz, P, Roma, MG, Mills, CO, Coleman, R and Elias, E (1999). Tauroursodeoxycholate (TUDCA) protects against redistribution of multidrug resistant protein 2 (Mrp2) and disruption of F-actin caused by tauroolithocholate (TLC); a study in isolated rat hepatocyte couplets. *Hepatology* **30**: 462A.
189. Schonhoff, CM, Webster, CR and Anwer, MS (2013). Tauroolithocholate-induced MRP2 retrieval

- involves MARCKS phosphorylation by protein kinase C in HUH-NTCP Cells. *Hepatology* **58**: 284–292.
190. Zucchetti, AE, Barosso, IR, Boaglio, AC, Luquita, MG, Roma, MG, Crocenzi, FA, *et al.* (2013). Hormonal modulation of hepatic cAMP prevents estradiol 17 β -D-glucuronide-induced cholestasis in perfused rat liver. *Dig Dis Sci* **58**: 1602–1614.
191. Wilton, JC, Coleman, R, Lankester, DJ and Chipman, JK (1993). Stability and optimization of canalicular function in hepatocyte couplets. *Cell.Biochem.Funct.* **11**: 179–185.
192. Dunn, JC, Yarmush, ML, Koebe, HG and Tompkins, RG (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J* **3**: 174–177.
193. Dunn, JC, Tompkins, RG and Yarmush, ML (1991). Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog* **7**: 237–245.
194. Dunn, JC, Tompkins, RG and Yarmush, ML (1992). Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *J.Cell Biol.* **116**: 1043–1053.
195. Liu, X, LeCluyse, EL, Brouwer, KR, Gan, LS, Lemasters, JJ, Stieger, B, *et al.* (1999). Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am.J.Physiol* **277**: G12–G21.
196. Kruglov, EA, Gautam, S, Guerra, MT and Nathanson, MH (2011). Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes. *Hepatology* **54**: 1790–1799.
197. Cruz, LN, Guerra, MT, Kruglov, E, Mennone, A, Garcia, CR, Chen, J, *et al.* (2010). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 by calcium signaling in mouse liver. *Hepatology* **52**: 327–337.
198. Nakanishi, T, Shibue, Y, Fukuyama, Y, Yoshida, K, Fukuda, H, Shirasaka, Y, *et al.* (2011). Quantitative time-lapse imaging-based analysis of drug-drug interaction mediated by hepatobiliary transporter, multidrug resistance-associated protein 2, in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **39**: 984–991.
199. Williams, BR, Gelman, RA, Poppke, DC and Piez, KA (1978). Collagen fibril formation. Optimal in vitro conditions and preliminary kinetic results. *J. Biol. Chem.* **253**: 6578–85.
200. Berry, MN and Friend, DS (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* **43**: 506–520.
201. Wilton, JC, Williams, DE, Strain, AJ, Parslow, RA, Chipman, JK and Coleman, R (1991). Purification of hepatocyte couplets by centrifugal elutriation. *Hepatology* **14**: 180–183.
202. Sanders, MJ and Soll, AH (1989). Cell separation by elutriation: major and minor cell types from complex tissues. *Methods Enzymol.* **171**: 482–97.
203. Meyer, C, Godoy, P, Bachmann, A, Liu, Y, Barzan, D, Ilkavets, I, *et al.* (2011). Distinct role of endocytosis for Smad and non-Smad TGF-beta signaling regulation in hepatocytes. *J Hepatol* **55**: 369–378.
204. Roma, MG, Milkiewicz, P, Elias, E and Coleman, R (2000). Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocyte couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology* **32**: 1342–1356.
205. Maglova, LM, Jackson, AM, Meng, XJ, Carruth, MW, Schteingart, CD, Ton-Nu, HT, *et al.* (1995). Transport characteristics of three fluorescent conjugated bile acid analogs in isolated rat hepatocytes and couplets. *Hepatology* **22**: 637–647.
206. Roelofsen, H, Soroka, CJ, Keppler, D and Boyer, JL (1998). Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets.

- J. Cell Sci.* **111**: 1137–1145.
207. Mottino, AD, Crocenzi, FA, Pozzi, EJS, Veggi, LM, Roma, MG and Vore, M (2005). Role of microtubules in estradiol-17 β -D-glucuronide-induced alteration of canalicular Mrp2 localization and activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**: G327–G336.
208. Baur, H, Kasperek, S and Pfaff, E (1975). Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem* **356**: 827–838.
209. Miszczuk, GS, Barosso, IR, Zucchetti, AE, Boaglio, AC, Pellegrino, JM, Sánchez Pozzi, EJ, *et al.* (2015). Sandwich-cultured rat hepatocytes as an in vitro model to study canalicular transport alterations in cholestasis. *Arch. Toxicol.* **89**: 979–990.
210. Yuan, B, Latek, R, Hossbach, M, Tuschl, T and Lewitter, F (2004). siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res.* **32**: W130–4.
211. LOWRY, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, RANDALL, RJ, ROSEBROUGH, NJ, Farr, AL, *et al.* (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
212. Kemp, DC and Brouwer, KLR (2004). Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure. *Toxicol. Vitro.* **18**: 869–877.
213. Talalay, P (1960). Enzymatic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem.* **8**: 119–143.
214. Hinchman, CA, Matsumoto, H, Simmons, TW and Ballatori, N (1991). Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J. Biol. Chem.* **266**: 22179–22185.
215. Dai, L, Li, C, Shedden, KA, Misek, DE and Lubman, DM (2009). Comparative proteomic study of two closely related ovarian endometrioid adenocarcinoma cell lines using cIEF fractionation and pathway analysis. *Electrophoresis* **30**: 1119–31.
216. Marinelli, RA, Pham, L, Agre, P and LaRusso, NF (1997). Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1. *J. Biol. Chem.* **272**: 12984–8.
217. van der Wouden, JM (2002). Oncostatin M regulates membrane traffic and stimulates bile canalicular membrane biogenesis in HepG2 cells. *EMBO J.* **21**: 6409–6418.
218. Laemmli, UK, Beguin, F and Gujer-Kellenberger, G (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol.* **47**: 69–85.
219. Roma, MG, Peñalva, GL, Agüero, RM and Rodríguez Garay, EA (1994). Hepatic transport of organic anions in taurolithocholate-induced cholestasis in rats. *J. Hepatol.* **20**: 603–610.
220. Gautam, A, Ng, OC, Strazzabosco, M and Boyer, JL (1989). Quantitative assessment of canalicular bile formation in isolated hepatocyte couplets using microscopic optical planimetry. *J. Clin Invest* **83**: 565–573.
221. Matsui, T (1998). Rho-Kinase Phosphorylates COOH-terminal Threonines of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins and Regulates Their Head-to-Tail Association. *J. Cell Biol.* **140**: 647–657.
222. Meimaridou, E, Gooljar, SB, Ramnarace, N, Anthonypillai, L, Clark, AJL and Chapple, JP (2011). The cytosolic chaperone Hsc70 promotes traffic to the cell surface of intracellular retained melanocortin-4 receptor mutants. *Mol. Endocrinol.* **25**: 1650–60.
223. Xu, W, Mimnaugh, EG, Kim, J-S, Trepel, JB and Neckers, LM (2002). Hsp90, not Grp94, regulates the intracellular trafficking and stability of nascent ErbB2. *Cell Stress Chaperones* **7**: 91–6.
224. Kumar, R, Grammatikakis, N and Chinkers, M (2001). Regulation of the atrial natriuretic peptide

- receptor by heat shock protein 90 complexes. *J. Biol. Chem.* **276**: 11371–5.
225. Crocenzi, FA, Zucchetti, AE, Boaglio, AC, Barosso, IR, Sanchez Pozzi, EJ, Mottino, AD, *et al.* (2012). Localization status of hepatocellular transporters in cholestasis. *Front Biosci* **17**: 1201–1218.
226. Berthiaume, F, Moghe, P V, Toner, M and Yarmush, ML (1996). Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* **10**: 1471–84.
227. Martínez-Mármol, R, Comes, N, Styrzewska, K, Pérez-Verdaguer, M, Vicente, R, Pujadas, L, *et al.* (2016). Unconventional EGF-induced ERK1/2-mediated Kv1.3 endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**: 1515–28.
228. Hegedüs, T, Sessler, T, Scott, R, Thelin, W, Bakos, É, Váradi, A, *et al.* (2003). C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 454–461.
229. Vergarajauregui, S, San Miguel, A and Puertollano, R (2006). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase promotes epidermal growth factor receptor internalization. *Traffic* **7**: 686–698.
230. Mace, G, Miaczynska, M, Zerial, M and Nebreda, AR (2005). Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. *EMBO J* **24**: 3235–3246.
231. Huang, CC, You, JL, Wu, MY and Hsu, KS (2004). Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *J Biol Chem* **279**: 12286–12292.
232. Grandal, M V, Grovdal, LM, Henriksen, L, Andersen, MH, Holst, MR, Madshus, IH, *et al.* (2011). Differential Roles of Grb2 and AP-2 in p38 MAPK- and EGF-Induced EGFR Internalization. *Traffic* doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01322.x.
233. Seachrist, JL and Ferguson, SS (2003). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci* **74**: 225–235.
234. McMahon, HT and Boucrot, E (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**: 517–33.
235. Crocenzi, FA, Pellegrino, JM, Catania, VA, Luquita, MG, Roma, MG, Mottino, AD, *et al.* (2006). Galactosamine prevents ethinylestradiol-induced cholestasis. *Drug Metab Dispos.* **34**: 993–997.
236. Epand, RM (2008). Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**: 1576–1582.
237. Gál, Z, Hegedüs, C, Szakács, G, Váradi, A, Sarkadi, B and Özvegy-Laczka, C (2015). Mutations of the central tyrosines of putative cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) sequences modify folding, activity, and sterol-sensing of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**: 477–487.
238. Foster, JD, Adkins, SD, Lever, JR and Vaughan, RA (2008). Phorbol ester induced trafficking-independent regulation and enhanced phosphorylation of the dopamine transporter associated with membrane rafts and cholesterol. *J. Neurochem.* **105**: 1683–1699.
239. Kis, E, Ioja, E, Nagy, T, Szente, L, Herédi-Szabó, K and Krajcsi, P (2009). Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors. *Drug Metab. Dispos.* **37**: 1878–86.
240. Ito, K, Hoekstra, D and van Ijzendoorn, SCD (2008). Cholesterol but not association with detergent resistant membranes is necessary for the transport function of MRP2/ABCC2. *FEBS Lett.* **582**: 4153–7.

241. Honigsmann, A and Pralle, A (2016). Compartmentalization of the Cell Membrane. *J. Mol. Biol.* doi:10.1016/j.jmb.2016.09.022.
242. Gilbert, S, Loranger, A, Lavoie, JN and Marceau, N (2012). Cytoskeleton keratin regulation of FasR signaling through modulation of actin/ezrin interplay at lipid rafts in hepatocytes. *Apoptosis* **17**: 880–894.
243. Itoh, K, Sakakibara, M, Yamasaki, S, Takeuchi, A, Arase, H, Miyazaki, M, *et al.* (2002). Cutting edge: negative regulation of immune synapse formation by anchoring lipid raft to cytoskeleton through Cbp-EBP50-ERM assembly. *J. Immunol.* **168**: 541–4.
244. Nichols, TC, Guthridge, JM, Karp, DR, Molina, H, Fletcher, DR and Holers, VM (1998). Gamma-glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes. *Eur. J. Immunol.* **28**: 4123–9.
245. Paulick, MG and Bertozzi, CR (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* **47**: 6991–7000.
246. Accatino, L, Pizarro, M, Solís, N, Koenig, CS, Vollrath, V and Chianale, J (1998). 'P-glycoproteins are not released into bile. *J. Hepatol.* **28**: 741.
247. Wang, W, Soroka, CJ, Mennone, A, Rahner, C, Harry, K, Pypaert, M, *et al.* (2006). Radixin is required to maintain apical canalicular membrane structure and function in rat hepatocytes. *Gastroenterology* **131**: 878–884.
248. Suda, J, Zhu, L and Karvar, S (2011). Phosphorylation of radixin regulates cell polarity and Mrp-2 distribution in hepatocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **300**: C416–C424.
249. Kandabashi, T, Shimokawa, H, Miyata, K, Kunihiro, I, Eto, Y, Morishige, K, *et al.* (2003). Evidence for protein kinase C-mediated activation of Rho-kinase in a porcine model of coronary artery spasm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 2209–14.
250. Mehta, D, Rahman, A and Malik, AB (2001). Protein kinase C- α signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J. Biol. Chem.* **276**: 22614–20.
251. Miao, L, Dai, Y and Zhang, J (2002). Mechanism of RhoA/Rho kinase activation in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**: H983–9.
252. Li, T, Xiao, X, Zhang, J, Zhu, Y, Hu, Y, Zang, J, *et al.* (2014). Age and sex differences in vascular responsiveness in healthy and trauma patients: contribution of estrogen receptor-mediated Rho kinase and PKC pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **306**: H1105–15.
253. Pratt, WB and Toft, DO (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**: 306–60.
254. Buchner, J (1999). Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 136–41.
255. Pearl, LH and Prodromou, C (2000). Structure and in vivo function of Hsp90. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 46–51.
256. Bolder, U, Jeschke, MG, Landmann, L, Wolf, F, de Sousa, C, Schlitt, H-J, *et al.* (2006). Heat stress enhances recovery of hepatocyte bile acid and organic anion transporters in endotoxemic rats by multiple mechanisms. *Cell Stress Chaperones* **11**: 89–100.
257. Bolder, U, Schmidt, A, Landmann, L, Kidder, V, Tange, S and Jauch, K-W (2002). Heat stress prevents impairment of bile acid transport in endotoxemic rats by a posttranscriptional mechanism. *Gastroenterology* **122**: 963–73.
258. Kubitz, R, Wettstein, M, Warskulat, U and Haussinger, D (1999). Regulation of the multidrug

- resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* **116**: 401–410.
259. Frydman, J and Höhfeld, J (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 87–92.
260. Röhl, A, Toppel, F, Bender, E, Schmid, AB, Richter, K, Madl, T, *et al.* (2015). Hop/Sti1 phosphorylation inhibits its co-chaperone function. *EMBO Rep.* **16**: 240–9.
261. Barker, BL and Benovic, JL (2011). G protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylation of hip regulates internalization of the chemokine receptor CXCR4. *Biochemistry* **50**: 6933–41.
262. Lassle, M, Blatch, GL, Kundra, V, Takatori, T and Zetter, BR (1997). Stress-inducible, Murine Protein mSTI1: characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. *J. Biol. Chem.* **272**: 1876–1884.
263. Zhao, Y, Bjarbaek, C and Moller, DE (1996). Regulation and Interaction of pp90rsk Isoforms with Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **271**: 29773–29779.
264. Graves, LM, He, Y, Lambert, J, Hunter, D, Li, X and Earp, HS (1997). An Intracellular Calcium Signal Activates p70 but Not p90 Ribosomal S6 Kinase in Liver Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 1920–1928.
265. Zollner, G and Trauner, M (2008). Mechanisms of Cholestasis. *Clin. Liver Dis.* **12**: 1–26.
266. Zollner, G and Trauner, M (2009). Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br. J. Pharmacol.* **156**: 7–27.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación también es fruto de ideas, proyectos y grandes esfuerzos previos, por eso mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Fernando "Tato" Crocenzi por confiar en mí, por guiarme en este mundo de la investigación y brindarme todos sus conocimientos y enseñanzas para mi desarrollo profesional, a mi co-director el Dr. Marcelo Roma por sus aportes constructivos, por brindarme su experiencia y por colaborar siempre con nosotros y al Dr. Enrique "Quiquín" Sánchez Pozzi por sus aportes y su predisposición siempre que necesité su ayuda.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnología, al CONICET y a la U.N.R por haberme otorgado las becas para desarrollar este trabajo de Tesis.

A aquellos que hacen placentero el día de trabajo, aquellos que me hacen hacer los únicos abdominales que hago últimamente por hacerme reír, aquellos con los que compartimos más que mates y afterlabs. Aquellos que me abrieron las puertas en los primeros años y los que se fueron sumando con el tiempo, por los hermosos amigos que hice. A todo IFISE, desde el más antiguo hasta el más nuevo, y también a todos los que alguna vez formaron parte de estos 5 años ayudándome día a día a progresar en lo laboral y en lo personal. GRACIAS! Los quiero a todos!

A mis compañeros de Grupo, a los primeros Andre, Fla y Chispi, a las de ahora Romi, Nanu, Vale y Pau, y a los de siempre, Ceci e Ismael, por ayudarme a diario y estar siempre dispuestos a colaborar y enseñarme. En especial a Ismael, que permanentemente responde a mis preguntas de "cómo se hace?...ó...dónde está tal cosa?" y siempre está ahí para darme una mano y aguantar mis cantos permanentes, en especial los de Bachata.

Como la risa es salud, gracias a Agus y a Dani porque seguro tengo muchos años más de vida por uds! Porque a diario están ahí para ayudarme a resolver casi todo.

A mis amigas, a las que adoro, y hace años que me acompañan en cada paso dado, siempre presentes.

A Nacho, una hermosa persona, porque soy muy afortunada de haberme cruzado en su camino, para que hoy estemos caminando juntos.

A mi familia por el amor más incondicional, por su sacrificio y esfuerzo, por estar siempre a mi lado y ayudarme a crecer como persona y profesional, por su interés y apoyo en cada cosa que hago. En especial al amor de mis padres y mi hermana, y a esa luz hermosa de mis abuelos, son el mayor impulso para seguir, una vez más este logro también es de ustedes, simplemente por estar siempre, los amo!