



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

**"ROL DE LA AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL
EN LA REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS
HEPÁTICA DEL COLESTEROL"**

Lic. Mauro Danielli

Rosario, Argentina.

2019

Rol de la aquaporina-8 mitocondrial en la regulación de la biosíntesis hepática del colesterol

Mauro Danielli

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Fisiología Experimental (IFISE – CONICET), Area Fisiología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1° de diciembre de 2013 y el 31 de marzo de 2019, bajo la dirección del Dr. Raúl A. Marinelli.

Dr. Raúl A. Marinelli, Director

Dra. Anabel Brandoni, Jurado de Tesis

Dra. Alicia E. Damiano, Jurado de Tesis

Dr. Mauricio G. Martín, Jurado de Tesis

Defendida:

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

Publicaciones:

"Mitochondrial aquaporin-8 is involved in SREBP-Controlled hepatocyte cholesterol biosynthesis."

Danielli M, Marrone J, Capiglioni AN, Marinelli RA.
Free Radic. Biol. Med. 131: 370-375, 2019.

"Cholesterol Can Modulate Mitochondrial Aquaporin-8 in Human Hepatic Cells."

Danielli M, Capiglioni AN, Marrone J, Calamita G, Marinelli RA.
IUBMB Life 69: 341-346, 2017.

"Lipid-based transfection reagents can interfere with cholesterol biosynthesis"

Danielli M, Marinelli RA.
Anal. Biochem. 495: 1-2, 2016.

Presentaciones a Congresos:

"Hepatocyte mitochondrial aquaporin-8 can modulate cholesterol biosynthesis."

Danielli M, Capiglioni AM, Marrone J, Marinelli RA.
II Reunión Conjunta de Sociedades de BioCiencias. Buenos Aires. 2017.

"El colesterol regula la expresión de la aquaporina-8 mitocondrial en células hepáticas humanas Huh-7."

Danielli M, Capiglioni AM, Marrone J, Marinelli RA.
Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. La Plata. 2016.

"El knockdown de la expresión de aquaporina-8 mitocondrial (mtAQP8) deprime la biosíntesis de colesterol en células hepáticas humanas Huh-7."

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

"La expresión proteica de la aquaporina-8 mitocondrial (mAQP8) hepática puede ser modulada por colesterol."

Danielli M, Marrone J, Soria LR, Carnovale CE, Marinelli RA.
Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Buenos Aires. 2014.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	ABREVIATURAS	VI
<hr/>		
	RESUMEN	IX
<hr/>		
1.	<i>Introducción</i>	1
<hr/>		
1.1.	Aquaporinas	1
1.1.1.	AQPs canales de H ₂ O ₂ : Peroxiporinas	4
1.1.2.	AQPs del hepatocito	5
1.2.	AQP8	9
1.2.1.	AQP8 canalicular	10
1.2.2.	AQP8 mitocondrial	12
1.3.	Mitocondria	13
1.3.1.	Estructura y composición	14
1.3.2.	Cadena respiratoria mitocondrial	15
1.4.	Especies reactivas del oxígeno	15
1.4.1.	Especies reactivas del oxígeno de origen mitocondrial	16
1.4.2.	H ₂ O ₂ mitocondrial y señalización MAPK dependiente	18
1.5.	Colesterogénesis Hepática: Mecanismos de Regulación	19
1.5.1.	Regulación de la Colesterogénesis Hepática por H ₂ O ₂	21
<hr/>		
2.	<i>Objetivos</i>	23
<hr/>		
3.	<i>Materiales y Métodos</i>	24
<hr/>		
3.1.	Cultivo de la línea celular Huh-7	24
3.2.	Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos de rata	24
3.3.	Alteración del contenido celular de colesterol	25

3.3.1.	Preparación del complejo β CD:colesterol y sobrecarga celular de colesterol	26
3.3.2.	Depleción del colesterol celular	27
3.4.	Determinación del colesterol celular total	27
3.5.	Viabilidad celular	28
3.6.	Inmunofluorescencia confocal para AQP8	28
3.7.	Fraccionamiento subcelular	29
3.8.	Medición de la concentración de proteínas	30
3.9.	Inmunoblotting	30
3.10.	RT-qPCR: Retro-transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	31
3.11.	Síntesis de ARN de interferencia	32
3.12.	Reducción de la expresión de AQP8 mitocondrial por siRNA	33
3.13.	Transfección adenoviral	33
3.14.	Cuantificación de la biosíntesis de colesterol	34
3.15.	Liberación de H_2O_2 de mitocondrias aisladas	35
3.16.	Tratamiento con MitoTempo	36
3.17.	Análisis estadístico	37
4.	Resultados	38
4.1.	Efecto de la alteración del contenido celular de colesterol en la expresión de mtAQP8	38
4.1.1.	Expresión de mtAQP8 en hepatocitos con sobrecargada de colesterol	38
4.1.2.	Expresión de mtAQP8 en hepatocitos depletados de colesterol	42
4.2.	Efecto de la manipulación de la expresión de mtAQP8 sobre la biosíntesis de colesterol	45
4.2.1.	Efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la biosíntesis del colesterol en hepatocitos	45
4.2.2.	Efecto de la sobre-expresión de mtAQP8 sobre la biosíntesis del colesterol en hepatocitos	50
4.3.	Rol del peróxido de hidrógeno mitocondrial en la regulación de la biosíntesis de colesterol	52
4.3.1.	Efecto de la manipulación de la expresión de mtAQP8 sobre la liberación de peróxido de hidrógeno mitocondrial	52
4.3.2.	Efecto del Mitotempo sobre la liberación del mtH_2O_2	54
4.3.3.	Efecto del Mitotempo sobre la biosíntesis de colesterol	5

5.	<i>Discusión y Conclusiones</i>	57
5.1.	El colesterol regula la expresión de la mtAQP8 en hepatocitos	57
5.2.	Rol de la mtAQP8 en la regulación de la biosíntesis de colesterol	59
6.	<i>Referencias Bibliográficas</i>	64
	ÍNDICE DE FIGURAS	75
	ÍNDICE DE TABLAS	78
	AGRADECIMIENTOS	79

ABREVIATURAS

(por orden alfabético)

·OH	radical hidroxilo
AdhAQP8	vector adenoviral que codifica para hAQP8
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	adenosína difosfato
AMP	adenosína monofosfato
AMPC	adenosína monofosfato cíclico
AQP	aquaporina
AQP8	aquaporina-8
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosína trifosfato
CO ₂	dióxido de carbono
CRM	cadena de respiración mitocondrial
CuZnSOD	cobre-zinc-superóxido-dismutasa
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
EGFP	proteína verde fluorescente mejorada
ERK	extracellular signal-regulated kinase
h	horas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
hAQP8	aquaporina-8 humana

HMGCR	hidroxi-metil-glutaril-CoA reductasa
HRP	peroxidasa de rabanito
JNK	c-Jun N-terminal protein kinases
kDa	kilodaltons
LDH	lactato dehidrogenasa
m β CD	metil-beta-ciclodextrina
MAPK	mitogen activated protein kinase
min	minutos
MMI	membrana mitocondrial interna
MnSOD	manganeso-superóxido-dismutasa
mtAQP8	aquaporina-8 mitocondrial
mtH ₂ O ₂	H ₂ O ₂ mitocondrial
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
O ²	oxígeno molecular
O ^{2•-}	anión superóxido
PBS	buffer fosfato salin
PI3K	fosfoinositol 3-quinasas
PMSF	fenil metano sulfonil fluoruro
PVDF	polivinil difluoruro
ROS	reactive oxygen species
s	segundos
SCAP	cleavage-activating protein
SCR	siRNA control
SDS	dodecil sulfato de sodio
siRNA	short interfering RNA
SOD	superóxido-dismutasa
SRE	elemento de respuesta a esteroides

SREBP	proteína de unión a SRE
T3	triyodotironina
Tris	N-tri(hidroximetil) aminometano
Tween	monooleato de polioxietileno sorbitan
U.A.	unidades arbitrarias
U.I.	unidades internacionales de actividad enzimática
VDAC	canal aniónico dependiente de voltaje

RESUMEN

La aquaporina-8 (AQP8) es un canal transmembrana multifuncional que facilita el pasaje del peróxido de hidrógeno y amoníaco, además de agua. AQP8, como una proteína de 28 kDa no glicosilada, se expresa en la membrana interna mitocondrial de los hepatocitos y algunas otras células. La AQP8 mitocondrial (mtAQP8) del hepatocito puede funcionar como una peroxiporina facilitando la liberación mitocondrial de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

En hepatocitos, el colesterol puede activar o reprimir genes implicados en su vía biosintética a través de la unión a elementos regulados por esteroides (SRE) de factores nucleares SREBPs. Los SREBPs interactúan con las regiones promotoras SRE de genes que codifican las enzimas colesterogénicas, por ejemplo, la enzima clave 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGCR). AQP8 ha sido identificado, por análisis de microarrays, como un gen putativo de respuesta a colesterol siendo posiblemente blanco de los factores nucleares SREBP en hígado de ratón. Además, el análisis del promotor del gen de AQP8 indica que también posee elementos de respuesta a los factores nucleares SREBP.

Por otra parte, se ha reportado que el H_2O_2 estimula la síntesis de colesterol mediada por SREBPs en las células hepáticas, así nuestra hipótesis es que mtAQP8, a través de su rol facilitador de la liberación del H_2O_2 mitocondrial (mt H_2O_2), juega un papel en la regulación de la biosíntesis de colesterol del hepatocito mediada por SREBP.

Inicialmente estudiamos el efecto de alteraciones en el contenido de colesterol sobre la expresión de mtAQP8 en células humanas derivadas de hepatocitos. Células Huh-7 fueron cargadas con colesterol utilizando el complejo metil- β -ciclodextrina (m β CD):colesterol, y depletadas de colesterol con m β CD en ausencia de lipoproteínas. El incremento del colesterol celular inhibió la activación proteolítica

del SREBP-2, y como consecuencia de ello, se redujo significativamente la expresión, a nivel ARNm y proteína, de la enzima HMGCR. En estas condiciones, la expresión de mtAQP8, tanto del ARNm como de la proteína, disminuyó significativamente. La disminución a nivel proteico en la expresión de mtAQP8 fue también observada mediante microscopía confocal. Por el contrario, una reducción en el colesterol celular activó la proteólisis del SREBP-2, y aumentó la expresión (ARNm y proteína) de la HMGCR. La expresión de mtAQP8 incrementó significativamente a nivel ARNm y proteína lo cual también fue observado mediante microscopía confocal.

En conclusión, nuestros datos sugieren que el colesterol regula transcripcionalmente la expresión hepática de la mtAQP8 a través de SREBPs.

En otra etapa de este trabajo estudiamos si un aumento o disminución en la expresión de mtAQP8 podría modular la colesterogénesis en el hepatocito. Primeramente establecimos un knockdown de AQP8 en hepatocitos de rata en cultivo y en células Huh-7. Las células hepáticas con knockdown de mtAQP8 mostraron una disminución significativa de la biosíntesis *de novo* del colesterol. En concordancia, la expresión tanto de SREBP-2 como de su gen diana HMGCR, se vieron disminuidos de manera significativa.

Cuando la expresión de mtAQP8 fue aumentada luego de exponer los cultivos de hepatocitos de rata a un adenovector codificante para la AQP8 humana (hAQP8), la biosíntesis de colesterol aumentó de manera significativa. En estas condiciones, SREBP-2 y HMGCR también aumentaron su expresión.

Además, realizamos ensayos *in vitro* para cuantificar la liberación de mtH₂O₂ la cual se observó significativamente aumentada en mitocondrias provenientes de

hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8 y disminuida en mitocondrias provenientes de hepatocitos con knockdown de mtAQP8.

En base a esto, decidimos tratar los hepatocitos con Mitotempo, un antioxidante específico de mitocondria. Bajo estas condiciones se previno el aumento en la liberación de mtH₂O₂ así como el aumento en la síntesis de colesterol observado en la sobre-expresión de mtAQP8.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que mtAQP8 vía el H₂O₂ derivado de las mitocondrias, participa en la colesterogénesis controlada por SREBP en los hepatocitos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aquaporinas

Las aquaporinas (AQPs) conforman una familia de proteínas canal homólogas que se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos, plantas y organismos inferiores (King y Agre, 1996). Las AQPs funcionan como canales de agua facilitando su movimiento transmembrana acoplado a gradientes osmóticos generados por el transporte de solutos. Algunas AQPs exhiben, adicionalmente, permeabilidad a ciertos solutos pequeños tales como glicerol (Tsukaguchi y col., 1999), urea (Gerbeau y col., 1999), amoníaco (Jahn y col., 2004; Loque y col., 2005; Saparov y col., 2007) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Bienert y col., 2007).

Las AQPs de mamíferos se expresan en las membranas plasmáticas e intracelulares de diversas células y órganos (Fig. 1.1) (Preston y col., 1992; Carbrey y Agre, 2009) y han sido involucradas en numerosos procesos biológicos, así como en la patogénesis molecular de algunas enfermedades cumpliendo en ciertos casos un rol importante en su tratamiento o prognosis (Calamita, Delporte, y Marinelli, 2016; Dajani, Saripalli, y Sharma-Walia, 2018; Soyfoo y col., 2018; Szpilbarg y col., 2018).

La primer AQP fue identificada en el año 1992 por el Dr. Peter Agre (Preston y col., 1992), quien fue galardonado con el Premio Nobel en Química 2003. Este descubrimiento disparó un gran número de trabajos de investigación que fueron aumentando progresivamente el conocimiento de las bases moleculares del transporte de agua a través de las membranas biológicas.

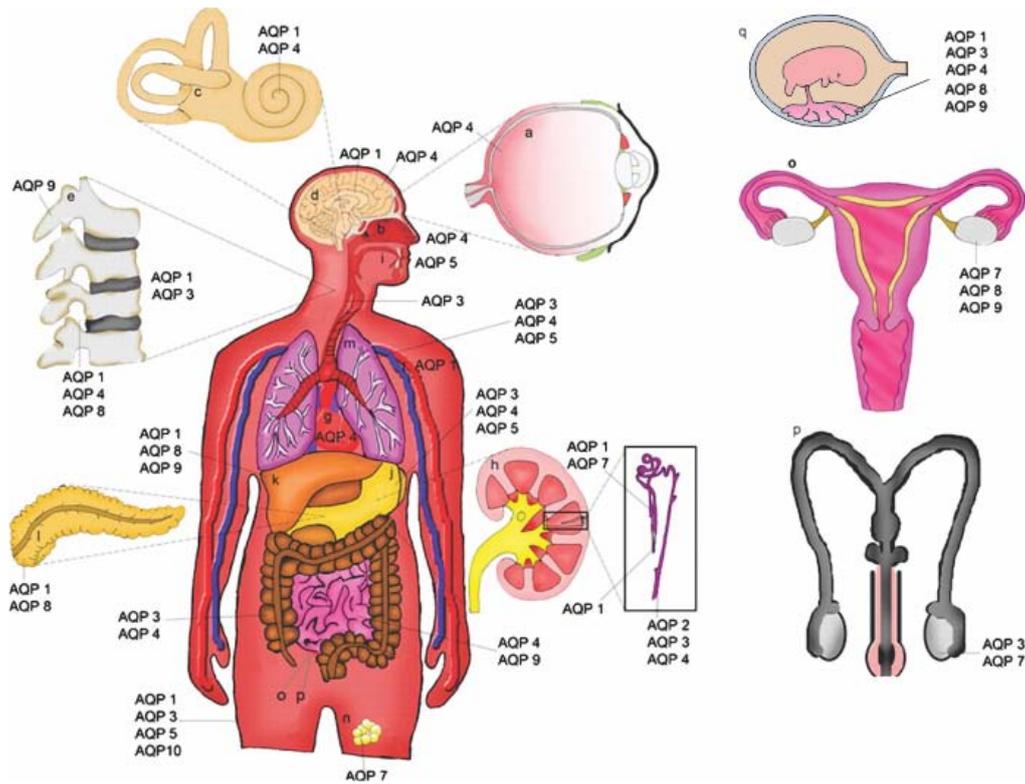


Figura 1.1. Expresión de aquaporinas (AQPs) en humanos. Se muestra la amplia distribución de las principales AQPs involucradas en el transporte de agua y pequeños solutos en el cuerpo humano: a) retina: AQP4; b) epitelio olfatorio: AQP4; c) oído interno: AQP1 y 4; d) cerebro: AQP4 en astrocitos, AQP1 en plexo coroideo; e) médula espinal: AQP1, 4 y 8; células del disco intervertebral: AQP1 y 3; osteoclastos: AQP9; f) Venas: AQP1 en células endoteliales; g) corazón: AQP4; h) riñón: AQP1, 2, 3, 4, 7 y 8; i) glándulas salivales: AQP5; j) tracto gastrointestinal: AQP3, 4, 5 y 9; k) hígado: AQP1, 8, 9 y 11; l) páncreas: AQP1 y 8; m) pulmones: AQP3, 4 y 5; n) adipocitos: AQP7; ñ) piel: AQP1, 3, 5 y 10; o) aparato reproductor femenino: AQP7, 8 y 9 en ovarios; p) aparato reproductor masculino: AQP3 y 7 en células espermáticas; (Day y col., 2014) q) Placenta, AQP1 en células vasculares, AQP3, 4, 8, 9 en células epiteliales trofoblásticas y AQP11 en células epiteliales de la membrana amniótica (Martínez y Damiano, 2017).

Las AQPs se organizan en seis segmentos de estructura α -hélice que atraviesan la membrana, unidos por cinco lazos conectores, con los extremos amino- y carboxi-terminales localizados en la cara citoplasmática de la membrana (Fig. 1.2 A). De modo de conformar una estructura con mayor estabilidad en el entorno lipídico, las AQPs *in*

vivo forman homotetrámeros en las membranas celulares, donde cada monómero (26–34 kDa) actúa como un canal de agua independiente (Sui y col., 2001) (fig. 1.2. B). Dos de los lazos (uno extracelular y otro intracelular) se pliegan hacia la membrana, poniendo en contacto los tripletes asparagina–prolina–alanina (NPA). Así se forma el sitio más estrecho del poro, constituyendo uno de los sitios de constricción del canal. Un segundo filtro de selectividad, la región de constricción llamada ar/R (aromatic/arginine), se encuentra formado por cuatro aminoácidos y funciona como una barrera de exclusión por tamaño, siendo necesaria para el transporte eficiente del sustrato (Beitz y col., 2006). La estructura resultante encierra una zona central estrecha que se ensancha abriéndose hacia ambos lados de la membrana, confiriéndole un plegamiento en forma de reloj de arena (Fu y Lu, 2007; Gonen y Walz, 2006) (Fig. 1.2. C).

Hasta el día de la fecha se han identificado al menos 13 isoformas de AQPs en tejidos de mamíferos (AQP0-AQP12) y se sospecha la existencia de miembros adicionales de esta familia (King y Agre, 1996; King, Kozono y Agre, 2004; Gorelick y col., 2006). Entre ellas, las AQPs poseen diferencias en sus secuencias peptídicas, lo que resulta en variaciones en el tamaño de su poro. Esto afecta directamente al tipo de moléculas que pueden pasar a través de él.

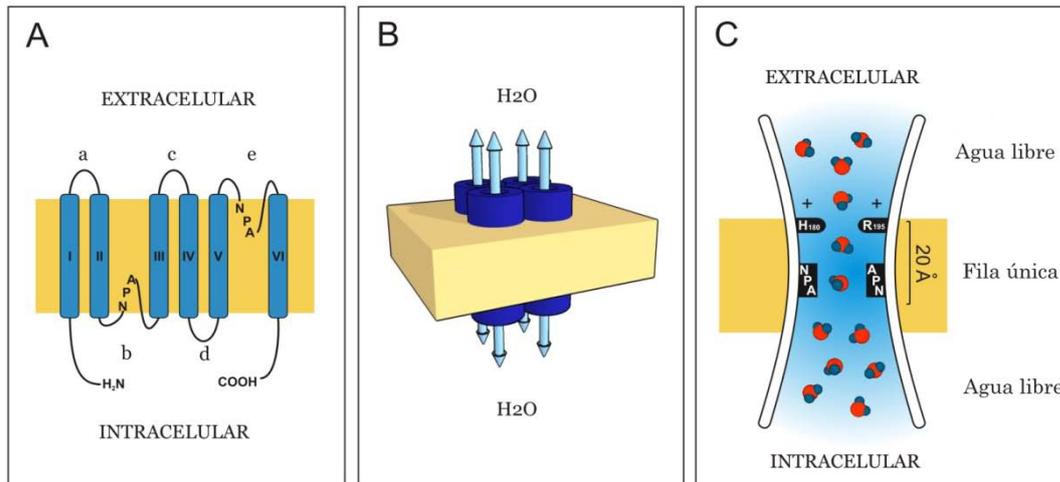


Figura 1.2. Topología, organización y funcionamiento de las aquaporinas (AQPs). **A**, Cada monómero de AQP está conformado por seis dominios transmembrana (I-VI) conectados por cinco “*loops*” conectores (*a-e*) con dos secuencias conservadas NPA que delimitan el poro de agua, y los extremos amino y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

1.1.1. AQPs canales de H₂O₂: Peroxiporinas

Algunas AQPs pueden facilitar el transporte difusivo del H₂O₂ a través de membranas biológicas. Estas AQPs son denominadas “peroxiporinas” y comprenden un número importante de AQPs vegetales y bacterianas, pero llamativamente sólo cuatro de mamífero, las AQPs 1, 3, 8 y 9 de origen humano (Tabla 1).

Tabla 1.1. Aquaporinas (AQPs) transportadoras de H₂O₂		
Mamífero	AQP8 (<i>Homo Sapiens</i>) AQP3 (<i>Homo Sapiens</i>) AQP1 (<i>Homo Sapiens</i>) AQP9 (<i>Homo Sapiens</i>)	(Bienert y col., 2007) (Miller y col., 2010) (Almasalmeh y col., 2014) (Watanabe y col., 2016)
Planta	AtPIP2:1, AtPIP2:2, AtPIP2:4, AtPIP2:5, AtPIP2:7, ZmPIP2:5, AtPIP1:1, AtPIP1:2, TgTIP1:1, TgTIP1:2, AgTIP2:3, AtNIP:1:2, NtXIP1:1 α , NtXIP1:1 β , StXIP1:1 α , StXIP1:1 β , SIXIP1:1 α , SIXIP1:1 β	(Bienert y Chaumont, 2014)
Bacteria	LpGlpFi, LpGlpF3, LpGlpF4	(Bienert y Chaumont, 2014)

1.1.2. AQPs del hepatocito

Trabajos de diversos laboratorios, incluido el nuestro, han demostrado que en hepatocitos de mamífero se expresan: AQP0 (Huebert y col., 2002), AQP8 (Calamita y col., 2001; Elkjær y col., 2001; García y col., 2001; Huebert y col., 2002), AQP9 (Elkjær y col., 2000; Huebert y col., 2002; Nicchia y col., 2001) y AQP11 (Gorelick y col., 2006) tanto a nivel del ARNm como de la proteína. Recientemente, también se ha informado la expresión de AQP7 en hepatocitos (Gregoire y col., 2015). Estas AQPs poseen diferentes localizaciones subcelulares y permeabilidades (ver Tabla 1.2).

En el hepatocito, las AQPs más estudiadas son la AQP9, localizada exclusivamente sobre la membrana plasmática sinusoidal (basolateral) (Elkjaer y col., 2000; Carbrey y

Tabla 1.2. Localización y permeabilidad de las aquaporinas (AQPs) del hepatocito		
Aquaporina	Localización Subcelular	Permeabilidad
AQP0	vesículas intracelulares	Agua
AQP9	membrana plasmática sinusoidal (basolateral)	Agua/glicerol/urea/moléculas pequeñas sin carga
AQP11	retículo endoplasmático?	Agua
AQP7	no determinada	Agua/glicerol
AQP8	vesículas intracelulares – membrana plasmática canalicular – Mitocondria	Agua/NH ₃ /H ₂ O ₂

col., 2003) y la AQP8, localizada en la membrana plasmática canalicular (apical), en vesículas intracelulares (Calamita y col., 2005 a; Huebert y col., 2002) y en la membrana mitocondrial interna (Calamita y col., 2005 b; Ferri y col., 2003). La AQP0 tiene la particularidad de poseer baja permeabilidad al agua (Mulders y col., 1995) y se expresa en hepatocitos de rata, (Huebert y col., 2002) y en la línea celular híbrida derivada de hepatoma de rata/fibroblasto humano WIF-B (Gradilone y col., 2005), donde se localiza principalmente en compartimientos intracelulares. Sin embargo, la AQP0 no se expresa en hepatocitos humanos, de acuerdo a resultados obtenidos en la línea celular derivada de hepatocarcinoma humano HepG2 y en muestras de hígado humano (Larocca y col., 2009). Esta AQP no responde al estímulo por AMPc, lo que sugiere que no exhibe tráfico vesicular regulable (Huebert y col., 2002). Su rol en hepatocitos de rata no fue aún dilucidado (Gregoire y col., 2015).

La AQP9 es un canal proteico de aproximadamente 32 kDa que permite el pasaje de agua y una amplia variedad de solutos neutros tales como urea, glicerol, purinas pirimidinas y H₂O₂ (Tsukaguchi y col., 1998; Tsukaguchi y col., 1999; Watanabe y col.,

2016). Ha sido identificada en hepatocitos de rata, ratón, cerdo y humano (Caperna y col., 2007; Carbrey y col., 2003; Elkjær y col., 2000; Padma y col., 2009; Talbot y col., 2003) y se cree que permite la rápida entrada o liberación de metabolitos con mínima perturbación osmótica. Estudios de inmunolocalización realizados en roedores han revelado que la AQP9 se restringe exclusivamente al dominio de membrana sinusoidal del hepatocito (Elkjær y col., 2000), con un patrón de expresión mayoritario alrededor de la zona perivenosa (Carbrey y col., 2003). Su localización en ratas no se ve afectada ante aumentos de AMPc intracelular (Huebert y col., 2002). A nivel transcripcional, se ha reportado en roedores que su expresión es regulada negativamente por los niveles circulantes de insulina (Carbrey y col., 2003; Kuriyama y col., 2002). Estas observaciones contrastan con las observadas en una línea celular hepática humana, donde su expresión es regulada positivamente por insulina y negativamente por leptina (Rodríguez y col., 2011). La expresión de AQP9 es también regulada positivamente por triyodotironina (T3) y por glucagon en cerdos (Caperna y col., 2007). Se ha demostrado la participación de AQP9 en el metabolismo del glicerol en ratones knockout (Rojek y col., 2007) los cuales muestran niveles plasmáticos de glicerol y triglicéridos aumentados, y una permeabilidad a glicerol en hepatocitos disminuida que no aumenta durante el ayuno con respecto al wild-type (Calamita y col., 2012). La expresión de AQP9 está regulada en respuesta a distintas condiciones metabólicas, así el ayuno, se ha demostrado incrementa los niveles de ARNm de AQP9 de rata y ratón (Kuriyama y col., 2002; Carbrey y col., 2003). Durante el ayuno, el glicerol liberado del tejido adiposo es captado por los hepatocitos a través de la AQP9 y utilizado para la gluconeogénesis (Maeda, 2009 y 2012). Además del transporte de agua, glicerol y pequeños solutos, la AQP9 también puede transportar arsenito y por lo tanto, inducir hepatotoxicidad (Liu y

col., 2002; Shinkai y col., 2009). Esto último explicaría la acción carcinogénica y tóxica del arsenito en el hígado humano.

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

La AQP11 fue identificada en hígado hace 13 años (Gorelick y col., 2006), pero su localización celular y subcelular aún no ha sido claramente caracterizada. En estudios funcionales en ovocitos de *Xenopus* no se pudo verificar que AQP11 fuese permeable a agua, glicerol, urea o iones (Gorelick y col., 2006), pero al reconstituir esta AQP en liposomas se encontró una alta permeabilidad al agua (Yakata y col., 2007). En ratones knock-out para AQP11 se observó vacuolización de los hepatocitos (Morishita y col., 2005). AQP11 podría estar involucrada en la homeostasis del retículo endoplasmático rugoso y en la regeneración hepática (Ishibashi y col., 2014; Rojek y col., 2013).

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

En este trabajo de Tesis nos focalizaremos particularmente en la AQP8.

1.2. AQP8

Se ha identificado a la AQP8 en hepatocitos de rata, ratón y humanos (Calamita y col., 2001; Elkjær y col., 2001; Huebert y col., 2002; Larocca y col., 2009). En comparación con otras AQPs humanas, la AQP8 pertenece a una subfamilia diferente, distante de las AQPs que transportan específicamente agua (AQP0, 1, 2, 4, 5 y 6), que transportan agua y glicerol (las aquagliceroporinas AQP3, 7, 9 y 10) y la subfamilia de AQP11-12 (Agemark y col., 2012). Su organización génica y diferenciación evolutiva son únicas (Calamita y col., 1999; Zardoya y Villalba, 2001), lo que sugiere que la AQP8 evolucionó de manera independiente para poseer una especialización diferente al resto de las AQPs de mamífero (Ferri y col., 2003), ya que existen diferencias en su región de constricción ar/R que, además del agua, permite el pasaje de otros solutos como amoníaco (Jahn y col., 2004) y H₂O₂ (Bienert y col., 2007), pero no urea ni glicerol (Koyama y col., 1998). Utilizando cDNA de AQP8 de rata, (Koyama y col., 1998) clonaron ADN genómico de AQP8 humano y pudieron predecir una secuencia de 261 aminoácidos para la proteína AQP8, conteniendo 6 dominios transmembrana, 2 motivos NPA altamente conservados y 3 sitios de glicosilación. La secuencia aminoacídica de la AQP8 humana tiene alta identidad con la de ratón (76,0 %) y rata (74,9 %) y en menor medida con la AQP3 humana (28,9 %). Además, la AQP8 humana es 40,4 % idéntica a la AQP vegetal gamma-TIP.

Se expresa diferencialmente en hepatocitos de las regiones periportal y central del lobulillo hepático (Calamita y col., 2005 b). Intracelularmente, la AQP8 posee una localización variada, probablemente debido a su participación en diferentes mecanismos

fisiológicos en el hepatocito. Estudios bioquímicos, sumados a inmunofluorescencia confocal e inmunoelectromicroscopía revelaron que en condiciones basales (no estimuladas) el 75 % de la AQP8 reside en estructuras intracelulares: vesículas de transporte (Calamita y col., 2001), retículo endoplásmico liso (Ferri y col., 2003) y en la membrana interna de algunas mitocondrias (Calamita y col., 2005 b). El resto se encuentra localizado en la membrana plasmática (Huebert y col., 2002), específicamente en el dominio canalicular.

1.2.1. AQP8 canalicular

Esta es la forma de proteína N-glicosilada de aproximadamente 34 kDa que se encuentra localizada en vesículas de transporte y en la membrana canalicular. Se encuentra involucrada en la formación y regulación de la secreción biliar (Calamita y col., 2001; Huebert y col., 2002). Se ha demostrado que disminuciones en los niveles de AQP8 en hepatocitos llevan a deficiencias en el transporte de agua canalicular para la formación de la bilis (Bernardino y col., 2016; Larocca y col., 2009). En hepatocitos, la AQP8 presenta un tráfico vesicular regulado, permitiéndole a estas células modular hormonalmente su permeabilidad al agua y promover la secreción osmótica de agua vía AQP8. Se ha comprobado que la hormona glucagon, al inducir un estímulo colerético, estimula la translocación de vesículas que contienen AQP8 al dominio canalicular de la membrana plasmática (Gradilone y col., 2003). Este tráfico requiere la activación de vías de señalización que involucran AMP cíclico-PKA y PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa) así como una red de microtubulos intacta (Gradilone y col., 2003 y 2005). La AQP8 canalicular es insertada exocíticamente en microdominios enriquecidos en esfingolípidos (rafts) (Tietz y col., 2005; Mazzone y col., 2006) y este fenómeno es

acompañado por un aumento en la permeabilidad al agua de esta membrana (García y col., 2001). Así, en coleresis los hepatocitos incrementan la abundancia de AQP8 en la membrana canalicular estimulando el tráfico vesicular y modulando así su permeabilidad osmótica al agua en el corto plazo. Además de esta regulación, la AQP8 canalicular puede ser también modulada a largo plazo al modificar su expresión génica. El glucagon aumenta postranscripcionalmente la expresión proteica de AQP8 en hepatocitos de rata, un proceso que también requiere de las vías de señalización de AMP cíclico-PKA y PI3K y se asocia a una menor degradación de esta proteína (Larocca y col., 2009). En cuadros experimentales de colestasis (falla secretoria biliar), la AQP8 canalicular se encuentra desregulada, lo cual contribuiría a los mecanismos moleculares determinantes de la patología (Marinelli y col., 2011). Así, se ha demostrado que en colestasis extrahepática la translocación de AQP8 hacia la membrana plasmática del hepatocito se encuentra alterada y que existe una disminución en la expresión proteica de la AQP8 hepática por mecanismos de regulación post-transcripcionales (Carreras y col., 2003). De manera similar, la expresión molecular y funcional de la AQP8 canalicular se encontró reducida en modelos de colestasis hepatocelular asociada a sepsis (Larocca y col., 2009) o inducida por la administración de estrógenos (Carreras y col., 2007). En estos dos modelos de colestasis se ha probado que la administración retrobiliar de un vector adenoviral, que codifica para la aquaporina-1 humana (hAQP1), induce la expresión de dicha AQP en la membrana canalicular de los hepatocitos y mejora significativamente el cuadro colestásico corrigiendo el flujo biliar canalicular (Marrone y col., 2016 y 2017).

1.2.2. AQP8 mitocondrial (mtAQP8)

Corresponde a la proteína no glicosilada de 28 kDa (Calamita y col., 2005 b; García y col., 2001). Posee una amplia distribución, habiéndose encontrado en mitocondrias de riñón, testículo, corazón, duodeno, yeyuno y colon de rata (Calamita y col., 2005 b). Se ha determinado que en hepatocitos murinos (Calamita y col., 2005 b; Ferri y col., 2003), y en líneas celulares humanas derivadas de hepatocitos (Marchissio 2012 y 2014), se localiza específicamente en la membrana mitocondrial interna. Existe una correlación directa entre el tamaño mitocondrial y la magnitud de expresión de AQP8 en esta organela. Se ha especulado que esto puede deberse a que en las mitocondrias de menor tamaño, la contribución de AQP8 al pasaje mitocondrial de agua no es tan relevante, ya que para las mismas es suficiente con la difusión simple de agua a través de sus membranas. Sin embargo, la AQP8 no parece contribuir de manera significativa al pasaje mitocondrial de agua (Calamita y col., 2006; Gena y col., 2009; Yang y col., 2006), por lo que su función específica es materia de estudio. En base al hecho de que AQP8 es capaz de facilitar la difusión transmembrana del amoníaco (Saparov y col., 2007) y que como se mencionó anteriormente (ver Tabla 1), estudios en levaduras (Bienert y col., 2007) y en células de mamífero (Miller y col., 2010) demostraron que la AQP8 humana facilita la difusión transmembrana del H₂O₂; se ha propuesto que la AQP8 mitocondrial hepática estaría involucrada en la detoxificación del amoníaco vía ureagénesis (Soria y col., 2010; 2013 y 2014) y también en la liberación del H₂O₂ mitocondrial (Marchissio y col., 2012 y 2014). Para este último caso se postula que mtAQP8 podría tener un rol en la liberación de H₂O₂ desde la matriz mitocondrial para su detoxificación en otros sitios en situaciones donde la cadena de transporte de electrones se encuentra altamente reducida dando lugar a la formación de metabolitos del O₂ parcialmente reducidos y altamente reactivos llamados especies reactivas del

oxígeno (ROS, del inglés, reactive oxygen species) debido a sus altas reactividades comparadas con el oxígeno molecular. De permanecer en la matriz, su captación por sistemas antioxidantes de la organela consumiría equivalentes reductores en forma de NADPH, reduciendo así la eficiencia de la respiración. También, la permanencia del H₂O₂ en la mitocondria podría generar estrés oxidativo y dar lugar a disfunción mitocondrial, llevando en última instancia a la muerte celular (Marchissio y col., 2012; Marchissio y col., 2014).

La expresión proteica de AQP8 en mitocondrias también sufre regulación hormonal. Así, la hormona tiroidea T3, que modula la actividad metabólica de las mitocondrias hepáticas, induce la disminución por regulación transcripcional de AQP8 en mitocondrias de hígado de rata (Calamita y col., 2007). Por otro lado, también se ha reportado aumentada la expresión de la mtAQP8 en hepatocitos de rata *in vivo* e *in vitro* tratados con glucagon (Soria y col., 2013).

1.3. Mitocondria

Las mitocondrias son organelas citoplasmáticas especializadas en la transformación de la energía de oxidación en energía quimioosmótica, lo que se traduce en la síntesis de ATP a partir de ADP. Además de proporcionar la energía necesaria para que las células lleven a cabo sus múltiples funciones, en estos últimos años se han puesto de relieve otros papeles tales como la regulación de la muerte celular, al actuar como depósito de diferentes proteínas apoptogénicas (Wang y Youle, 2009) y la señalización redox actuando como una fuente de H₂O₂, reconocido en los últimos años como molécula señal (Sies y col., 2017).

1.3.1. Estructura y composición

La estructura básica de la mitocondria consiste en dos membranas altamente especializadas, una interna y otra externa, que delimitan dos compartimentos diferentes; el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. En el espacio intermembrana, además de residir diferentes proteínas pro-apoptóticas, se encuentra la enzima adenilatoquinasa que transforma el AMP en ADP, el cual es rápidamente fosforilado a ATP. Por otra parte, la matriz mitocondrial contiene la maquinaria implicada en la síntesis proteica y es donde tienen lugar las reacciones del ciclo de Krebs. La membrana externa presenta ciertas analogías de composición con la membrana citoplasmática y el retículo endoplasmático. Contiene un 40% de lípidos, principalmente fosfolípidos y un 60% de proteínas. La membrana interna difiere en muchos aspectos de la externa, siendo mucho más rica en proteínas (80%) debido a la presencia de gran cantidad de transportadores específicos y de los complejos enzimáticos constituyentes de la cadena de respiración mitocondrial (CRM).

La membrana mitocondrial interna actúa como una barrera entre los solutos y agua que se mueven entre el citoplasma y la matriz mitocondrial, siendo impermeable y sólo permitiendo la difusión de ciertas moléculas pequeñas y neutras. El resto de transportes pasivos o activos que se realizan a través de esta membrana están controlados por canales o transportadores específicos (Palmieri, 2004). La membrana externa, en cambio, es permeable a la mayoría de solutos de hasta 1,5 kDa debido a la presencia de grandes poros formados por VDAC, el canal de aniones dependiente de voltaje (del inglés, voltage-dependent anion channel), (Colombini, 2004).

1.3.2. Cadena respiratoria mitocondrial

Se ha establecido la organización de la CRM en cinco grandes complejos enzimáticos, localizados en la membrana interna mitocondrial: complejo NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato Q reductasa (complejo II), complejo b-c1 (complejo III), complejo citocromo oxidasa (complejo IV) y la ATPasa (complejo V) que permite el acoplamiento de las oxidaciones de los sustratos de la respiración con la fosforilación del ADP (Rich, 2003).

1.4. Especies reactivas del oxígeno

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la supervivencia de todos los organismos aeróbicos. El metabolismo energético aeróbico depende de la fosforilación oxidativa, proceso a través del cual la energía de oxido-reducción de la cadena transportadora de electrones mitocondrial es convertida en un enlace fosfato de alta energía en el ATP. En condiciones fisiológicas, la reducción del O_2 a agua en la cadena respiratoria es incompleta (96-98%), dando lugar a la formación de ROS mitocondriales (mtROS) (Chance y Williams, 1956; Dröge, 2002). En un principio todas las ROS fueron categorizadas erróneamente como radicales libres. Pero no todas lo son ya que pueden ser moléculas reactivas sin electrones desapareados. Un radical libre se define como cualquier especie atómica o molecular capaz de existir de manera independiente que contiene uno o más de un electrón desapareado en uno de sus orbitales moleculares (Halliwell y Gutteridge, 1990). La oxidación que involucra un solo electrón del O_2 da como resultado la formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) tanto por medio de catálisis enzimática como por distintas reacciones de transferencia electrónica. El $O_2^{\bullet-}$ en

solución acuosa tiene una vida media muy corta; esta inestabilidad se basa en la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 .

A diferencia del $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 no es un radical libre siendo una molécula más estable. El H_2O_2 puede atravesar las membranas biológicas, mientras que el $O_2^{\bullet-}$ no puede hacerlo (Chance y col., 1979), y aunque es un agente oxidante más débil que el $O_2^{\bullet-}$, en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre, puede llevar, por medio de la reacción de Fenton, a la producción del radical hidroxilo ($\bullet OH$) altamente reactivo y tóxico. Debido a que el hígado es el órgano sólido más grande en mamíferos y a que éste recibe del 20% al 25% de la sangre circulante, la cantidad de oxígeno consumido por este órgano es muy alta. La mayoría del oxígeno molecular usado en la mitocondria es convertido en agua, por lo cual, se pueden formar altas cantidades de ROS (Freeman y Crapo, 1982).

1.4.1. Especies reactivas del oxígeno de origen mitocondrial

La mitocondria es la principal fuente de ROS endógenas celulares, particularmente del $O_2^{\bullet-}$, y por lo tanto, podría condicionar el estado redox de toda la célula (Jezek y Hlavatá, 2005).

Asimismo, las mtROS podrían actuar como moléculas señalizadoras involucradas en la regulación de diversos procesos celulares (Fang y col., 2004; Pallottini y col., 2007, Giudetti y col., 2013). Se han investigado exhaustivamente los mecanismos que explican la formación de ROS en la mitocondria. Se ha observado producción de $O_2^{\bullet-}$ en ambos lados de la membrana mitocondrial interna y en la matriz (Fig. 3). La contribución de cada componente de la CRM en la producción total de $O_2^{\bullet-}$ depende de cada órgano y de si la mitocondria está respirando (lo que se denomina estado 3) o si la

cadena respiratoria se encuentra en un importante estado de reducción (estado 4) (Barja, 1999). Aunque el Complejo III, que libera $O_2^{\bullet -}$ a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, es el principal productor en mitocondrias de corazón y pulmón, la fuente más importante en cerebro e hígado es el Complejo I, que parece liberarlo hacia la matriz (Barja, 1999; Miwa y Brand, 2003; Muller y col, 2004). Numerosos estudios realizados en *C. elegans*, *E. coli* y en mamíferos confirman también la producción de $O_2^{\bullet -}$ en el Complejo II en condiciones de hipoxia o cuando este complejo está dañado, así como las consecuencias fisiopatológicas que estas alteraciones conllevan (Guzy y col., 2008; Ishii y col., 1998; Yankovskaya y col., 2003; Zhang y col., 1998).

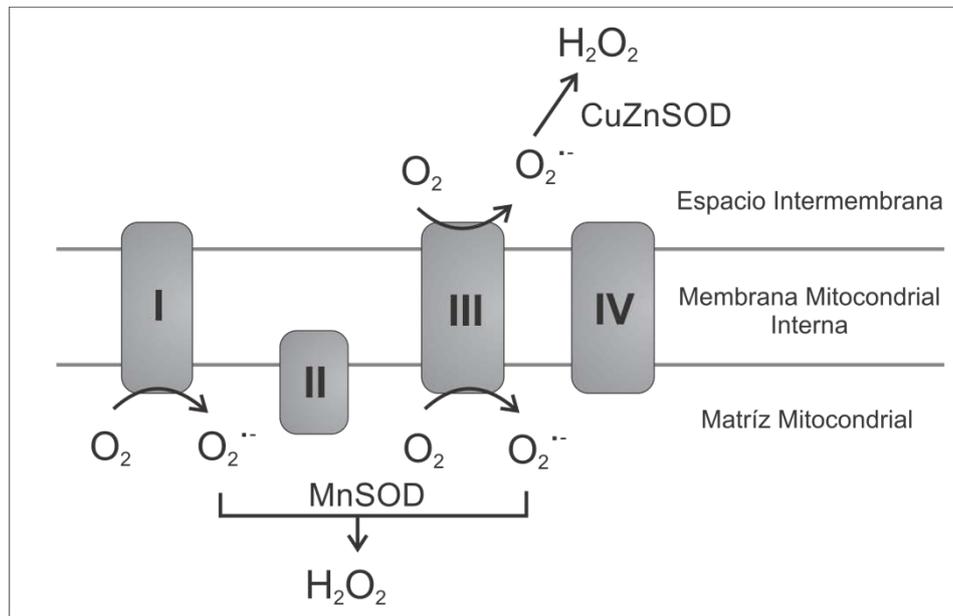


Figura 1.3. Sitios productores de $O_2^{\bullet -}$ y de su dismutación a H_2O_2 en la cadena de respiración mitocondrial. El Complejo III libera $O_2^{\bullet -}$ a ambos lados de la membrana mitocondrial interna (MMI), mientras que el Complejo I, lo libera hacia la matriz. El $O_2^{\bullet -}$ liberado al espacio intermembrana puede ser dismutado a H_2O_2 por la enzima CuZnSOD y el $O_2^{\bullet -}$ liberado hacia la matriz es convertido también a H_2O_2 por la MnSOD.

En la matriz, el $O_2^{\bullet -}$ es eliminado por la enzima MnSOD (manganeso-superóxido-dismutasa). Sin embargo, parte del $O_2^{\bullet -}$ producido en el espacio intermembrana puede

ser transportado al citoplasma a través de canales de aniones dependientes de voltaje (Han y col., 2003); no obstante, la presencia de la enzima CuZnSOD (cobre-zinc-superóxido-dismutasa) y de citocromo c en el espacio intermembrana, capaces de eliminar $O_2^{\bullet-}$ por distintos mecanismos, plantean algunos interrogantes sobre las implicancias fisiológicas de la salida de este radical desde la mitocondria al citoplasma. La abundancia de SOD en sus diversas isoformas en la mitocondria y su presencia tanto en la matriz como en el espacio intermembrana son claros signos de la necesidad de eliminar el $O_2^{\bullet-}$ generado en la mitocondria.

1.4.2. H₂O₂ mitocondrial y señalización MAPK dependiente

La señalización por mtROS ha sido identificada en numerosos estudios metabólicos en diferentes tipos celulares y se considera crucial en el control del estado energético celular (Leloup y col., 2011; Rigoulet y col., 2011). Se considera que el nivel de H₂O₂ mitocondrial generado y liberado determina su acción biológica, así bajos niveles intervienen en señalización metabólica y niveles moderados o altos gatillan procesos inflamatorios y mecanismos de muerte celular (Finkel, 2012). Para que el H₂O₂ pueda comportarse como una molécula señal debe evadir la descomposición por los sistemas antioxidantes e influenciar la actividad de proteínas de señalización. Ciertas características de las proteínas, tal como la presencia de residuos cisteína no protonados las hacen susceptibles a oxidación por H₂O₂. Debido al bajo pH del citosol los residuos cisteína de la mayoría de las proteínas citosólicas se encuentran protonados y por ende no pueden reaccionar/sensar el H₂O₂. Así, una característica esencial de la mayoría de las proteínas sensibles a H₂O₂ es que contienen un residuo cisteína con bajo pKa. Muy diversas proteínas (e.g., quinasas, fosfatasas, enzimas metabólicas, reguladores

transcripcionales, etc.) pueden ser reversiblemente oxidadas a nivel del grupo –SH de sus aminoácidos cisteína (Veal y col., 2007). Se ha demostrado que las MAPK (del inglés Mitogen-activated protein kinase) fosfatasas pueden ser inactivadas por el H₂O₂ liberado por las mitocondrias a través de este mecanismo (Nemoto y col., 2000; Kamata y col., 2005). Las MAPK conforman una familia de serina/treonina quinasas que responden a estímulos tales como estrés oxidativo, shock osmótico y citoquinas inflamatorias. Se conocen distintas cascadas de MAPK, siendo las mejores caracterizadas las JNK (c-Jun N-terminal protein kinases), las ERK (extracellular signal-regulated kinase) y las p38. La magnitud y duración de la activación de las MAPK es dependiente del balance entre quinasas activadoras y fosfatasas inhibitoras y es determinante final de su función biológica (Sies, 2017). Así, la inhibición oxidativa de las MAPK fosfatasas parece explicar la activación H₂O₂ dependiente de las JNK (Nemoto y col., 2000; Hanawa y col., 2008), ERK (Fang y col., 2004) y p38 (Cao y col., 2004; Pallottini y col., 2007).

1.5. Colesterogénesis Hepática: Mecanismos de Regulación

El colesterol es un constituyente de las membranas celulares y la proporción en que este aparece incide directamente en la fluidez de las mismas. A mayor contenido de colesterol, menor fluidez de membrana. Esto es una herramienta del organismo para controlar la correcta homeostasis celular. También sirve como precursor en la síntesis de ácidos biliares, hormonas esteroideas y vitamina D. No obstante, el exceso de colesterol es un factor clave en la formación de lesiones aterogénicas y de cálculos biliares y por consiguiente debe mantenerse un estricto control de sus niveles sanguíneos, en este aspecto, el hígado cumple un papel central (Di Ciaula y Portincasa,

2018). El colesterol se sintetiza en el citosol y el retículo endoplásmico del hepatocito a partir del acetil-CoA derivado de la mitocondria. El acetil-CoA es convertido a colesterol en una ruta biosintética en la que participan al menos 23 enzimas, siendo la etapa limitante la reacción catalizada por la 3-hidroxi 3-metilglutaril CoA reductasa (HMGCR) (Horton y *col.*, 2003). El colesterol *per se* es un importante regulador de su propia síntesis y por ende de sus niveles celulares. Así, por ejemplo, un aumento del colesterol dietario conduce a una regulación negativa de la expresión génica de las enzimas de la biosíntesis del colesterol vía los factores de transcripción SREBP (del inglés, sterol regulatory element-binding protein). En mamíferos existen tres isoformas designadas SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2, las cuales son sintetizadas como precursores transmembrana en el retículo endoplásmico con un dominio N-terminal helix-loop-helix-Zip (HLH-zip) que funciona como factor de transcripción. Cuando el nivel celular del colesterol es bajo y en consecuencia la membrana del retículo endoplásmico se depleta de colesterol, la proteína SCAP (del inglés, Cleavage-Activating Protein) escolta los precursores de SREBPs hacía el aparato de Golgi donde por acción de las proteasas SP1 y SP2 (del inglés, Site 1 Protease y Site 2 Protease) el segmento N-terminal es escindido, migra al núcleo y activa la transcripción de genes blanco. Por el contrario, cuando el nivel celular del colesterol es alto, se eleva el colesterol en la membrana del retículo endoplásmico, lo que conduce a cambios conformacionales de la proteína SCAP que impiden el proceso antes mencionado (Fig. 4) (Brown y *col.*, 2017). En ratones transgénicos con sobre-expresión selectiva de los SREBPs, se encontró que SREBP-2 activa preferentemente genes involucrados en la biosíntesis del colesterol y que SREBP-1c activa preferentemente genes de la biosíntesis de ácidos grasos. Mientras que SREBP-1a es un potente activador de todos los genes regulados por SREBP (Horton y *col.*, 2003). Otro factor de transcripción, el LXR (liver

X receptor), controla fundamentalmente genes de la degradación del colesterol para su transformación en ácidos biliares y de genes involucrados en el movimiento transmembrana de esteroides, metabolismo de lipoproteínas y síntesis de ácidos grasos (Maxwell y col., 2003).

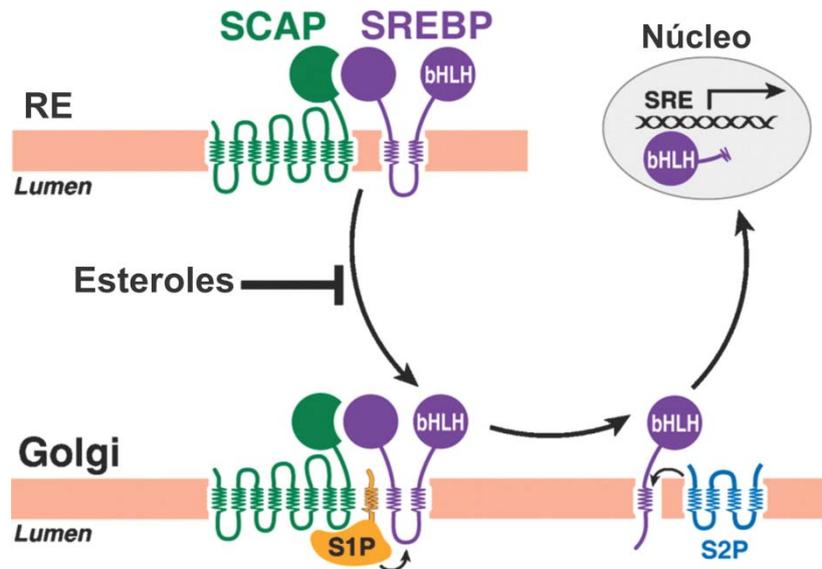


Figura 1.4. Ruta de los SREBPs. Cuando las células se depletan de esteroides, Scap transporta SREBPs desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el aparato de Golgi. La liberación de SREBPs de la membrana se inicia por la proteasa S1P, una proteasa situada en el aparato de Golgi que escinde SREBPs en un loop luminal entre las dos secuencias que atraviesan la membrana. Una vez que se separan las dos mitades de la SREBP, una segunda proteasa del Golgi, S2P, escinde el dominio NH₂-terminal HLH-zip del SREBP en un sitio ubicado dentro de la región transmembrana. Después del segundo clivaje, el dominio NH₂-terminal HLH-zip deja la membrana, llevando tres residuos hidrofóbicos en su extremo COOH. El SREBP escindido es transportado hacia el núcleo donde activa genes que controlan la síntesis y transporte de lípidos.

1.5.1. Regulación de la Colesterogénesis Hepática por H₂O₂

Los SREBP-1a y SREBP-2 no son solo modulados por los niveles intracelulares de colesterol, sino que también pueden ser activados por fosforilación dependiente de las

MAPK pertenecientes a la subfamilia ERK (Kotzka y col., 2000). La acción colesterogénica de la hormona insulina en células hepáticas puede ser en parte explicado por este mecanismo vía activación de las ERK/MAPK (Pomytkin, 2012). En células hepáticas, la insulina incrementa los niveles celulares del H₂O₂ vía activación de NADPH oxidasas (Goldstein y col., 2005) y por generación mitocondrial (Mei y col., 2012). En contraposición, el glucagon, hormona inhibitoria de la síntesis hepática del colesterol, reduce la producción del H₂O₂ en hepatocitos de rata (Siess y col., 1984). Esto sugiere la participación del H₂O₂ en mecanismos regulatorios de la síntesis hepática del colesterol. De hecho, otras evidencias experimentales apoyan esta posibilidad. En células HepG2 se observó que el H₂O₂ participa en una ruta de señalización dependiente de p38/MAPK que induce la activación de la enzima clave de la ruta biosintética del colesterol HMGCR (Pallottini y col., 2007). Otros estudios demostraron que el H₂O₂ induce la activación de factores de transcripción SREBP en las líneas celulares humanas hepáticas HepG2 (Sekiya y col., 2008) y Huh-7 (Seo y col., 2017), en las líneas celulares murinas hepáticas AML12 (Seo y col., 2017) y en adipocitos (Abd-Eldaim y col., 2010). Por lo tanto, diversas evidencias experimentales sugieren la participación del H₂O₂ en los mecanismos regulatorios de la biosíntesis hepática del colesterol.

2. Objetivos

El **Objetivo General** del presente Trabajo de Tesis fue la evaluación de nuestra Hipótesis de Trabajo. Ésta supone que la proteína AQP8 mitocondrial está involucrada en los mecanismos de regulación de la biosíntesis hepática del colesterol y que esta regulación sería a través de cambios en la liberación mitocondrial del H₂O₂, molécula señal para la cual la AQP8 es permeable. Por lo tanto, se establecieron los siguientes

Objetivos Específicos:

- 1) Determinar si alteraciones en el contenido de colesterol en el hepatocito pueden regular la expresión de la mtAQP8.
- 2) Estudiar si una expresión defectiva de la mtAQP8 modula negativamente la biosíntesis del colesterol en el hepatocito.
- 3) Estudiar si una sobre-expresión de la mtAQP8 modula positivamente la biosíntesis del colesterol en el hepatocito.
- 4) Evaluar si la liberación del H₂O₂ mitocondrial vía mtAQP8 modula la biosíntesis de colesterol en el hepatocito.

3. Materiales Y métodos

3.1. Cultivo de la línea celular Huh-7

Para una parte de los estudios realizados en este trabajo de tesis se utilizó la línea celular Huh-7 derivada de hepatocarcinoma humano (ATCC).

La misma fue cultivada en botellas plásticas de cultivo conteniendo medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, formulación de alta glucosa, con L-glutamina 2 mM y sin piruvato) (Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado por calor (Internegocios, Argentina) y 100 U.I. de penicilina / 100 µg de estreptomicina (Invitrogen) a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂. El medio fue cambiado día por medio y las células fueron tripsinizadas utilizando 0,25 % tripsina-EDTA (Invitrogen) al llegar a confluencia.

3.2. Aislamiento y cultivo primario de hepatocitos de rata

Otro modelo experimental utilizado fue el cultivo primario de hepatocitos de rata. Los hepatocitos fueron aislados de hígado de rata como se describió previamente (Soria y col., 2013). Brevemente, el hígado se perfundió con colagenasa Tipo IV (Sigma), seguido por una cuidadosa disrupción mecánica del árbol biliar; luego se filtraron los hepatocitos a través de una membrana de nylon de 40 µm y finalmente se separaron de las células no parenquimatosas y restos celulares por centrifugación a baja velocidad (2 min, 30 g). Al comenzar y finalizar los experimentos la viabilidad celular fue siempre mayor al 85%, evaluada por el test de exclusión de azul tripán.

Después de aislados, 1.1×10^5 hepatocitos/cm² se cultivaron en placas de Petri de 35 mm recubiertas con colágeno tipo I en medio de cultivo DMEM (formulación de alta

glucosa, con L-glutamina 2 mM, y sin piruvato) (Gibco), suplementado con 10% suero fetal bovino (Internegocios) y una mezcla de los antibióticos y antimicóticos penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y anfotericina B (0.1 µg/ml) (Invitrogen). Los hepatocitos se incubaron a 37 °C por 3 h en atmósfera de CO₂ al 5% para lograr su adherencia a las placas de cultivo. Luego, el medio de cultivo fue removido y suplementado con medio fresco cada 24 h de cultivo bajo las condiciones ya mencionadas.

3.3. Alteración del contenido celular de colesterol

La metil-beta-CicloDextrina (mβCD) es un anillo polisacárido cíclico con forma de anillo cónico (Fig. 3.1) que posee una cavidad hidrofóbica capaz de alojar colesterol en una solución acuosa formando un complejo en una relación aproximada de 7:1 moléculas de colesterol por anillo de mβCD (Christian y col., 1999).

Existen diferentes estrategias que permiten el uso de la mβCD tanto para depletar, como para generar sobrecarga de colesterol en las células en cultivo (Christian y col., 1997). Es decir, si se exponen las células a un complejo saturado mβCD:colesterol generado previamente, este va a descargar colesterol hacia el interior de la membrana plasmática generando una sobrecarga en las células. Por otro lado, si se exponen células directamente a la mβCD sin acomplejar, la misma secuestrará colesterol de la membrana plasmática generando una depleción del colesterol celular. En este último caso es importante tener en cuenta la ausencia de colesterol en el medio de cultivo ya que la mβCD puede funcionar como un puente que facilita la transferencia del mismo desde las lipoproteínas presentes en el suero fetal bovino hacia las membranas plasmáticas celulares generando el efecto opuesto al buscado (Christian y col., 1997).

Para ello, en los experimentos de depleción de colesterol se utiliza Suero Deficiente en Lipoproteínas (SDLP).

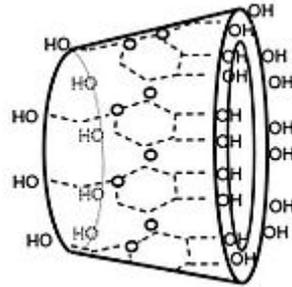


Figura 3.1. Diagrama de la estructura de la mβCD. El anillo polisacárido forma una cavidad hidrofóbica con una alta afinidad por los esteroides.

3.3.1. Preparación del complejo mβCD:colesterol y sobrecarga celular de colesterol

Para preparar el complejo mβCD:colesterol (Han y col., 1999), se disolvió colesterol (Sigma) en una mezcla metanol/cloroformo (1:1) a una concentración de 100 mM. 100 μL de esta solución fueron evaporados en un tubo de vidrio bajo atmósfera de N₂ para luego agregar sobre el colesterol 4 mL de mβCD (Sigma) 10 mM disuelto en buffer salino de fosfato (PBS). La suspensión se sonicó en baño a 4 °C por 5 min y se incubó con agitación a 37 °C durante la noche. La suspensión que contiene los complejos fue ajustada a pH 7,4 y filtrada a través de un filtro de jeringa 0,22 micras inmediatamente antes de utilizarse. La concentración de colesterol en la solución fue 300 mg/mL y se agregó a los cultivos celulares semi-confluentes la cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones de 32, 64 y 128 μM en el medio de cultivo.

3.3.2. Depleción del colesterol celular

Cultivos celulares semi-confluentes de la línea Huh-7 fueron incubados en DMEM suplementado con 10% Suero Deficiente en Lipoproteína (Sigma) durante 4 h para luego ser incubados en un medio similar con el agregado de 2 mM m β CD previamente disuelta en PBS y filtrada a través de un filtro de jeringa 0,22 μ m inmediatamente antes de utilizarse (Woudenberg y col., 2010).

3.4. Determinación del colesterol celular total

La línea celular Huh-7 fue cultivada y tratada en placas de Petri de 35mm. Las células fueron lavadas y escrapeadas en PBS frío. Se extrajeron los lípidos utilizando el método desarrollado por Folch y col., (Williams y col., 2016). Luego de la extracción de la fase orgánica, el disolvente se evaporó bajo corriente de N₂. El colesterol se determinó mediante un método colorimétrico enzimático (Wiener Lab) (Fig. 3.2) y se normalizó al nivel de proteína del lisado celular correspondiente.

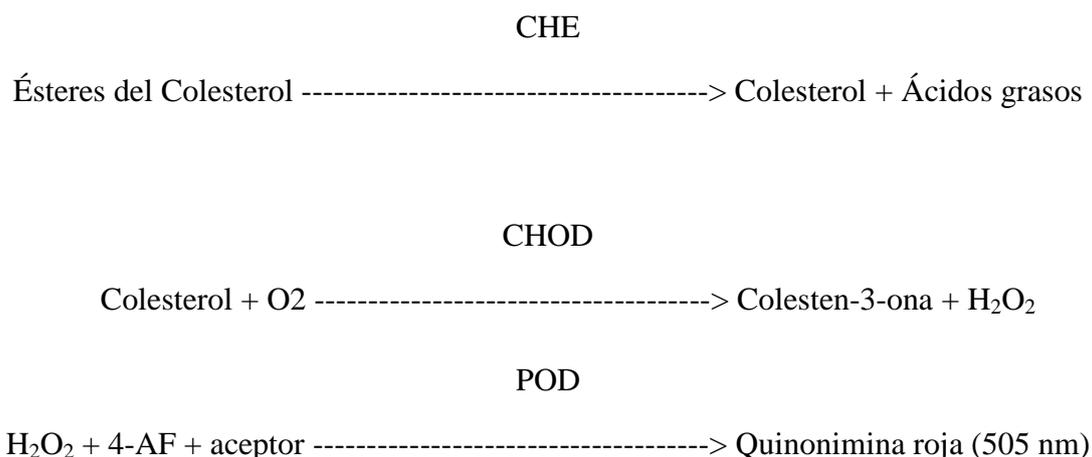


Figura 3.2. Secuencia de reacciones para la determinación del colesterol. CHE, colesterol esterasa; CHOD, colesterol oxidasa; POD, peroxidasa; 4-AF, 4-aminofenazona.

3.5. Viabilidad celular

La actividad lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó como medida de la viabilidad celular. La LDH liberada al medio de cultivo se determinó por espectrofotometría en los correspondientes experimentos utilizando un kit enzimático comercial (Wiener Lab) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Fig. 3.3.).



Figura 3.3. Reacción utilizada para la determinación de la liberación celular de LDH al medio de cultivo. Reacción cinética seguida por espectrofotometría basada en la desaparición de NADH (pico absorción a 340 nm).

3.6. Inmunofluorescencia confocal para AQP8

Células Huh-7 fueron cultivadas sobre cubre-objetos estériles y luego fueron tratadas durante 24 h con sobrecarga o depleción de colesterol. Posteriormente, las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 min, las células luego fueron permeabilizadas y bloqueadas con Triton X-100 0,2%, Albúmina Sérica Bovina 3% durante 10 min, e incubadas 12 h a 4 °C con anti-AQP8 (10 µg/ml) (Millipore). A continuación se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y luego los cubreobjetos se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes) durante 1 h. Los cubreobjetos se lavaron y fueron montados con ProLong (Molecular Probes). La fluorescencia se visualizó por microscopía confocal (Nikon C1SiR con microscopio invertido Nikon TE200). Bajo estas condiciones, no se detectó autofluorescencia. Los controles realizados por omisión de anticuerpos primarios o

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

3.7. Fraccionamiento subcelular

Las células en cultivo fueron lavadas con PBS frío y levantadas por scraping en sacarosa 0,3 M (Merck) con inhibidores de proteasas PMSF 0,1 mM y leupeptina 0,1 mM (Sigma). Luego de ser sonicadas (3 ciclos de sonicado durante 5 s, 30 % amplitud en frío con 30 s de descanso), las muestras fueron centrifugadas a 500 g por 10 min a 4 °C para obtener los sobrenadantes post-nucleares que luego fueron centrifugados a 6.000 g por 10 min a 4 °C resultando en la obtención de las fracciones citoplasmática y mitocondrial. Esta última se lavó dos veces antes de ser resuspendida en sacarosa 0,3 M conteniendo inhibidores de proteasas. Las mitocondrias fueron conservadas a -70 °C o utilizadas en el momento según el caso.

El sobrenadante conteniendo la fracción citoplasmática fue centrifugado a 144.000 g obteniéndose así la fracción microsomal en el pellet para ser luego resuspendida y utilizada.

En ciertos casos (ver resultados) se utilizaron lisados totales en los cuales las células fueron esrapeadas con buffer RIPA. Sonicadas en baño de sonicación a 4 °C durante 5 minutos y centrifugadas 30 minutos a 15.000 g para eliminar en el pellet restos celulares, DNA y restos del colágeno del soporte de cultivo.

3.8. Medición de la concentración de proteínas

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

3.9. Immunoblotting

Las fracciones de interés se solubilizaron en el buffer de muestra con agentes reductores (Tris 20 mM, pH 8,5, SDS 1%, DTT 40 μ M, glicerol 10%) durante 5 min a 90 °C y se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12% (Krebs y Henseleit, 1932). Se transfirieron eléctricamente a membranas de polivinil difluoruro (PVDF, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, MA, EE.UU.) durante 1 h a voltaje constante de 100 mV, utilizando un equipo comercial (Mini-Trans Blot Cell, Bio Rad). Se bloquearon en leche al 10 % en PBS-Tween (PBS, Tween 20 0,1 %) por un mínimo de 1 h a temperatura ambiente y luego se incubaron toda la noche a 4 °C con un anticuerpo comercial producido en ratón contra AQP8 (0, μ g/ml, Santa cruz) y β -actina (0,3 μ g/ml, Sigma), en conejo contra prohibitina (0.1 μ g/ml, Abcam), HMGCR (0.2 μ g/ml, Santa Cruz) y SREBP-2 (1 μ g/ml, Santa Cruz) y en carnero contra AQP8 (0,3 μ g/ml, Santa Cruz).

Las membranas polivinílicas fueron entonces lavadas con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rabanito durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas inmovilizadas fueron detectadas por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Pierce ECL-Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Las autoradiografías se obtuvieron al exponer las membranas a una placa radiográfica de

alta sensibilidad (Kodak XAR films). Posteriormente, las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando Image J Software (Rasband, 1997-2019).

3.10. RT-qPCR: Retro-transcripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se aisló el RNA total de células Huh-7 utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) para luego obtener el cDNA total utilizando la enzima SuperScript III RNase H reverse transcriptase (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando SYBR Green como sonda para evaluar los niveles de transcriptos; se realizaron reacciones de amplificación por triplicado con un sistema de PCR StepOne en tiempo real (Applied Biosystems) con Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Los cebadores utilizados para la detección de AQP8 fueron 5'-CCACGCTGGGGAATATCA-3' y 5'-GAGGAGCATCACCAGGTTG-3', para la detección de HMGCR 5'-GTCATTCCAGCCAAGGTTGT-3' y 5'-CCACTTGCTTCCATTA GGGGA-3' y para el gen de referencia gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa fueron 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3' y 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'. La eficiencia de los cebadores fueron calculadas realizando una curva de calibración en las cuales diluciones seriadas al medio de las muestras resultaron en diferencias de Ct promedios mayores a 0.93 con un $R^2 > 0.98$. Los fragmentos de cDNA amplificados por cada par de cebadores fueron de 92 y 228 159 bp para AQP8, HMGCR y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, respectivamente. Al final de cada experimento, la especificidad de cada reacción fue confirmada con una curva de disociación a partir de 55 °C y hasta 95 °C con medida de fluorescencia continua. Los niveles relativos de

mRNA de AQP8 y HMGCR fueron normalizados a los de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.11. Síntesis de ARN de interferencia

Se sintetizaron pequeños ARN de interferencia (siRNA) de doble cadena y 21 pares de bases de longitud utilizando el kit Silencer short interfering RNA (Ambion) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como templado se utilizaron oligonucleótidos sintetizados por Invitrogen. Se seleccionaron dos secuencias blanco contra diferentes regiones de la molécula de AQP8 humana en el caso de la línea celular Huh-7 y dos secuencias blanco contra diferentes regiones de la molécula de AQP8 de rata de acuerdo a los protocolos descritos por (Elbashir y col., 2001). Estos siRNA indujeron una disminución significativa en la expresión de AQP8 mitocondrial, corroborada por inmunobloting. El siRNA1 fue dirigido específicamente hacia los nucleótidos 177–197 (AACGGTTTGTGCAGCCATGTC) y el siRNA2 hacia los nucleótidos 749–769 (AACCACTGGAAGTTCCACTGG) de la AQP8 humana. El siRNA control o scramble (SCR) fue diseñado reordenando al azar los nucleótidos de uno de los blancos específicos, el siRNA1 (AATGTGTCCGTGAGCACGTCT).

Para hepatocitos de rata, el siRNA1 fue dirigido específicamente hacia los nucleótidos 186-206 (AACATGGCTGACAGTTACCAT), el siRNA2 hacia los nucleótidos 236-256 (AACCGTGTGTGGTGGAAGTTT) y el SCR fue diseñado utilizando los nucleótidos del siRNA1 pero ordenados al azar (AATATCGCGATGTGCACTACA).

3.12. Reducción de la expresión de AQP8 mitocondrial por siRNA

Células Huh-7 fueron sembradas en placas de Petri de 35 mm a una densidad de 5×10^5 células/placa en medio sin antibiótico. Luego de 18 h de cultivo las células fueron transfectadas con los siRNA específicos para AQP8 utilizando el agente de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La expresión de AQP8 mitocondrial se monitoreó transcurridas 24 y 48 h post-transfección por inmunobloting. Como se destacó anteriormente, los siRNA específicos mostraron una disminución significativa en la expresión de mtAQP8 a 48 h, no así a 24 h post-transfección. El porcentaje de disminución de mtAQP8 fue de aproximadamente un $50 \pm 5\%$ ($p < 0,05$) para la línea celular Huh-7.

Hepatocitos aislados de rata (5×10^5) fueron sembrados en placas de Petri de 35 mm recubiertas con colágeno tipo I y luego de 16 h de cultivo fueron transfectados con los siRNA específicos para AQP8 de rata siguiendo el mismo protocolo que para las líneas celulares. La expresión de mtAQP8 se monitoreó transcurridas 24 y 48 h post-transfección y a este último tiempo el porcentaje de disminución de mtAQP8 fue de aproximadamente un $70 \pm 10\%$ ($p < 0,05$).

3.13. Transfección adenoviral

AdhAQP8 es un vector adenoviral serotipo 5 bicistrónico recombinante deficiente en la replicación que codifica para la AQP8 humana (hAQP8) y para la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Este adenovector fue diseñado en nuestro laboratorio y producido en el laboratorio de Terapia Celular y Molecular del Instituto Leloir (Fig. 3.4). Como control, se utilizó un adenovector similar que codifica sólo para la EGFP.

Los hepatocitos se incubaron con AdhAQP8 a una multiplicidad de infección 50 (agregado al medio de cultivo durante 4 h a 37 ° C). La infección viral fue detenida mediante la sustitución del medio de cultivo, y las células fueron cultivadas durante 48 h. Se evaluó la expresión de la proteína hAQP8 por inmunobloting.

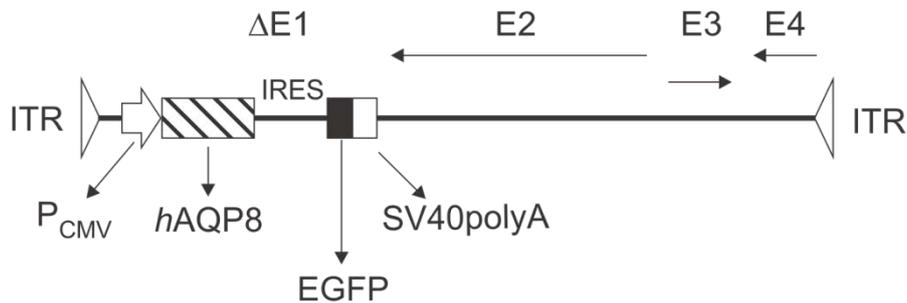


Figura 3.4. Diagrama de la estructura del adenovector AdhAQP8. ITR, repetición terminal invertida; P_{CMV}, promotor del Citomegalovirus; hAQP8, ADNc de la AQP8 humana; IRES, Internal Ribosome Entry Site Element; EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*; SV40polyA, señal de poliadenilación de Simian Virus 40; $\Delta E1$, delección de las secuencias adenovirales E1; E2, E3 y E4, genes adenovirales E2, E3 y E4.

3.14. Cuantificación de la biosíntesis de colesterol

La biosíntesis *de novo* de colesterol fue medida siguiendo la incorporación de acetato radioactivo al colesterol (Giudetti y col., 2005). Cuarenta y cuatro horas después de la transfección, el medio de cultivo fue substituido por medio completo con el agregado de 1 μ Ci de [1-¹⁴C] ácido acético por millón de células más acetato de sodio frío 250 μ M durante 4 h. Para los experimentos de Mitotempo, 30 h después de la transfección, los hepatocitos fueron cultivados en presencia de 50 μ M Mitotempo durante 1 hora. 48 h luego de la transfección, las células fueron lavadas y levantadas en PBS frío. Se extrajeron los lípidos totales mediante el método de Folch, se separó la fase orgánica, y

el solvente fue evaporado bajo corriente de N₂ (Giudetti y col., 2005). Luego, se resuspendió la muestra en 60 µL de cloroformo y se resolvieron los lípidos por cromatografía delgada utilizando heptano: dietil éter: ácido acético en una proporción 70:30:1. Los lípidos resueltos fueron visualizados con vapor de yodo, y la incorporación de acetato radiactivo al colesterol se cuantificó llevando las bandas correspondientes al colesterol a líquido de centelleo para luego cuantificar su radioactividad en contador de centelleo (1214 RackBeta, Pharmacia). La radioactividad se normalizó a la proteína total del lisado celular correspondiente.

3.15. Liberación de H₂O₂ de mitocondrias aisladas

Se midió la liberación de H₂O₂ de mitocondrias aisladas de hepatocitos cultivados y transfectados utilizando el kit Amplex Red-horseradish peroxidase assay kit (Promega) según ha sido descrito previamente (Muller y col., 2004). Este ensayo utiliza la HRP para catalizar la oxidación del Amplex Red, dependiente de H₂O₂, a su producto fluorescente resorufina, detectando solamente la liberación de peróxido de hidrógeno ya que el tamaño de la HRP evita que esta ingrese a la mitocondria. Brevemente, se agregaron a 50 µg de mitocondrias aisladas, 50 µM del reactivo Amplex Red y 0,1 U/ml de peroxidasa en 200 µl de buffer de respiración mitocondrial (Tris HCl 1 mM, manitol 0,32 M, fosfato inorgánico 8 mM, MgCl₂ 4 mM, EDTA 0,08 mM, EGTA 1 mM y albúmina sérica bovina 0,2 mg/ml, pH 7,4) (Santiago y col., 2008). Los cambios en la absorbancia se registraron cada 3 min durante 30 min a 37 °C a una longitud de onda de 565 nm en un lector automático de microplacas (Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector) con compartimento con control de temperatura. Para cada ensayo, se utilizaron pocillos con reactivos o buffer con mitocondrias solamente para estimar la

absorbancia de fondo y la tasa de auto-oxidación del Amplex Red. La liberación de H_2O_2 mitocondrial fue determinada en ausencia de sustratos exógenos (Estado 1), y se calcularon las pendientes del aumento de absorbancia vs. tiempo. El H_2O_2 fue cuantificado con una curva de concentraciones conocidas de H_2O_2 .

3.16. Tratamiento con MitoTempo

El mitotempo es un antioxidante dirigido específicamente a mitocondrias. El Tempol es un nitróxido de piperidina ampliamente utilizado como antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Sus propiedades antioxidantes se adscriben a la habilidad de estos nitróxidos de catalizar la dismutación del superóxido, es decir, de actuar como SOD-miméticos, así como de detoxificar formas redox-activas de iones de metales de transición (ferroso, cuproso, férrico) y de reaccionar directamente con distintos tipos de radicales libres, formando aductos con estabilidades y químicas de breakdown variables. El Mitotempo es un derivado del mismo dirigido a mitocondrias el cual contiene la unidad Tempol conjugada con un motivo lipofílico trifenilfosfonio (TPP) que le permite aumentar su afinidad a la absorción en bicapas de fosfolípidos para así atravesar rápidamente las membranas biológicas y acumularse varios cientos de veces en mitocondrias (Trnka y col., 2008).

En hepatocitos aislados con sobre-expresión de mtAQP8 se realizaron tratamientos con Mitotempo donde se cuantificó la biosíntesis de colesterol (ver detalles del experimento en 3.14) y la liberación de H_2O_2 mitocondrial. Para este último ensayo, 43 h post-transfección, las células fueron tratadas durante 1 h a 37 °C con Mitotempo 50 μM (Santa Cruz Biotechnology) para finalmente aislar las mitocondrias y realizar el ensayo detallado en 3.15.

3.17. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media aritmética \pm error estándar. Para la comparación entre grupos experimentales se efectuó el análisis de la variancia (ANOVA), seguida del test de Tukey. Los valores con $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. Resultados

4.1. Efecto de la alteración del contenido celular de colesterol en la expresión de mtAQP8

Con el fin de estudiar si la manipulación del contenido celular de colesterol en hepatocitos, y la consecuente modulación de su síntesis, tienen un efecto en la regulación de la expresión de la mtAQP8, se realizaron estudios tanto de sobrecarga como de depleción del contenido de colesterol en la línea celular hepática Huh-7.

4.1.1. Expresión de mtAQP8 en hepatocitos con sobrecarga de colesterol

La incubación de células Huh-7 con concentraciones crecientes del complejo colesterol/metil-beta-Ciclodextrina resultó en un aumento dosis dependiente del contenido de colesterol celular total del 25 ± 6 , 62 ± 5 y $92\pm 12\%$ para las concentraciones de colesterol 32, 64 y 128 μM , respectivamente (Fig. 4.1A). La viabilidad celular evaluada por el ensayo de liberación de LDH no fue afectada (Fig. 4.1B). Debido a que una sobrecarga de colesterol modula negativamente la expresión de la enzima HMGCR, la misma se cuantificó por Western blot como control positivo del efecto del tratamiento. La expresión proteica de HMGCR se vio reducida de manera dosis dependiente en un 19 ± 2 , 38 ± 7 y $65\pm 7\%$ respecto del control para los agregados de colesterol 32, 64 y 128 μM , respectivamente (Fig. 4.1C). En estas condiciones, la expresión de AQP8 analizada por Western blot en la fracción mitocondrial también se vio reducida en aproximadamente un 18 ± 5 , 50 ± 2 y $64\pm 5\%$ respecto del control para los agregados de colesterol 32, 64 y 128 μM , respectivamente (Fig. 4.1D).

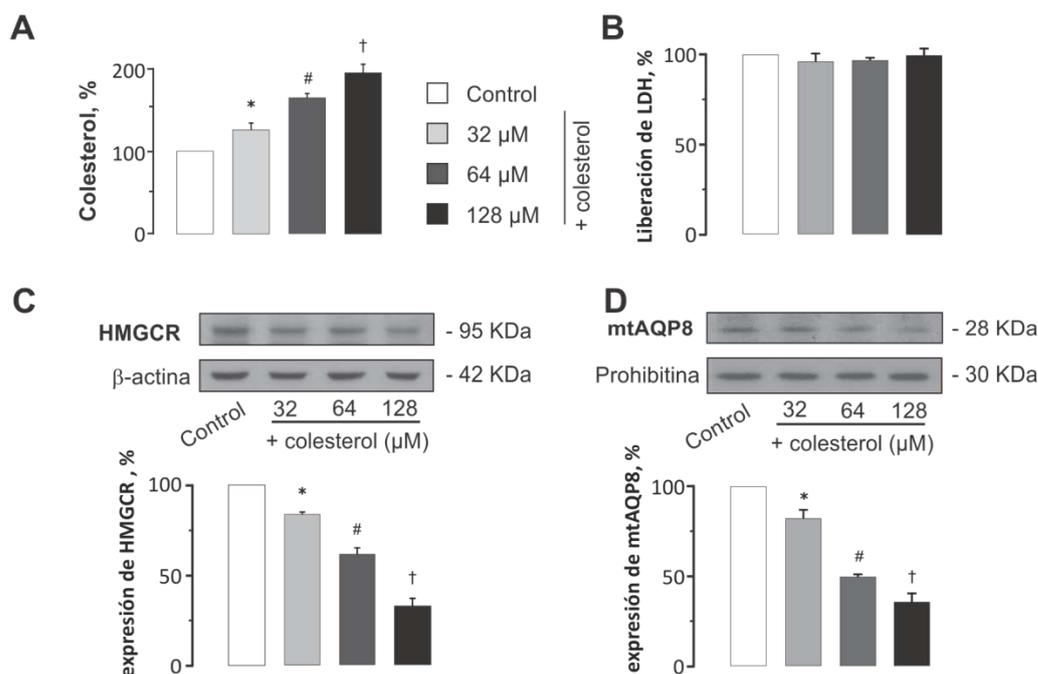


Figura 4.1. Expresión de mtAQP8 en hepatocitos con sobrecarga de colesterol. (A) Contenido de colesterol en extractos de fase orgánica de lisados de células Huh-7 incubadas durante 8 h en cantidades crecientes del complejo Colesterol:metil-beta-Ciclodextrina (colesterol 32, 64 y 128 μM agregados). (B) Curva de liberación al medio de cultivo de la enzima LDH para los diferentes agregados de colesterol. (C, D) Western blots representativos para HMGCR en fracciones microsomales y mtAQP8 en fracciones mitocondriales y sus correspondientes análisis densitométricos en células Huh-7 tratadas con agregados de colesterol durante 24 h. Los datos son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética ± error estándar, n=3; *P<0,05 respecto del control; #P<0,05 respecto de 32 μM; † P<0,05 respecto de 64 μM.

Se analizó también la expresión de mtAQP8 mediante inmunofluorescencia confocal donde se puede observar un patrón granular citoplasmático compatible con una localización mitocondrial. En concordancia con los estudios realizados por Western blot, las células tratadas durante 24 h con colesterol 128 μM presentaron una marcada reducción en la intensidad de fluorescencia (Fig. 4.2).

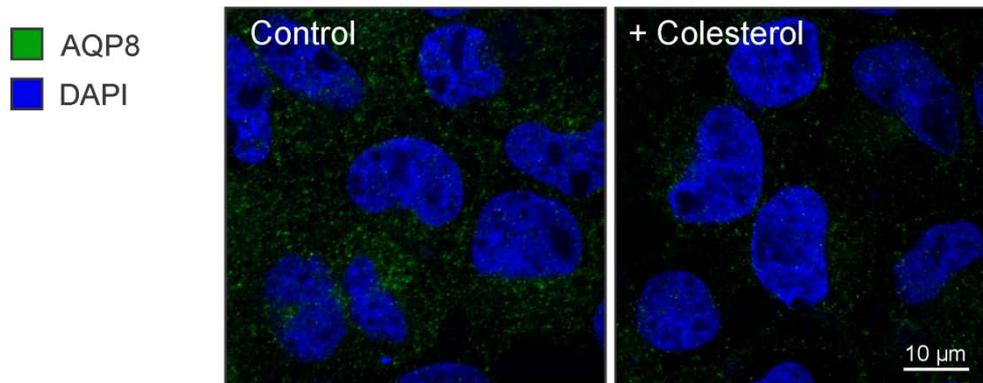


Figura 4.2. Inmunofluorescencia confocal de mtAQP8 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol. Inmunofluorescencia confocal para mtAQP8 (verde) en células incubadas en colesterol 128 mM durante 24 h. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

Para estudiar si los cambios de expresión de mtAQP8 observados en las células con sobrecarga de colesterol son causados por una modulación transcripcional, se cuantificaron los ARN mensajeros de HMGCR y mtAQP8 mediante RT-qPCR. Estos se encontraron reducidos en 58% y 70% respectivamente, luego de la incubación con colesterol 128 µM (Fig. 4.3).

A continuación, se estudió la expresión del factor de transcripción SREBP-2, el cual es clave en el control de la expresión de genes involucrados en el metabolismo hepático del colesterol, incluyendo el que codifica HMGCR, y probablemente AQP8 en respuesta a cambios en los contenidos de colesterol de las membranas celulares. Como era esperado, la expresión de la forma activa de SREBP-2 está marcadamente inhibida (aproximadamente un 80%) en las células tratadas con colesterol 128 µM (Fig 4.4).

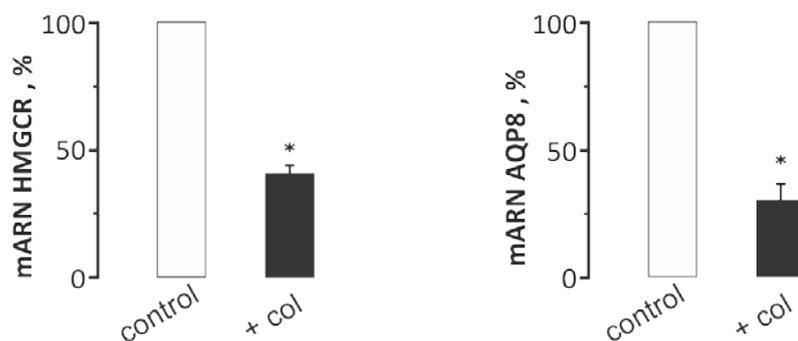


Figura 4.3. Expresión del ARN mensajero (mARN) de la mtAQP8 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol. Expresión del mARN de HMGCR (izquierda) y mtAQP8 (derecha) cuantificados por RT-qPCR en células incubadas en medio con colesterol 128 μ M durante 8 h. Gen de referencia: gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa. Los resultados son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n=3$; * $P<0,05$ respecto del control.

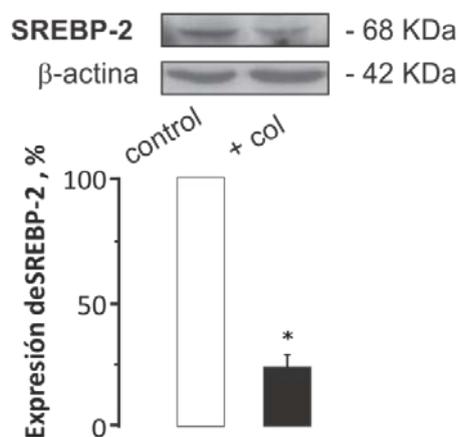


Figura 4.4. Expresión del factor nuclear SREBP-2 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol. Expresión proteica de la forma nuclear (forma activa) de SREBP-2 en células incubadas con colesterol 128 μ M durante 6 h. Los datos son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n=3$; * $P<0,05$ respecto del control.

4.1.2. Expresión de mtAQP8 en hepatocitos depletados de colesterol

Se trataron células Huh-7 con metil-beta-ciclodextrina (m β CD) 2 mM. El tratamiento disminuyó los niveles de colesterol celular aproximadamente un 38% (Fig. 4.5A). En estas condiciones la viabilidad celular evaluada por el ensayo de liberación de LDH no fue afectada (Fig 4.5B).

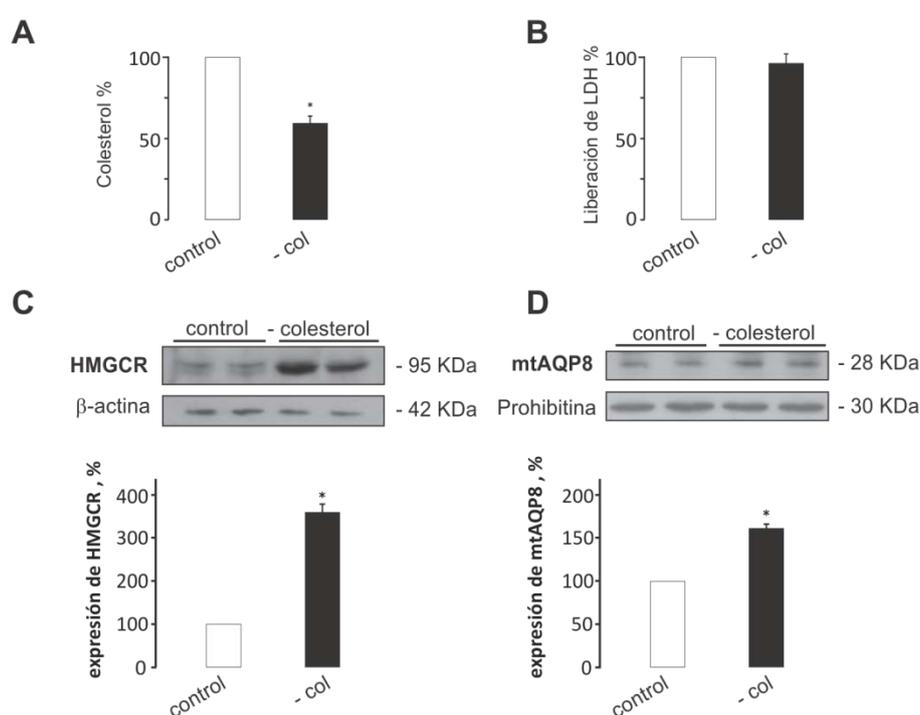


Figura 4.5. Expresión de mtAQP8 en hepatocitos con depleción de colesterol (A) Contenido de colesterol en extractos de fase orgánica de lisados de células Huh-7 incubadas durante 8 h en m β CD 2 mM (Control: 100%, m β -CD: 64 \pm 2%; *P<0,05 respecto del control) (n=3). (B) Curva de liberación al medio de cultivo de la enzima LDH. (C, D) Western blots representativo para HMG-CoA R y mtAQP8 en fracciones microsomales y sus correspondientes análisis densitométricos en muestras de células Huh-7 tratadas con m β -CD 2 mM durante 24 h. Los datos son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, n=3; *P<0,05 respecto del control.

La depleción de colesterol aumentó significativamente (+370%) los niveles proteicos de la enzima HMGCR cuantificados por Western blot (Fig. 4.5C). En estas condiciones la expresión de mtAQP8 también se vio aumentada en aproximadamente un 70% (Fig. 4.5D).

Los estudios de expresión mediante inmunofluorescencia confocal mostraron aumentada fluorescencia en las células depletadas de colesterol (Fig. 4.6).

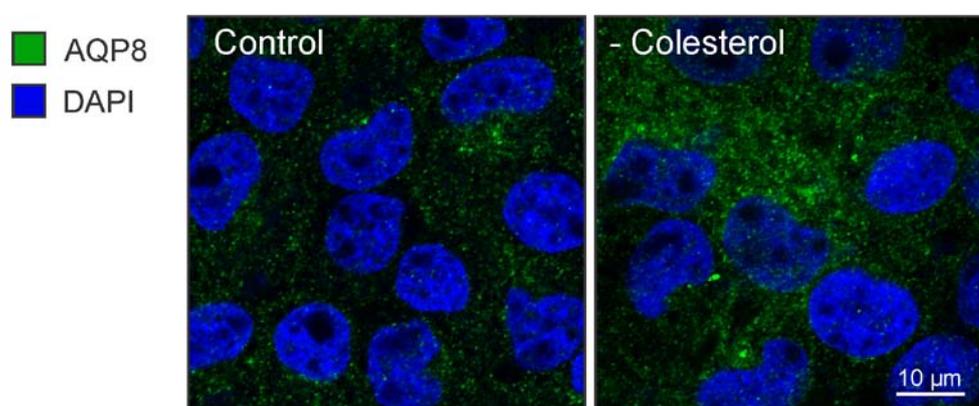


Figura 4.6. Inmunofluorescencia confocal de mtAQP8 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol. (A) Inmunofluorescencia confocal para mtAQP8 (verde) en células incubadas con m β CD 2 mM durante 24 h. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

En la figura 7 se muestra la expresión del mRNA de HMGCR, la cual se encontró aumentada en un 680%, como así también la expresión del mRNA de AQP8 que aumentó un 60%.

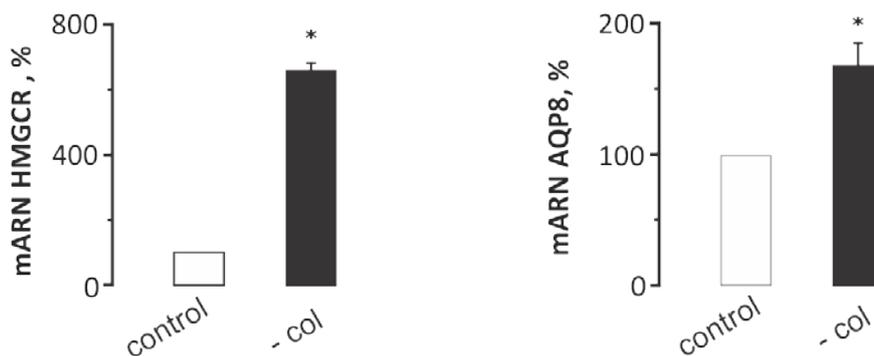


Figura 4.7. Expresión del mensajero de la mtAQP8 en células Huh-7 depletadas de colesterol. Expresión del mARN de HMGCR (izquierda) y mtAQP8 (derecha) cuantificados por RT-qPCR en células incubadas con m β CD 2 mM durante 8 h. Gen de referencia: gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa. Los datos son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, n=3; *P<0,05 respecto del control.

Por último, se estudió la expresión de la forma activa de SREBP-2, la cual se encontró aumentada en un 100 % en las células tratadas con m β CD (Fig. 4.8).

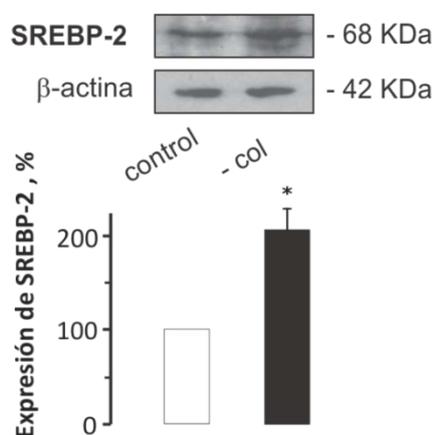


Figura 4.8. Expresión del factor nuclear SREBP-2 en células Huh-7 depletadas de colesterol. Expresión proteica de la forma nuclear (forma activa) de SREBP-2 en células incubadas con con m β CD 2 mM durante 6 h. Los datos son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar; n \geq 3; *P<0,05 respecto del control.

4.2. Efecto de la manipulación de la expresión de mtAQP8 sobre la biosíntesis de colesterol

La evidencia experimental mostrada sugiere que en los hepatocitos, el colesterol, vía SREBP-2, regula transcripcionalmente la expresión de la mtAQP8 como lo hace con sus enzimas biosintéticas (ej. HMGCR). Sobre esta base, decidimos indagar un posible rol de la AQP8 *per se* en la colesterogénesis realizando experimentos *in vitro* tanto de knockdown como de incremento de la expresión de la mtAQP8.

4.2.1. Efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la biosíntesis del colesterol en hepatocitos

Se transfectó la línea celular Huh-7 con siRNAs específicos contra AQP8 humana. Transcurridas 24 h, la expresión de mtAQP8 no fue afectada (Fig. 4.9, izquierda), por el contrario, 48 h post-transfección, las células mostraron un descenso de la expresión proteica de mtAQP8 de aproximadamente un 70% (Fig. 9, derecha).

Por su parte, la síntesis *de novo* de colesterol no fue afectada a las 24 h post-transfección (Fig. 4.10, izquierda), pero si a las 48 h, donde se observó una inhibición del 35-50% (Fig. 4.10, derecha). La viabilidad celular, medida por la liberación al medio de la enzima LDH, no fue afectada (Fig. 4.11).

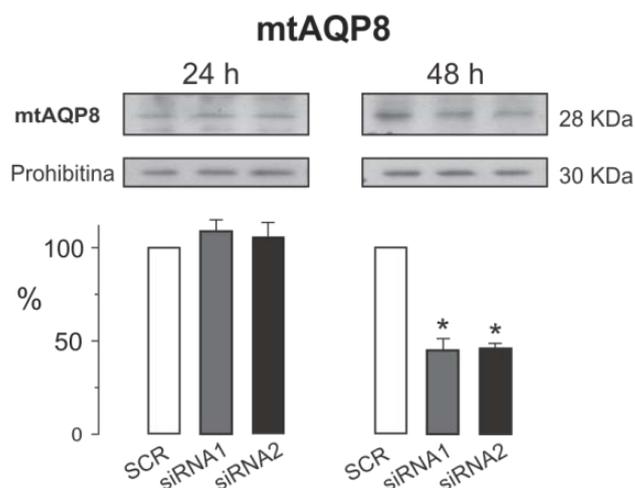


Figura 4.9. Knockdown de mtAQP8 en células Huh-7. Western blot representativo para mtAQP8 (28 kDa) en fracciones mitocondriales de células Huh-7 incubadas durante 24 y 48 h con dos siRNA específicos para el mRNA de AQP8 humana (siRNA1 y 2) y un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA1, pero con una disposición al azar (SCR). Se utilizó la proteína mitocondrial Prohibitina como control de carga. Los resultados son porcentajes respecto del SCR y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n \geq 3$; * $P < 0,05$ respecto de SCR.

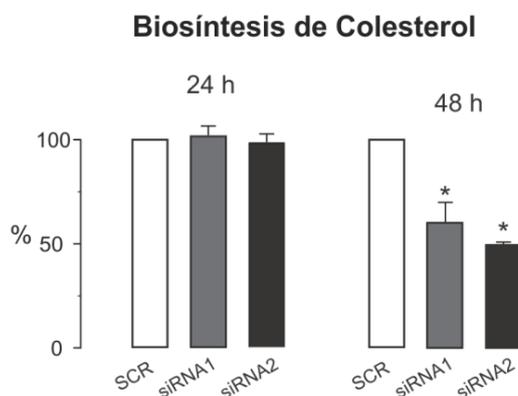


Figura 4.10. Efecto del knockdown de mtAQP8 en la biosíntesis de colesterol en células Huh-7. Biosíntesis *de novo* de colesterol en células Huh-7 incubadas durante 24 y 48 h con dos siRNA específicos para el mRNA de AQP8 humana (siRNA1 y 2) y un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA1, pero con una disposición al azar (SCR). Los resultados son porcentajes respecto del SRC y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n \geq 3$; * $P < 0,05$ respecto de SCR.

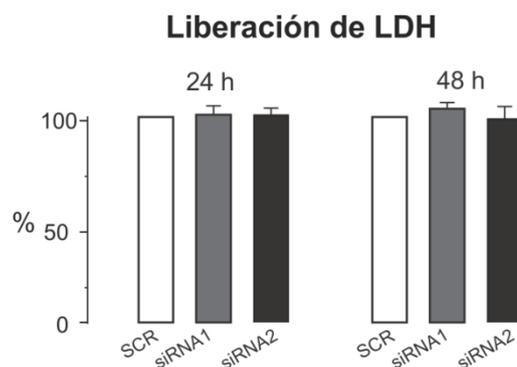


Figura 4.11. Efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la liberación al medio de la enzima LDH en células Huh-7. Liberación al medio de LDH en células Huh-7 incubadas durante 24 y 48 h con dos siRNA específicos para el mRNA de AQP8 humana (siRNA1 y 2) y un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA1, pero con una disposición al azar (SCR). Los resultados son porcentajes respecto del SCR y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n \geq 3$.

En forma coherente con los resultados obtenidos en la biosíntesis de colesterol, la expresión proteica de HMGCR, como aquella de SREBP-2, se encuentran reguladas negativamente en aproximadamente un 40 y 50%, respectivamente en las células con knockdown de mtAQP8 (Fig. 4.12).

De la misma manera, se transfectaron hepatocitos aislados de rata con siRNAs específicos para AQP8 de rata. Se obtuvieron resultados similares a los observados en la línea celular Huh-7. En la Fig. 4.13 se muestra que el knockdown de mtAQP8 se estableció a las 48 h post-transfección.

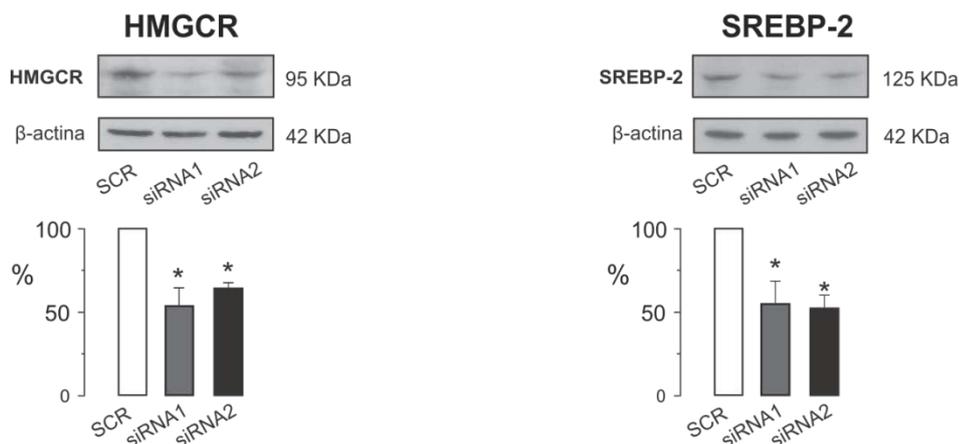


Figura 4.12. Efecto del knockdown de mtAQP8 en la expresión proteica de HMGCR y SREBP-2. Western blot representativo para HMGCR y SREBP-2 provenientes de células Huh-7 sometidas a knockdown de mtAQP8 y sus correspondientes análisis densitométricos relativizados a β -actina. Los resultados son porcentajes respecto del SCR y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n=3$; * $P<0,05$ respecto de SCR.

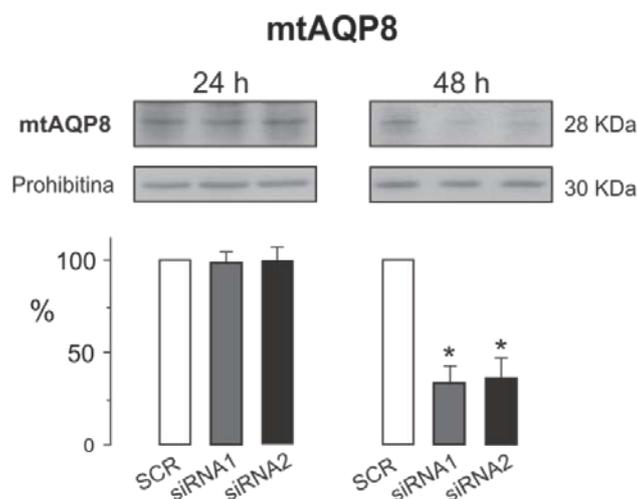


Figura 4.13. Knockdown de mtAQP8 en hepatocitos de rata en cultivo primario. Western blot representativo para mtAQP8 (28 kDa) en fracciones mitocondriales de hepatocitos de rata incubadas durante 24 y 48 h con dos siRNA específicos para el mRNA de AQP8 rata (siRNA1 y 2) y un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA1, pero con una disposición al azar (SCR). Se utilizó la proteína mitocondrial Prohibitina como control de carga. Los resultados son porcentajes respecto del SRC y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n=3$; * $P<0,05$ respecto de SCR.

Así mismo, la biosíntesis de colesterol disminuyó aproximadamente un 70 y un 50% respectivamente para los siRNA1 y 2 a las 48 h de transfección de los hepatocitos sin detectarse cambios a las 24 h (Fig. 4.14). La viabilidad celular, medida por el ensayo de liberación de LDH al medio, no fue afectada (Fig. 4.15).

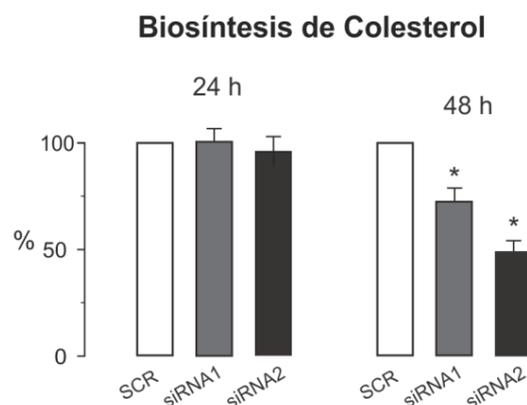


Figura 4.14. Efecto del knockdown de mtAQP8 en la biosíntesis de colesterol en hepatocitos de rata. Biosíntesis *de novo* de colesterol en hepatocitos de rata incubados durante 24 y 48 h con dos siRNA específicos para el mRNA de AQP8 de rata (siRNA1 y 2) y un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA1, pero con una disposición al azar (SCR). Los resultados son porcentajes respecto del SCR y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n \geq 3$; * $P < 0,05$ respecto de SCR.

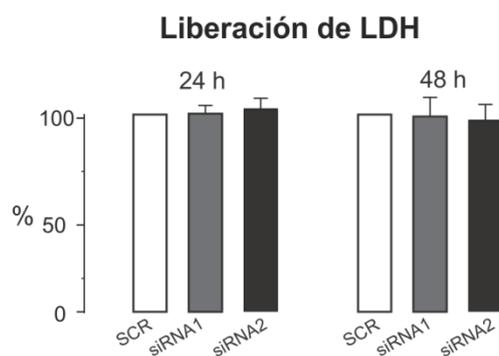


Figura 4.15. Efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la liberación al medio de la enzima LDH en hepatocitos de rata. Liberación al medio de LDH en hepatocitos de rata incubados durante 24 y 48 h con dos siRNA específicos para el mRNA de AQP8 de rata (siRNA1 y 2) y un siRNA control que posee la secuencia nucleotídica del siRNA1, pero con una disposición al azar (SCR). Los resultados son porcentajes respecto del SCR y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, $n \geq 3$.

4.2.2. Efecto de la sobre-expresión de mtAQP8 sobre la biosíntesis del colesterol en hepatocitos

La transferencia génica de AQP8 humana en hepatocitos vía el vector AdhAQP8, resultó en un marcado aumento en la expresión proteica de mtAQP8 (de 3 a 5 veces, aproximadamente) a las 48 h (Fig. 4.16, izquierda) sin afectar la viabilidad celular medida por el ensayo de liberación al medio de LDH (Fig. 4.16, derecha).

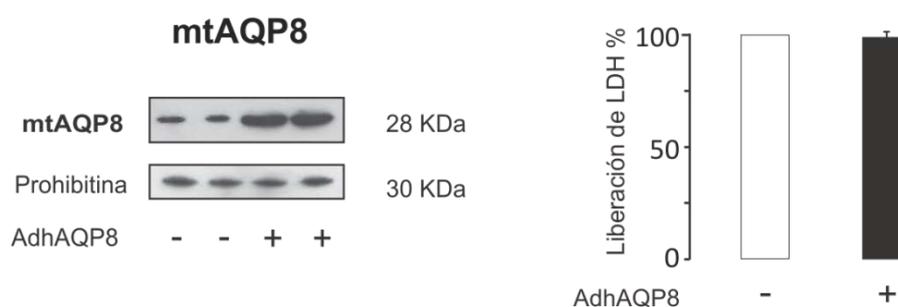


Figura 4.16. Sobre-expresión de mtAQP8 en cultivo primario de hepatocitos de rata. Western blot representativo para mtAQP8 en la fracción mitocondrial (izquierda), y curva de liberación al medio de cultivo de la enzima LDH (derecha) para hepatocitos con (+) o sin (-) sobre-expresión de mtAQP8. Se utilizó la proteína mitocondrial Prohibitina como control de carga.

La biosíntesis de colesterol se encontró aumentada significativamente en un 70 % en los hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8 (Fig. 4.17).

En acuerdo con este aumento en la biosíntesis de colesterol, la expresión proteica de HMGCR como aquella de SREBP-2, fueron reguladas positivamente (260 y 750%, respectivamente) en las células que sobre-expresan mtAQP8 (Fig. 4.18).

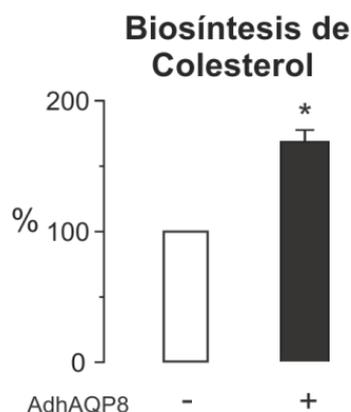


Figura 4.17. Efecto de la sobre-expresión de mtAQP8 en la biosíntesis de colesterol. Biosíntesis *de novo* de colesterol en hepatocitos con (+) y sin (-) sobre-expresión de mtAQP8. Los resultados son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, n=4; *P<0,05 respecto de AdhAQP8 (-).

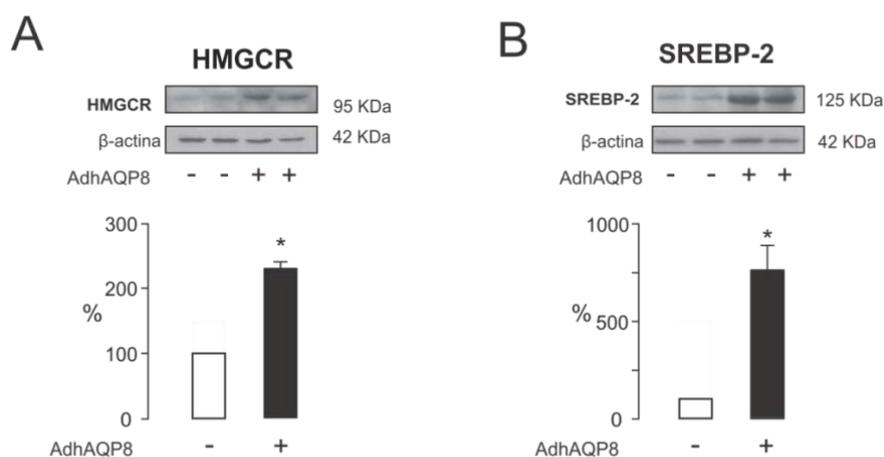


Figura 4.18. Efecto de la sobre-expresión de mtAQP8 en la expresión proteica de HMGCR y SREBP-2. Western blot representativo para HMGCR y SREBP-2 provenientes de hepatocitos con (+) y sin (-) sobre-expresión de mtAQP8 y sus correspondientes análisis densitométricos relativizados a β -actina. Los resultados son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, n=4; *P<0,05 respecto de AdhAQP8 (-).

4.3. Rol del peróxido de hidrógeno mitocondrial en la regulación de la biosíntesis de colesterol

Sobre la base de nuestra hipótesis decidimos evaluar si la mtAQP8, funcionando como peroxiporina, regula la liberación del peróxido de hidrógeno mitocondrial, y así, a través de esta molécula señal interviene en la modulación de la biosíntesis de colesterol.

4.3.1. Efecto de la manipulación de la expresión de mtAQP8 sobre la liberación de peróxido de hidrógeno mitocondrial

A fin de evaluar si el silenciamiento de mtAQP8 por ARN de interferencia podría afectar la liberación mitocondrial de H_2O_2 , se utilizaron mitocondrias aisladas provenientes de un cultivo de hepatocitos de rata luego de 48 h de haber sido transfectados con siRNA1, siRNA2 o SCR como sustrato acoplado al sistema de Amplex Red-HRP. Las mitocondrias aisladas provenientes de hepatocitos sometidos a knockdown de mtAQP8 (siRNA 1 y 2) mostraron una curva de liberación de H_2O_2 menos pronunciada (50% aproximadamente) que las provenientes de hepatocitos controles (SCR) tal como lo refleja el ajuste de sus pendientes (fig. 4.19).

Por otro lado se evaluó la liberación de H_2O_2 en mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata transfectados 48 h con el vector AdhAQP8. Las mitocondrias aisladas provenientes de hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8, mostraron un aumento significativo de aproximadamente 50% en la liberación de H_2O_2 (Fig. 4.20)

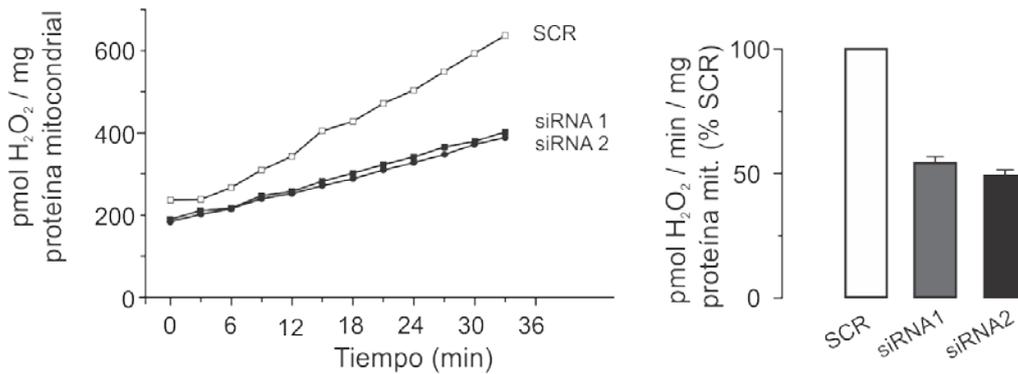


Figura 4.19. Liberación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas de hepatocitos con knockdown de AQP8. Izquierda: liberación de H₂O₂ en función del tiempo en mitocondrias aisladas de hepatocitos con knockdown de AQP8. Los datos corresponden a uno de dos experimentos independientes con resultados similares. Derecha: pendiente de liberación mitocondrial de H₂O₂ correspondiente al ajuste lineal de los datos mostrados a la izquierda.

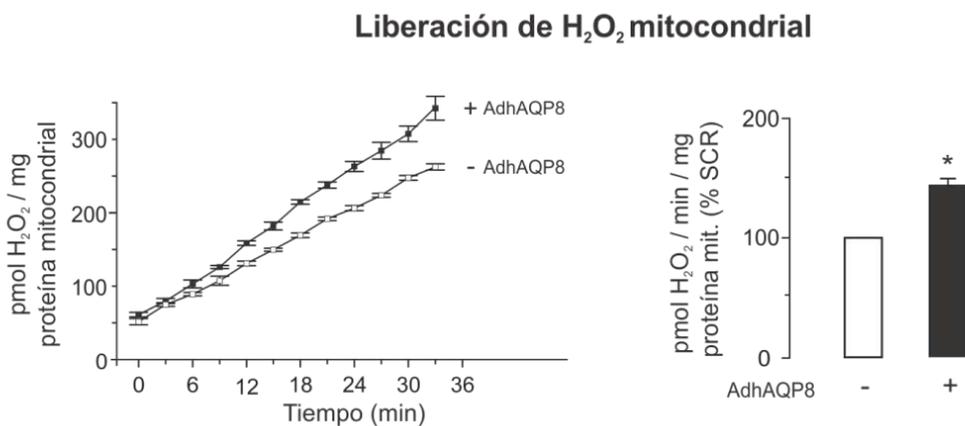


Figura 4.20. Liberación de H₂O₂ en mitocondrias aisladas de hepatocitos con sobre-expresión de AQP8. Izquierda: liberación de H₂O₂ en función del tiempo en mitocondrias aisladas de hepatocitos tratados con AdhAQP8 (+) o controles (-). Derecha: pendientes de liberación mitocondrial de H₂O₂ provenientes del ajuste lineal de las curvas de liberación en el tiempo. Los resultados son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, n=4; *P<0,05 respecto de AdhAQP8 (-).

4.3.2. Efecto del Mitotempo sobre la liberación del mtH_2O_2

Para profundizar en el rol del peróxido de hidrógeno mitocondrial como señalizador en la regulación de la biosíntesis de colesterol se utilizó el antioxidante específico de mitocondrias Mitotempo. Inicialmente, evaluamos si el Mitotempo tenía la capacidad de inhibir la liberación de peróxido de hidrógeno mitocondrial. Observamos que se previno el aumento en la liberación de H_2O_2 inducido por la sobre-expresión de mtAQP8 en hepatocitos (Fig. 4.21), sin provocar cambios en la expresión de mtAQP8 (Fig. 4.22, izquierda). La viabilidad celular medida por el ensayo de liberación de LDH al medio no fue afectada (Fig. 4.22, derecha).

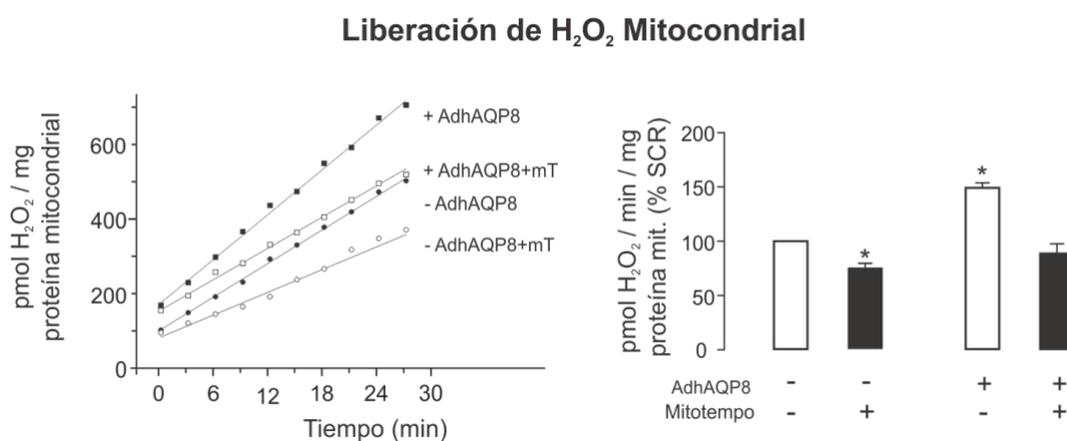


Figura 4.21. Efecto del Mitotempo sobre la liberación de H_2O_2 mitocondrial de hepatocitos con sobre-expresión de AQP8. Izquierda: liberación de H_2O_2 en el tiempo en mitocondrias aisladas de hepatocitos tratados con AdhAQP8 (+) o controles (-) y con Mitotempo (+mT). Los datos corresponden a uno de tres experimentos independientes con resultados similares. Derecha: pendientes de liberación mitocondrial de H_2O_2 provenientes del ajuste lineal de las curvas de liberación en el tiempo. Los resultados son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar; * $P < 0,05$ respecto de AdhAQP8 (-) Mitotempo (-).

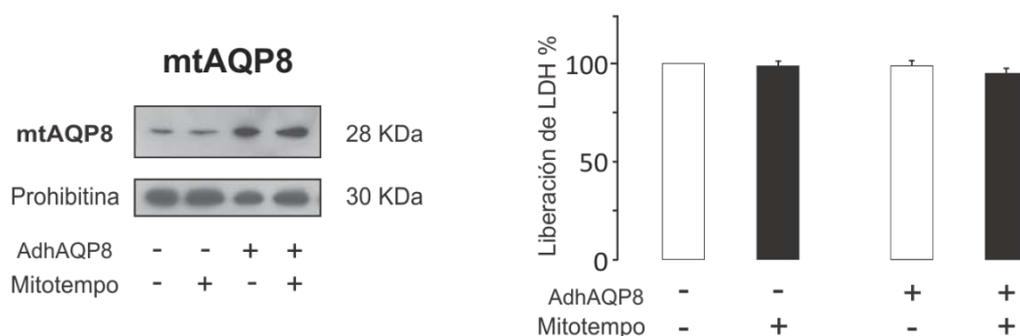


Figura 4.22. Sobre-expresión de mtAQP8 en hepatocitos tratados con Mitotempo. Western blot representativo para mtAQP8 en la fracción mitocondrial (izquierda) y curva de liberación al medio de cultivo de la enzima LDH (derecha), para hepatocitos con expresión endógena (-) o con sobre-expresión inducida por AdhAQP8 (+) y que fueron tratados (+) o no (-) con Mitotempo. Se utilizó la proteína mitocondrial Prohibitina como control de carga.

4.3.3. Efecto del Mitotempo sobre la biosíntesis de colesterol

En base a estos resultados analizamos si el tratamiento con Mitotempo y su consecuente disminución de la liberación del H_2O_2 hacia el citosol, tendría efectos en la regulación de la biosíntesis de colesterol. Para ello se realizó un ensayo de biosíntesis *de novo* del colesterol en hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8. En estas condiciones el aumento de la biosíntesis de colesterol inducido por sobre-expresión de mtAQP8 (Fig. 4.15), fue prevenido por el tratamiento con Mitotempo (Fig. 4.23).

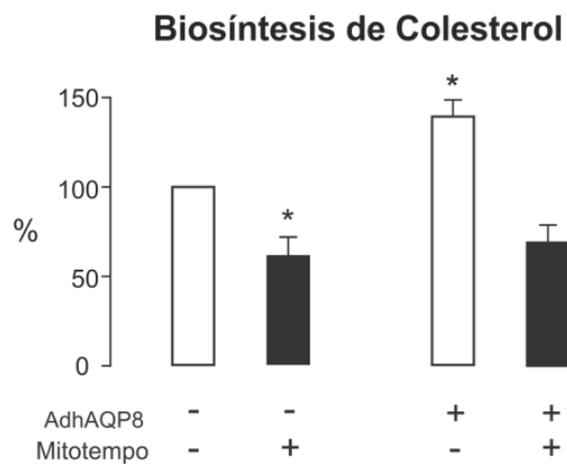


Figura 4.23. Efecto del Mitotempo sobre la biosíntesis de colesterol en hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8. Biosíntesis *de novo* de colesterol en hepatocitos tratados con AdhAQP8 (+) o controles (-), y con (+) o sin (-) Mitotempo. Los resultados son porcentajes respecto del control y se expresan como la media aritmética \pm error estándar, n=4; *P<0,05 respecto de AdhAQP8 (-) Mitotempo (-).

5. *Discusión y Conclusiones*

La principal contribución del presente trabajo de Tesis se relaciona con la relevancia funcional del transporte mitocondrial del peróxido de hidrógeno facilitado por la mtAQP8 durante el proceso de regulación de la colesterogénesis hepática.

5.1. *El colesterol regula la expresión de la mtAQP8 en hepatocitos*

Usando células hepáticas humanas, encontramos que (i) la sobrecarga de colesterol disminuyó la expresión a nivel proteína y mensajero de mtAQP8; (ii) la depleción de colesterol aumentó la expresión a nivel proteína y mensajero de mtAQP8. Esto concuerda con lo descrito por trabajos iniciales que utilizaron microarray de oligonucleótidos en donde se reportó una regulación negativa de AQP8 en ratones alimentados con dietas ricas en colesterol. Uno de estos trabajos (Maxwell y col., 2003), informa que en ratones sometidos a dieta con alto contenido de colesterol, se reprime la expresión génica del ARNm de la AQP8 en forma coordinada con la de las enzimas claves de la biosíntesis hepática del colesterol. Otro estudio utilizó ratones sometidos a dieta aterogénica (compuesta de la sal biliar colato, triglicéridos y colesterol) y observó que solo la remoción del colesterol de la dieta normaliza la disminuida expresión del ARNm de la AQP8 (Vergnes y col., 2003). Más recientemente, un estudio sugirió a la AQP8 como un gen relacionado al metabolismo hepático del colesterol (Williams y col., 2016). Dicho trabajo utiliza un nuevo enfoque en el análisis de datos el cual hace uso no solo de datos de expresión de mensajeros provenientes de microarrays, sino también del análisis genómico, proteómico y metabolómico realizado en ratones sometidos a dieta hipercolesterolémica. Cabe destacar que los estudios proteómicos de dicho trabajo fueron realizados directamente sobre mitocondrias aisladas.

Otro de los trabajos iniciales que utilizaron la técnica de microarray fue realizado en ratones transgénicos con sobre-expresión del factor de transcripción SREBP-2 o del SREBP-1a (Horton y col., 2003). Se informa aumentado el ARNm de AQP8 coordinadamente con el de las enzimas de la colesterogénesis

Sumado a esto, el análisis del gen de la AQP8 humana, como así también murina, arroja la presencia putativa de elementos de respuesta a esteroides a los cuales se unen los factores SREBP dentro de su región promotora [de SABiosciencesproprietarydatabase (DECODE, DECipherment of DNA Elements)].

El colesterol en los hepatocitos es conocido por activar o reprimir sus genes biosintéticos mediante factores de transcripción SREBP. Otro factor de transcripción clave relacionado con el colesterol, es el LXR, el cual participa en el metabolismo del colesterol controlando principalmente genes implicados en su excreción y en su transformación a ácidos biliares (Maxwell y col., 2003; Ye and DeBose-Boyd, 2011). Sin embargo, contrariamente a los SREBP, los agonistas del LXR no modifican la expresión hepática de HMGCR ni otros genes de la biosíntesis de colesterol, como así tampoco aquella del mRNA de AQP8 (Maxwell y col., 2003).

Nuestros resultados, sumados a los publicados por otros laboratorios, sugieren que el colesterol regula transcripcionalmente la expresión hepática de la mtAQP8 a través de factores SREBP, y que esta regulación sería de manera coordinada con la activación o represión de sus genes biosintéticos.

5.2. Rol de la mtAQP8 en la regulación de la biosíntesis de colesterol

Se estudió el papel de la mtAQP8 en la síntesis del colesterol en el hepatocito. Esta Tesis aporta la siguiente evidencia experimental: (i) El knockdown de la mtAQP8 disminuyó la síntesis de colesterol y las expresiones de las proteínas SREBP-2 y HMGCR; (ii) la sobre-expresión de la mtAQP8 aumentó la síntesis de colesterol y las expresiones de las proteínas SREBP-2 y HMGCR; (iii) la sobre-expresión de mtAQP8 provocó un incremento en la liberación mitocondrial del H₂O₂; (iv) el antioxidante mitocondrial Mitotempo previno el aumento de la liberación mitocondrial de H₂O₂ y de la biosíntesis de colesterol en las células con sobre-expresión de mtAQP8. Estas observaciones sugieren que mtAQP8, vía el H₂O₂ derivado de las mitocondrias, juega un papel en la colesterogénesis controlada por SREBP en los hepatocitos.

La disminución de la expresión de mtAQP8 en células derivadas de hepatocitos humanos (Marchissio y col., 2012), junto con el presente estudio en hepatocitos de rata con knockdown o sobre-expresión de mtAQP8, indican que mtAQP8 facilita la liberación difusional del H₂O₂ a través de la membrana mitocondrial del hepatocito. La señalización mediante el H₂O₂ originado en las mitocondrias está implicado en diversas rutas metabólicas (Leloup y col., 2011; Sies, 2014) y, según lo sugerido por nuestros resultados, puede estar también implicado en la biosíntesis de colesterol hepático. En consonancia con esto, las células hepáticas expuestas a bajos niveles de H₂O₂ muestran activación de SREBP y aumentada síntesis de colesterol (Giudetti y col., 2013; Seo and Shin, 2017). Llamativamente, la insulina, hormona colesterogénica, es capaz de estimular la generación y liberación del H₂O₂ mitocondrial hepático (Pomytkin, 2012) y por lo tanto, podría estar involucrada una señalización redox mitocondrial en la inducción de la biosíntesis de colesterol hepática generada por la insulina.

En la línea celular no hepática HeLa, se ha demostrado que la AQP8 de membrana plasmática facilita el flujo difusivo de H₂O₂ generado por la NOX y que este participa en las vías de señalización mediadas por tirosin-kinasas (Bertolotti y col., 2013). En hepatocitos, además de su localización mitocondrial, AQP8 se expresa en el dominio canalicular de la membrana plasmática y por lo tanto, no podría involucrarse en la asimilación de H₂O₂ generado por proteínas NOX las cuales están ubicadas en el dominio sinusoidal de la membrana plasmática. Por otro lado, cabe mencionar que los hepatocitos de rata en cultivo primario pierden progresivamente la expresión proteica de diferentes transportadores ubicados en membrana plasmática, incluida la AQP8. Por lo tanto, contrariamente a lo que sucede con la expresión proteica de mtAQP8, la cual permanece estable en el tiempo, la expresión de la AQP8 de membrana plasmática decae a partir de las 24 h de cultivo llegando a ser casi indetectable luego de 72 h, que es el tiempo de cultivo necesario para nuestros experimentos de knockdown (Soria y col., 2013). Por lo tanto el cultivo primario de hepatocitos es particularmente útil en estudios de mtAQP8.

Sin embargo, los hepatocitos transducidos con AdhAQP8 expresan una fracción de hAQP8 en membrana plasmática. Por ello, probamos una eventual contribución de proteínas NOX en la colesterogénesis aumentada por la sobre-expresión de hAQP8 utilizando el inhibidor general de NOX, apocynina (Reinehr y col., 2005). Observamos que la biosíntesis de colesterol, tanto basal como inducida por hAQP8, no fue alterada significativamente por la apocynina (datos no mostrados). Aunque deberían ser realizados más experimentos, este resultado sugiere que las proteínas NOX del hepatocito no juegan un rol crítico en la colesterogénesis inducida por hAQP8.

Por otro lado, la mtAQP8 hepática puede facilitar la captación mitocondrial del amoníaco y su metabolismo en urea (Soria y col., 2010, 2013 y 2014). Se ha sugerido que en hígado, la ureagénesis y el metabolismo lipídico juegan roles interactivos (Madiraju y col., 2016). Sin embargo, al presente, no hay estudios que relacionen la ureagénesis derivada del amoníaco con la síntesis del colesterol. Con el fin de obtener una idea del impacto del transporte de amoníaco mediado por mtAQP8 y su metabolización a urea en la biosíntesis de colesterol, se incubaron hepatocitos en presencia de amoníaco en concentraciones de conocida inducción de la ureagénesis (Soria y col., 2013). Bajo estas condiciones, la síntesis *de novo* de colesterol ya sea basal o inducida por la sobre-expresión de mtAQP8, no fueron alteradas significativamente (datos no mostrados). Estos datos, junto con el hecho de que en células con sobre-expresión de mtAQP8 el Mitotempo inhibió la liberación de H₂O₂ y la biosíntesis de colesterol pero no la ureagénesis derivada de amoníaco (datos no mostrados), sugieren que la mtAQP8 jugaría un rol en la biosíntesis de colesterol trabajando como peroxiporina y no como amoníacoporina.

Se ha demostrado que el H₂O₂ derivado de las mitocondrias puede activar los miembros de la familia MAP-Kinasa hepáticas mediante la inhibición de fosfatasas inactivadoras de MAPKs (Nemoto y col., 2000; Fang y col., 2004; Kamata y col., 2005; Pallottini y col., 2007; Hanawa y col., 2008). Por otro lado, los SREBP son blancos de las MAPKs y la fosforilación por MAPK de estos factores de transcripción conduce a un aumento en su actividad (Kotzka y col., 2000 y 2012). Así, podría ser posible la implicancia de una vía de señalización mtAQP8-H₂O₂-MAPK en la colesterogénesis controlada por SREBP. Se necesitan futuros estudios de señalización para esclarecer esta posible vía. En este sentido, resultados preliminares obtenidos durante esta Tesis mostraron que en

hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8 existiría activación por fosforilación al menos para las MAPKs ERK: $+65\pm 14\%$ (relación ERK fosforilada/ERK total) respecto del control; $n=2$ y JNK: $+156\pm 5\%$ (relación JNK fosforilada/JNK total) respecto del control; $n=2$.

Basado en nuestras observaciones, proponemos que cuando el colesterol celular del hepatocito disminuye; la consecuente activación de SREBP-2 conduce a la regulación en alza de la expresión de enzimas colesterogénicas clave (por ejemplo, HMGCR), como así también de la peroxiporina mtAQP8. La liberación mitocondrial de H_2O_2 facilitada por mtAQP8 promovería una retroalimentación positiva que induce la expresión de SREBP-2 y consecuentemente la síntesis de colesterol. Cuando el contenido de colesterol del hepatocito incrementa, la transcripción de genes de respuesta a SREBP-2 (es decir, enzimas colesterogénicas y mtAQP8) cesaría (Fig. 5.1).

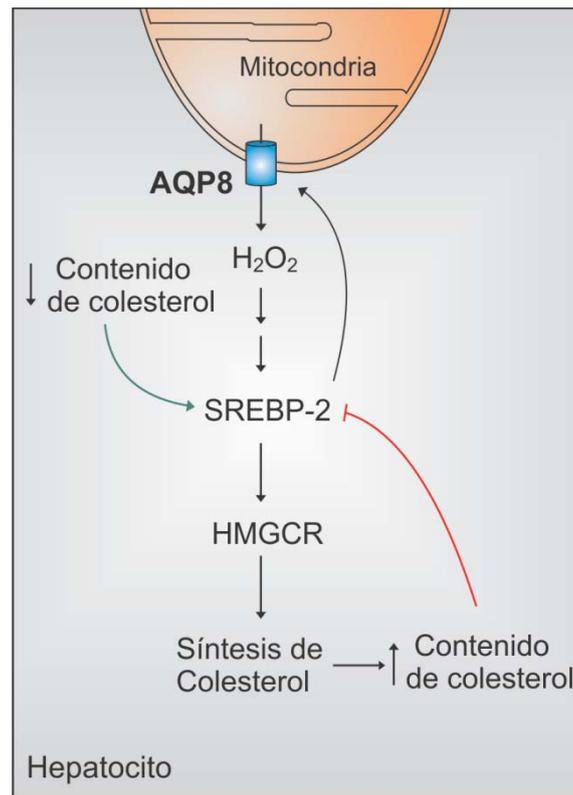


Figura 5.1. Mecanismo propuesto de interacción entre la peroxiporina mtAQP8 y la colesterogénesis controlada por SREBP-2 en hepatocitos.

6. Referencias Bibliográficas

- Abd-Eldaim, M. A., Okamatsu-Ogura, Y., Terao, A., & Kimura, K. (2010). Effects of retinoic acid and hydrogen peroxide on sterol regulatory element-binding protein-1a activation during adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *The Japanese Journal of Veterinary Research*. 58: 149-54.
- Agemark, M., Kowal, J., Kukulski, W., Nordén, K., Gustavsson, N., Johanson, U., Engel, A., y col. (2012). Reconstitution of water channel function and 2D-crystallization of human aquaporin 8. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1818: 839-850.
- Almasalmeh, A., Krenc, D., Wu, B., & Beitz, E. (2014). Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *FEBS Journal*. 28: 647-656.
- Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 31: 347-366.
- Beitz, E., Wu, B., Holm, L. M., Schultz, J. E., & Zeuthen, T. (2006). Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103: 269-274.
- Bernardino, R., Marinelli, R., Maggio, A., Gena, P., Cataldo, I., Alves, M., Svelto, M. y col. (2016). Hepatocyte and Sertoli Cell Aquaporins, Recent Advances and Research Trends. *International Journal of Molecular Sciences*. 17: 1096.
- Bertolotti, M., Bestetti, S., García-Manteiga, J. M., Medraño-Fernandez, I., Dal Mas, A., Malosio, M. L., & Sitia, R. (2013). Tyrosine kinase signal modulation: a matter of H₂O₂ membrane permeability? *Antioxidants & Redox Signaling*. 19: 1447-51.
- Bienert, G. P., & Chaumont, F. (2014). Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1840: 1596-04.
- Bienert, G. P., Møller, A. L. B., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 1183-1192.
- Brown, M. S., Radhakrishnan, A., & Goldstein, J. L. (2017). Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. *Annual Review of Biochemistry*. 87: 783-807.
- Calamita, G., Delporte, C., & Marinelli, R. (2016). Hepatobiliary, Salivary Glands and Pancreatic Aquaporins in Health and Disease. En *Aquaporins in Health and Disease* (pp. 181-203). CRC Press.
- Calamita, G., Ferri, D., Bazzini, C., Mazzone, A., Bottà, G., Liquori, G. E., Paulmichl,

- M., y col. (2005 a). Expression and subcellular localization of the AQP8 and AQP1 water channels in the mouse gall-bladder epithelium. *Biology of the Cell*. 97: 415-423.
- Calamita, G., Ferri, D., Gena, P., Liquori, G. E., Cavalier, A., Thomas, D., & Svelto, M. (2005 b). The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 17149-53.
- Calamita, G., Gena, P., Ferri, D., Rosito, A., Rojek, A., Nielsen, S., Marinelli, R. A., y col. (2012). Biophysical assessment of aquaporin-9 as principal facilitative pathway in mouse liver import of glucogenetic glycerol. *Biology of the Cell*. 104: 342-351.
- Calamita, G., Gena, P., Meleleo, D., Ferri, D., & Svelto, M. (2006). Water permeability of rat liver mitochondria: A biophysical study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1758: 1018-24.
- Calamita, G., Mazzone, A., Bizzoca, A., Cavalier, A., Cassano, G., Thomas, D., & Svelto, M. (2001). Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract. *European Journal of Cell Biology*. 80: 711-719.
- Calamita, G., Moreno, M., Ferri, D., Silvestri, E., Roberti, P., Schiavo, L., Gena, P., y col. (2007). Triiodothyronine modulates the expression of aquaporin-8 in rat liver mitochondria. *Journal of Endocrinology*. 192: 111-120.
- Calamita, G., Spalluto, C., Mazzone, A., Rocchi, M., & Svelto, M. (1999). Cloning, structural organization and chromosomal localization of the mouse Aquaporin-8 water channel gene (Aqp8). *Cytogenetic and Genome Research*. 85: 237-241.
- Cao, Q., Mak, K. M., Ren, C., & Lieber, C. S. (2004). Leptin Stimulates Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Human Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 4292-04.
- Caperna, T. J., Shannon, A. E., Richards, M. P., Garrett, W. M., & Talbot, N. C. (2007). Identification and characterization of aquaporin-9 (AQP9) in porcine hepatic tissue and hepatocytes in monolayer culture. *Domestic Animal Endocrinology*. 32: 273-86.
- Carbrey, J. M., & Agre, P. (2009). Discovery of the Aquaporins and Development of the Field. En *Aquaporins* (pp. 3-28). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Carbrey, J. M., Gorelick-Feldman, D. A., Kozono, D., Praetorius, J., Nielsen, S., & Agre, P. (2003). Aquaglyceroporin AQP9: Solute permeation and metabolic control of expression in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 2945-50.
- Carreras, F., Gradilone, S. A., Mazzone, A., García, F., Huang, B. Q., Ochoa, J. E., Tietz, P. S., y col. (2003). Rat hepatocyte aquaporin-8 water channels are down-regulated in extrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 37, 1026-33.
- Carreras, F. I., Lehmann, G. L., Ferri, D., Tioni, M. F., Calamita, G., & Marinelli, R. A. (2007). Defective hepatocyte aquaporin-8 expression and reduced canalicular

- membrane water permeability in estrogen-induced cholestasis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 292: 905-912.
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59: 527-605.
- Chance, B., & Williams, G. R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*. 17: 65-134.
- Christian, A. E., Byun, H. S., Zhong, N., Wanunu, M., Marti, T., Fürer, A., Dierderich, F., y col. (1999). Comparison of the capacity of beta-cyclodextrin derivatives and cyclophanes to shuttle cholesterol between cells and serum lipoproteins. *Journal of Lipid Research*. 40: 1475-82.
- Christian, A. E., Haynes, M. P., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (1997). Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*. 38: 2264-72.
- Colombini, M. (2004). VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 256: 107-15.
- Dajani, S., Saripalli, A., & Sharma-Walia, N. (2018). Water transport proteins-aquaporins (AQPs) in cancer biology. *Oncotarget*. 9: 36392-05.
- Day, R. E., Kitchen, P., Owen, D. S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A. C., Bill, R. M., y col. (2014). Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840: 1492-06.
- Di Ciaula, A., & Portincasa, P. (2018). Recent advances in understanding and managing cholesterol gallstones. *F1000Research*. 7: 1529.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82: 47-95.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411: 494-498.
- Elkjær, M. L., Nejsum, L. N., Gresz, V., Kwon, T.-H., Jensen, U. B., Frøkiær, J., & Nielsen, S. (2001). Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 281: 1047-1057.
- Elkjær, M. L., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T. H., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frøkiær, J., y col. (2000). Immunolocalization of AQP9 in Liver, Epididymis, Testis, Spleen, and Brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276: 1118-28.
- Fang, Y., Han, S. I., Mitchell, C., Gupta, S., Studer, E., Grant, S., Hylemon, P. B., y col. (2004). Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology*. 40: 961-71.

- Ferri, D., Mazzone, A., Liquori, G. E., Cassano, G., Svelto, M., & Calamita, G. (2003). Ontogeny, distribution, and possible functional implications of an unusual aquaporin, AQP8, in mouse liver. *Hepatology*. 38: 947-957.
- Finkel, T. (2012). Signal transduction by mitochondrial oxidants. *The Journal of Biological Chemistry*. 287: 4434-40.
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. 47: 412-26.
- Fu, D., & Lu, M. (2007). The structural basis of water permeation and proton exclusion in aquaporins (Review). *Molecular Membrane Biology*. 24: 366-374.
- García F., Kierbel, A., Larocca, M. C., Gradilone, S. A., Splinter, P., LaRusso, N. F., & Marinelli, R. A. (2001). The Water Channel Aquaporin-8 Is Mainly Intracellular in Rat Hepatocytes, and Its Plasma Membrane Insertion Is Stimulated by Cyclic AMP. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 12147-52.
- Gena, P., Fanelli, E., Brenner, C., Svelto, M., & Calamita, G. (2009). News and views on mitochondrial water transport. *Frontiers in Bioscience*. 14: 4189-98.
- Gerbeau, P., Güçlü, J., Ripoché, P., & Maurel, C. (1999). Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*. 18: 577-87.
- Giudetti, A. M., Damiano, F., Gnoni, G. V., & Siculella, L. (2013). Low level of hydrogen peroxide induces lipid synthesis in BRL-3A cells through a CAP-independent SREBP-1a activation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 45: 1419-26.
- Giudetti, A. M., Leo, M., Geelen, M. J. H., & Gnoni, G. V. (2005). Short-term stimulation of lipogenesis by 3,5-L-diiodothyronine in cultured rat hepatocytes. *Endocrinology*. 146: 3959-66.
- Goldstein, B. J., Mahadev, K., Wu, X., Zhu, L., & Motoshima, H. (2005). Role of Insulin-Induced Reactive Oxygen Species in the Insulin Signaling Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7: 1021-31.
- Gonen, T., & Walz, T. (2006). The structure of aquaporins. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 39: 361.
- Gorelick, D. A., Praetorius, J., Tsunenari, T., Nielsen, S., & Agre, P. (2006). Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochemistry*. 7: 14.
- Gradilone, S. A., Tietz, P. S., Splinter, P. L., Marinelli, R. A., & LaRusso, N. F. (2005). Expression and subcellular localization of aquaporin water channels in the polarized hepatocyte cell line, WIF-B. *BMC Physiology*. 5: 13.
- Gradilone, S., García, F., Huebert, R. C., Tietz, P. S., Larocca, M. C., Kierbel, A., Carreras, F. L., y col. (2003). Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rat hepatocytes. *Hepatology*. 37: 1435-41.

- Gregoire, F., Lucidi, V., Zerrad-Saadi, A., Virreira, M., Bolaky, N., Delforge, V., Lemmers, A., y col. (2015). Analysis of aquaporin expression in liver with a focus on hepatocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 144, 347-363.
- Guzy, R. D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N. S., & Schumacker, P. T. (2008). Loss of the SdhB, but Not the SdhA, Subunit of Complex II Triggers Reactive Oxygen Species-Dependent Hypoxia-Inducible Factor Activation and Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 28: 718-731.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*. 186: 1-85.
- Han, D., Antunes, F., Canali, R., Rettori, D., & Cadenas, E. (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 5557-63.
- Han, J., Hajjar, D. P., Tauras, J. M., & Nicholson, A. C. (1999). Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *Journal of Lipid Research*: 40: 830-8.
- Hanawa, N., Shinohara, M., Saberi, B., Gaarde, W. A., Han, D., & Kaplowitz, N. (2008). Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *The Journal of Biological Chemistry*. 283: 13565-77.
- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 12027-32.
- Huebert, R. C., Splinter, P. L., Garcia, F., Marinelli, R. A., & LaRusso, N. F. (2002). Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *The Journal of Biological Chemistry*: 277, 22710-17.
- Ishibashi, K., Tanaka, Y., & Morishita, Y. (2014). The role of mammalian supraaquaporins inside the cell. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1840: 1507-1512.
- Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P. S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, Yanase, S., y col. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*. 394: 694-697.
- Jahn, T. P., Møller, A. L. B., Zeuthen, T., Holm, L. M., Klaerke, D. A., Mohsin, B., Kühlbrandt, W., y col. (2004). Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Letters*. 574: 31-36.
- Jezek, P., & Hlavatá, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 2478-503.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., & Karin, M. (2005). Reactive Oxygen Species Promote TNF α -Induced Death and Sustained JNK Activation by

- Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell*. 120: 649-661.
- King, L. S., & Agre, P. (1996). Pathophysiology of the Aquaporin Water Channels. *Annual Review of Physiology*. 58: 619-648.
- King, L. S., Kozono, D., & Agre, P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5: 687-698.
- Kotzka, J., Knebel, B., Haas, J., Kremer, L., Jacob, S., Hartwig, S., Nitzgen, U., y col. (2012). Preventing Phosphorylation of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1a by MAP-Kinases Protects Mice from Fatty Liver and Visceral Obesity. *PLoS ONE*. 7: e32609.
- Kotzka, J., Müller-Wieland, D., Roth, G., Kremer, L., Munck, M., Schürmann, S., Knebel, B., y col. (2000). Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *Journal of Lipid Research*. 41: 99-108.
- Koyama, N., Ishibashi, K., Kuwahara, M., Inase, N., Ichioka, M., Sasaki, S., & Marumo, F. (1998). Cloning and Functional Expression of Human Aquaporin8 cDNA and Analysis of Its Gene. *Genomics*. 54: 169-172.
- Krebs, H. A., & Henseleit, K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Klinische Wochenschrift*. 11: 757-759.
- Kuriyama, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kondo, H., Furuyama, N., Nishizawa, Maeda, M., y col. (2002). Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*. 51: 2915-21.
- Larocca, M. C., Soria, L. R., Espelt, M. V., Lehmann, G. L., & Marinelli, R. A. (2009). Knockdown of hepatocyte aquaporin-8 by RNA interference induces defective bile canalicular water transport. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 296, 93-100.
- Leloup, C., Casteilla, L., Carrière, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., & Pénicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 14: 519-30.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., & Rosen, B. P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 6053-58.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L., & von Wirén, N. (2005). Tonoplast Intrinsic Proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 Facilitate NH₃ Transport into the Vacuole. *Plant Physiology*. 137: 671-680.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-75.
- Madiraju, A. K., Alves, T., Zhao, X., Cline, G. W., Zhang, D., Bhanot, S., Samuel, V. T., y col. (2016). Argininosuccinate synthetase regulates hepatic AMPK linking protein catabolism and ureagenesis to hepatic lipid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113: 3423-30.

- Maeda, N. (2012). Implications of aquaglyceroporins 7 and 9 in glycerol metabolism and metabolic syndrome. *Molecular Aspects of Medicine*. 33: 665-675.
- Maeda, N., Hibuse, T., & Funahashi, T. (2009). Role of Aquaporin-7 and Aquaporin-9 in Glycerol Metabolism; Involvement in Obesity. En *Aquaporins* (p. 233-249). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Marchissio, M. J., Francés, D. E. A., Carnovale, C. E., & Marinelli, R. A. (2012). Mitochondrial aquaporin-8 knockdown in human hepatoma HepG2 cells causes ROS-induced mitochondrial depolarization and loss of viability. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 264: 246-54.
- Marchissio, M. J., Francés, D. E. A., Carnovale, C. E., & Marinelli, R. A. (2014). Evidence for necrosis, but not apoptosis, in human hepatoma cells with knockdown of mitochondrial aquaporin-8. *Apoptosis : an International Journal on Programmed Cell Death*. 19: 851-9.
- Marinelli, R. A., Lehmann, G. L., Soria, L. R., & Marchissio, M. J. (2011). Hepatocyte aquaporins in bile formation and cholestasis. *Frontiers in Bioscience*. 16: 2642-52.
- Marrone, J., Danielli, M., Gaspari, C. I., & Marinelli, R. A. (2017). Adenovirus-mediated human aquaporin-1 expression in hepatocytes improves lipopolysaccharide-induced cholestasis. *IUBMB Life*, 69: 978-984.
- Marrone, J., Soria, L. R., Danielli, M., Lehmann, G. L., Larocca, M. C., & Marinelli, R. A. (2016). Hepatic gene transfer of human aquaporin-1 improves bile salt secretory failure in rats with estrogen-induced cholestasis. *Hepatology*. 21: 1058-64.
- Martínez, N., & Damiano, A. E. (2017). Aquaporins in Fetal Development. *Advances in Experimental Medicine And Biology*. 969: 199-212.
- Maxwell, K. N., Soccio, R. E., Duncan, E. M., Sehayek, E., & Breslow, J. L. (2003). Novel putative SREBP and LXR target genes identified by microarray analysis in liver of cholesterol-fed mice. *Journal of Lipid Research*. 44: 2109-19.
- Mazzone, A., Tietz, P., Jefferson, J., Pagano, R., & LaRusso, N. F. (2006). Isolation and characterization of lipid microdomains from apical and basolateral plasma membranes of rat hepatocytes. *Hepatology*, 43: 287-296.
- Mei, S., Gu, H., Yang, X., Guo, H., Liu, Z., & Cao, W. (2012). Prolonged Exposure to Insulin Induces Mitochondrion-Derived Oxidative Stress through Increasing Mitochondrial Cholesterol Content in Hepatocytes. *Endocrinology*. 153: 2120-29.
- Miller, E. W., Dickinson, B. C., & Chang, C. J. (2010). Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107: 15681-86.
- Miwa, S., & Brand, M. D. (2003). Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling. *Biochemical Society Transactions*. 31, 1300-1.
- Morishita, Y., Matsuzaki, T., Hara-chikuma, M., Andoo, A., Shimono, M., Matsuki, A., Kobayashi, K., y col. (2005). Disruption of Aquaporin-11 Produces Polycystic Kidneys following Vacuolization of the Proximal Tubule. *Molecular and Cellular*

- Biology*. 25: 7770-79.
- Mulders, S. M., Preston, G. M., Deen, P. M., Guggino, W. B., van Os, C. H., & Agre, P. (1995). Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 9010-16.
- Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 49064-73.
- Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., & Finkel, T. (2000). Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Molecular and Cellular Biology*. 20: 7311-8.
- Nicchia, G. P., Frigeri, A., Nico, B., Ribatti, D., & Svelto, M. (2001). Tissue Distribution and Membrane Localization of Aquaporin-9 Water Channel. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 49: 1547-56.
- Padma, S., Smeltz, A. M., Banks, P. M., Iannitti, D. A., & McKillop, I. H. (2009). Altered aquaporin 9 expression and localization in human hepatocellular carcinoma. *The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 11: 66-74.
- Pallottini, V., Martini, C., Cavallini, G., Bergamini, E., Mustard, K. J., Hardie, D. G., & Trentalance, A. (2007). Age-related HMG-CoA reductase deregulation depends on ROS-induced p38 activation. *Mechanisms of Ageing and Development*. 128: 688-95.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 447: 689-709.
- Pomytkin, I. A. (2012). H₂O₂ Signalling Pathway: A Possible Bridge between Insulin Receptor and Mitochondria. *Current Neuropharmacology*. 10: 311-20.
- Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., & Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*. 256: 385-7.
- Reinehr, R., Becker, S., Eberle, A., Grether-Beck, S., & Häussinger, D. (2005). Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 280: 27179-94.
- Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2019
- Rich, P. R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*. 31: 1095-5.
- Rigoulet, M., Yoboue, E. D., & Devin, A. (2011). Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 14: 459-468.

- Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., García-Navarro, S., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., y col. (2011). Insulin- and Leptin-Mediated Control of Aquaglyceroporins in Human Adipocytes and Hepatocytes Is Mediated via the PI3K/Akt/mTOR Signaling Cascade. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 96: 586-597.
- Rodríguez, A., Gena, P., Méndez-Giménez, L., Rosito, A., Valentí, V., Rotellar, F., Sola, I., y col. (2014). Reduced hepatic aquaporin-9 and glycerol permeability are related to insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Obesity*. 38: 1213-20.
- Rojek, A., Füchtbauer, E.M., Füchtbauer, A., Jelen, S., Malmendal, A., Fenton, R. A., & Nielsen, S. (2013). Liver-specific Aquaporin 11 knockout mice show rapid vacuolization of the rough endoplasmic reticulum in periportal hepatocytes after amino acid feeding. *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 304: 501-515.
- Rojek, A. M., Skowronski, M. T., Fuchtbauer, E. M., Fuchtbauer, A. C., Fenton, R. A., Agre, P., Frøkiaer, J., y col. (2007). Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 3609-14.
- Santiago, A. P., Chaves, E. A., Oliveira, M. F., & Galina, A. (2008). Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie*. 90: 1566-77.
- Saparov, S. M., Liu, K., Agre, P., & Pohl, P. (2007). Fast and Selective Ammonia Transport by Aquaporin-8. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 5296-01.
- Sekiya, M., Hiraishi, A., Touyama, M., & Sakamoto, K. (2008). Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 375: 602-607.
- Seo, K., & Shin, S. M. (2017). Induction of Lipin1 by ROS-Dependent SREBP-2 Activation. *Toxicological Research*. 33: 219-224.
- Shinkai, Y., Sumi, D., Toyama, T., Kaji, T., & Kumagai, Y. (2009). Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 237: 232-6.
- Sies, H. (2014). Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 289: 8735-41.
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*. 11: 613-619.
- Siess, E. A., & Wieland, O. H. (1984). Decrease by glucagon in peroxide generation by isolated hepatocytes. *FEBS letters*. 177: 6-10.
- Soria, L. R., Fanelli, E., Altamura, N., Svelto, M., Marinelli, R. A., & Calamita, G. (2010). Aquaporin-8-facilitated mitochondrial ammonia transport. *Biochemical and biophysical research communications*. 393: 217-21.
- Soria, L. R., Marrone, J., Calamita, G., & Marinelli, R. A. (2013). Ammonia

- detoxification via ureagenesis in rat hepatocytes involves mitochondrial aquaporin-8 channels. *Hepatology*. 57: 2061-71.
- Soria, L. R., Marrone, J., Molinas, S. M., Lehmann, G. L., Calamita, G., & Marinelli, R. A. (2014). Lipopolysaccharide impairs hepatocyte ureagenesis from ammonia: involvement of mitochondrial aquaporin-8. *FEBS letters*. 588: 1686-91.
- Soyfoo, M., Chivasso, C., Perret, J., & Delporte, C. (2018). Involvement of Aquaporins in the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 19: 3392.
- Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., & Jap, B. K. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*. 414: 872-878.
- Szpilbarg, N., Martínez, N. A., Di Paola, M., Reppetti, J., Medina, Y., Seyahian, A., Castr Parodi, M., y col. (2018). New Insights Into the Role of Placental Aquaporins and the Pathogenesis of Preeclampsia. *Frontiers in Physiology*. 9: 1507.
- Talbot, N. C., Garrett, W. M., & Caperna, T. J. (2003). Analysis of the expression of aquaporin-1 and aquaporin-9 in pig liver tissue: comparison with rat liver tissue. *Cells, Tissues, Organs*. 174: 117-28.
- Tietz, P., Jefferson, J., Pagano, R., & LaRusso, N. F. (2005). Membrane microdomains in hepatocytes: potential target areas for proteins involved in canalicular bile secretion. *Journal of Lipid Research*. 46: 1426-32.
- Trnka, J., Blaikie, F. H., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2008). A mitochondria-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 44: 1406-19.
- Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U. V, Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W. B., Van Hoek, A. N., y col. (1998). Molecular characterization of a broad selectivity neutral solute channel. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 24737-43.
- Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C., & Hediger, M. A. (1999). Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *The American Journal Of Physiology*. 277: 685-96.
- Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, 26, 1-14.
- Vergnes, L., Phan, J., Strauss, M., Tafuri, S., & Reue, K. (2003). Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 42774-84.
- Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*. 43: 95-118.
- Watanabe, S., Moniaga, C. S., Nielsen, S., & Hara-Chikuma, M. (2016). Aquaporin-9 facilitates membrane transport of hydrogen peroxide in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 471: 191-197.

- Williams, E. G., Wu, Y., Jha, P., Dubuis, S., Blattmann, P., Argmann, C. A., Houten, S. M., y col. (2016). Systems proteomics of liver mitochondria function. *Science*. 352: 189-189.
- Woudenberg, J., Rembacz, K. P., Hoekstra, M., Pellicoro, A., van den Heuvel, F. A. J., Heegsma, J., Van Ijzendoorn, S. C., y col. (2010). Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis in HepG2 cells. *Hepatology*. 52: 623-633.
- Yakata, K., Hiroaki, Y., Ishibashi, K., Sohara, E., Sasaki, S., Mitsuoka, K., & Fujiyoshi, Y. (2007). Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1768: 688-693.
- Yang, B., Zhao, D., Solenov, E., & Verkman, A. S. (2006). Evidence from knockout mice against physiologically significant aquaporin 8-facilitated ammonia transport. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 291: 417-423.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., y col. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*. 299: 700-4.
- Ye, J., & DeBose-Boyd, R. A. (2011). Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3: 4754.
- Zardoya, R., & Villalba, S. (2001). A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*. 52: 391-404.
- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., y col. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature*. 392: 677-684.

INDICE DE FIGURAS

1.1.	Expresión de AQPs en humanos	2
1.2.	Topología, organización y funcionamiento de las aquaporinas	4
1.3.	Sitios productores de $O_2^{\cdot-}$ y de su dismutación a H_2O_2 en la cadena de respiración mitocondrial	17
1.4.	Ruta de los SREBPs	21
3.1.	Diagrama de la estructura de la m β CD	26
3.2.	Secuencia de reacciones para la determinación del colesterol	27
3.3.	Reacción utilizada para la determinación de la liberación celular de LDH al medio de cultivo	28
3.4.	Diagrama de la estructura del adenovector AdhAQP8	34
4.1.	Expresión de mtAQP8 en hepatocitos con sobrecarga de colesterol	39
4.2.	Inmunofluorescencia confocal de mtAQP8 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol	40
4.3.	Expresión del ARN mensajero (mARN) de la mtAQP8 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol	41
4.4.	Expresión del factor nuclear SREBP-2 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol	41
4.5.	Expresión de mtAQP8 en hepatocitos con depleción de colesterol	42
4.6.	Inmunofluorescencia confocal de mtAQP8 en células Huh-7 con sobrecarga de colesterol	43

4.7.	Expresión del mensajero de la mtAQP8 en células Huh-7 depletadas de colesterol	44
4.8.	Expresión del factor nuclear SREBP-2 en células Huh-7 depletadas de colesterol	44
4.9.	Knockdown de mtAQP8 en células Huh-7	46
4.10.	Efecto del knockdown de mtAQP8 en la biosíntesis de colesterol en células Huh-7	46
4.11.	Efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la liberación al medio de la enzima LDH en células Huh-7	47
4.12.	Efecto del knockdown de mtAQP8 en la expresión proteica de HMGCR y SREBP-2	48
4.13.	Knockdown de mtAQP8 en hepatocitos de rata en cultivo primario	48
4.14.	Efecto del knockdown de mtAQP8 en la biosíntesis de colesterol en hepatocitos de rata	49
4.15.	Efecto del knockdown de mtAQP8 sobre la liberación al medio de la enzima LDH en hepatocitos de rata	49
4.16.	Sobre-expresión de mtAQP8 en cultivo primario de hepatocitos de rata	50
4.17.	Efecto de la sobre-expresión de mtAQP8 en la biosíntesis de colesterol	51
4.18.	Efecto de la sobre-expresión de mtAQP8 en la expresión proteica de HMGCR y SREBP-2	51
4.19.	Liberación de H ₂ O ₂ en mitocondrias aisladas de hepatocitos con knockdown de AQP8	53
4.20.	Liberación de H ₂ O ₂ en mitocondrias aisladas de hepatocitos con sobre-expresión de AQP8	53
4.21.	Efecto del Mitotempo sobre la liberación de H ₂ O ₂ mitocondrial de hepatocitos con sobre-expresión de AQP8	54
4.22.	Sobre-expresión de mtAQP8 en hepatocitos tratados con Mitotempo	55

4.23.	Efecto del Mitotempo sobre la biosíntesis de colesterol en hepatocitos con sobre-expresión de mtAQP8	56
5.1.	Mecanismo propuesto de interacción entre la peroxiporina mtAQP8 y la colesterogénesis controlada por SREBP-2 en hepatocitos	63

INDICE DE TABLAS

1.1.	Aquaporinas (AQPs) transportadoras de H ₂ O ₂	5
1.2.	Localización y permeabilidad de las AQPs del hepatocito	6

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar un profundo agradecimiento a todas las personas que me acompañaron e hicieron posible la realización de esta Tesis:

A Raúl por compartir siempre generosamente toda la experiencia y conocimiento que ganó trabajando con mucha pasión y esmero.

Al grupo: Cesar y Alejo, que me aguantaron en el desorden (en especial Alejito) siempre con una sonrisa. A Julieta, que me hizo sentir en grupo desde el principio y me enseñó a trabajar en equipo con toda su energía, siempre para adelante. A Leandro, que a pesar de haber compartido poco tiempo en el grupo me enseñó cosas que me sirvieron durante todos estos años.

A todo el IFISE por ser un lugar especial a nivel humano. Con mucho afecto y compañerismo. En especial a las personas con quien me tocó compartir más: Guille, Flavia, Gisel, Nanu y Romi. A Dani por su humildad, buena onda y disposición a las charlas. A Agus por traernos siempre de manera amorosa esa cuota de realidad que se suele perder en el mundo de la ciencia.

A Diego y Vero por su asistencia en la preparación de hepatocitos aislados y en el mantenimiento de líneas celulares respectivamente.

Agradezco al CONICET y la ANPCyT por las becas otorgadas que me permitieron llevar a cabo el trabajo de Tesis.

Finalmente quiero agradecer a mi familia que me acompañó y ayudó con mucho afecto durante toda mi formación.