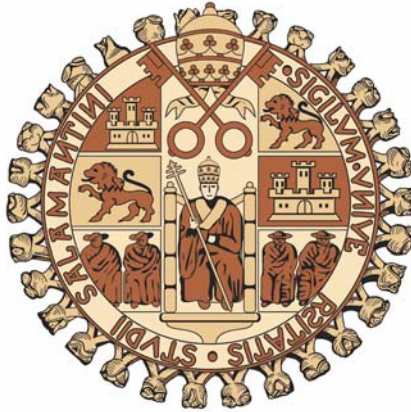


FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PAPEL DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE
ANIONES ORGÁNICOS EN LA CAPTACIÓN DE
SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES POR LAS
CÉLULAS HEPÁTICAS: IMPLICACIONES
FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS

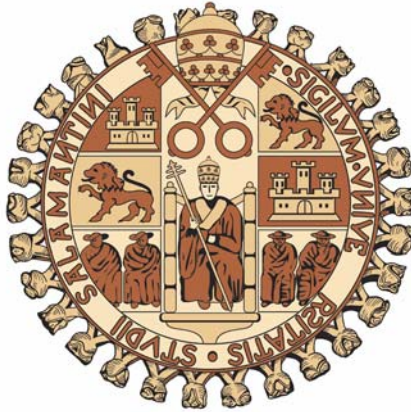
TESIS DOCTORAL

CARLOS HIERRO DELGADO

2009

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

PAPEL DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ANIONES ORGÁNICOS EN LA CAPTACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES POR LAS CÉLULAS HEPÁTICAS: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS

Memoria que presenta **D. Carlos Hierro Delgado**
para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 31 de julio de 2009

D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la Memoria titulada " PAPEL DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ANIONES ORGÁNICOS EN LA CAPTACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES POR LAS CÉLULAS HEPÁTICAS: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS " presentada por D. Carlos Hierro Delgado para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los Dres. D. José Juan García Marín y Dña. Rocío I. Rodríguez Macías en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a 27 de julio de dos mil nueve.

Fdo.: Rafael Jiménez Fernández

D. JOSÉ JUAN GARCÍA MARÍN, CATEDRÁTICO, Y D^a. ROCÍO I. RODRÍGUEZ MACÍAS, PROFESORA TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA, DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que la Memoria titulada " PAPEL DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ANIONES ORGÁNICOS EN LA CAPTACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES POR LAS CÉLULAS HEPÁTICAS: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS " presentada por D. Carlos Hierro Delgado para optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección conjunta en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca a 27 de julio de dos mil nueve.

Fdo.: José Juan García Marín

Fdo.: Rocío I. Rodríguez Macías

Este trabajo ha sido financiado en parte con cargo a los siguientes proyectos:

Dirección General Investigación, MEC, BFU2005-24983-E/BFI y BFU2007-30688-E/BFI. "Red Española de Investigación sobre proteínas Transportadoras de membrana y sus implicaciones fisiológicas, fisiopatológicas y farmacológicas" (REIT).

Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo: 2005-2008.

Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León SA021B06. "Relación entre bajos niveles hepáticos de vitamina C y el aumento del riesgo de desarrollo de cirrosis".

Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2006-2007.

Instituto de Salud Carlos III (FIS). PI051547. "Heterogeneidad celular hepática en los sistemas de defensa antioxidante. Implicaciones fisiopatológicas"

Investigador principal: M^a José Pérez García. Periodo 2006-2008.

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. III Convocatoria. "Patologías hepáticas y estrés oxidativo: heterogeneidad tisular de diferentes sistemas antioxidantes"

Investigador principal: M^a José Pérez García. Periodo 2006-2009.

Ministerio de Ciencia e Innovación. BFU2006-12577/BFI. "Papel de transportadores de membrana de las familias OATP y ABC en los mecanismos hepáticos de defensa frente a la toxicidad de sustancias endógenas y xenobióticas"

Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo: 2007-2009.

Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León. SAN673SA07/08. "Puesta a punto de un método diagnóstico para la detección precoz de colangiocarcinoma en grupos de riesgo".

Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2008.

Consejería de Educación y Cultura de la Junta de Castilla y León SA033A08. "Papel del receptor de membrana de ácidos biliares TGR5 en la placenta".

Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2008-2009.

Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León. GR75/2008. "Resistencia a la terapia farmacológica en el tratamiento del cáncer hepático y digestivo. Investigación de los mecanismos implicados y desarrollo de un método predictivo".

Investigador principal: José Juan García Marín. Periodo: 2008-2010.

Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña. VI Convocatoria. "Investigación de nuevas dianas moleculares para la detección y la quimioterapia del colangiocarcinoma".

Investigador principal: Rocío I. Rodríguez Macías. Periodo: 2009-2012.

Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd). Instituto de Salud Carlos III.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral han sido publicados como artículos:

Marin JJ et al. In: VITAMIN C IN HEALTH AND DISEASE. Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY. 2009 (en prensa)

Y en forma de abstracts:

Vaquero J et al. Congreso de la Sociedad Española de Aparato Digestivo (SEAD) Sitges, 2008.

Macias et al. XXXI Reunión de la Asociación Castellana de Aparato Digestivo (ACAD), León, 2008

Macias et al. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM), Bilbao, 2008.

Herraez E et al. XXXIV Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), Madrid. Gastroenterología y Hepatología 32: 147 (2009).

Vaquero J et al. 44th Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Copenhagen (Dinamarca). J Hepatology 50 (supl 1) S252 (2009).

Macias et al. 60th Meeting American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston (USA). Hepatology (en prensa).

AGRADECIMIENTOS:

Este Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas, por lo que deseo expresar mi agradecimiento:

Al Dr. D. José Juan García Marín, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo; por su ayuda, por compartir su conocimiento, su enorme respaldo y su consejo siempre que lo he necesitado.

A la Dra. Dña. Rocío I. Rodríguez Macías por la dirección y supervisión de esta Tesis; por enseñarme y aconsejarme con infinita paciencia y amabilidad, por tener siempre unas palabras de ánimo en los momentos difíciles y por todo su trabajo y tiempo que me ha dedicado.

A la Dra. Dña. M^a Ángeles Serrano García, por estar siempre dispuesta a escuchar y contestar mis preguntas y dirigirme palabras de ánimo y apoyo.

A la Dra. Dña. M^a Jesús Monte Río, por su gran ayuda en la realización del modelo de colestasis crónica y por su simpatía, buen humor y consejo siempre que lo he necesitado.

A los Dres. D. Óscar Briz y Dña. María José Pérez por su amabilidad, compañerismo y ayuda en la multitud de dudas que me surgían.

A la Dra. Dña. Susana Cuesta por recomendarme el Departamento para realizar este Trabajo, por su colaboración en los estudios de ontogenia y su alegría y amistad.

A Elisa Herráez por estar ahí siempre que he necesitado ayuda y ánimo, por enseñarme infinidad de cosas siempre con una sonrisa, por su ayuda en algunas determinaciones analíticas y por nuestras “charlas”, buenos ratos y amistad.

A Elisa Lozano por su ayuda en la realización de algunas determinaciones analíticas.

Al resto de compañeros del departamento: Alba, Marta Vicéns, Bea, Silvia, Pablo, Javi, Mariona, Ester, por estar siempre dispuestos a ayudar, por sus buenos consejos, simpatía y amistad.

A Emma por la organización y orden de los laboratorios.

A María Isabel Hernández Rodríguez, por su excelente trabajo como secretaria.

A Itziar, Belén, David, Juana, Virginia, y resto de compañeros del Hospital Universitario de Salamanca, por estar siempre a mi lado y hacerme reír. Por su amistad.

A mis padres y hermana, por ser siempre una fuente de apoyo y energía.

A Isabel que sin su amor, continuo apoyo y ánimo para seguir trabajando y esforzándome cada día esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA:	Ácido ascórbico
ABC:	“ATP Binding Cassette”
Ac:	Anticuerpo
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
AP:	Fosfatasa alcalina
ALT:	Alanina aminotransferasa
AST:	Aspartato aminotransferasa
ATP:	Adenosín trifosfato
BSA:	Albúmina sérica bovina
Bcl2:	“B-cell lymphoma 2”
BCRP:	“Breast Cancer Resistance Protein”
BSEP:	“Bile Salt Export Pump”
Bvra:	Biliverdina reductasa α
CA:	Ácido cólico
cDNA:	DNA complementario
CFCS:	Celulas estrelladas inmortalizadas
CK-7:	Citoqueratina 7
Ct:	Ciclo umbral
CYPs:	Superfamilia del citocromo P450
DCA:	Ácido desoxicólico
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DHA:	Ácido deshidroascórbico
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dsDNA:	DNA doble cadena
ECL:	“Enhanced ChemioLuminiscence”
EEM:	Error estándar de la media
EHA:	Esteatohepatitis alcohólica
EHNA:	Esteatohepatitis no alcohólica
FXR:	“Farnesoid X Receptor”
GAPDH:	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GGT:	γ -glutamil transferasa
GLUT:	Transportador de glucosa
GSH:	Glutación reducido
GST:	Glutación-S-Transferasa
H-BABP:	“Hepatic Bile Acid Binding Protein”
Hepes:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
HepG2:	Células de hepatoblastoma humano
HH:	Hemocromatosis hereditaria
HNE:	4-Hidroxinonenal
HPRT:	Hipoxantina fosforribosiltransferasa
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleukina
i.p.:	Intraperitoneal
JAr:	Células de coriocarcinoma humano
Kb:	Kilobase
KDa:	Kilodalton

Km:	Constante de Michaelis
LCA:	Ácido litocólico
LDL:	Lipoproteína de baja densidad
mA:	Miliamperio
MDA:	Malonildialdehido
MDR:	Resistencia a múltiples drogas
MOPS:	3N-morfolino propano sulfónico
mRNA:	RNA mensajero
MRP:	Proteína asociada a resistencia a múltiples drogas
NAD:	Nicotín adenín dinucleótido
NADH:	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP:	Nicotín adenín dinucleótido fosfato
NADPH:	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
NTCP:	Polipeptido de cotransporte de taurocolato-Na ⁺
OATP:	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
ORFs:	“Open Reading Frames”
PAGE:	Electroforesis en gel de agarosa
pb:	Pares de bases
PBC:	Cirrosis biliar primaria
PBS:	Tampón fosfato salino
p.c.:	Peso corporal
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA:	Proteín Kinasa A
PKC:	Proteína Kinasa C
Pm:	Peso molecular
QDCA:	Ácido quenodesoxicólico
RIPA:	“Radio immunoprecipitation assay”
RNA:	Ácido ribonucleico
RNAse:	Ribonucleasa
rRNA:	RNA ribosómico
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RT:	Transcripción reversa
SDS:	Dodecil sulfato sódico
SHP:	“Small Heterodimer Partner”
SOD:	Superóxido dismutasa
SVCT:	Transportador de Vitamina C dependiente de sodio
TAE:	Tampón Tris-Ácido acético-EDTA
TCA:	Ácido taurocólico
Tm:	Temperatura de desnaturalización
TNF:	“Tumor Necrosis Factor”
T-PBS:	PBS con Triton X-100
Tris:	Trishidroximetilaminometano
UAF:	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UDCA:	Ácido ursodesoxicólico
VIH:	Virus de inmunodeficiencia humana
VLDL:	Lipoproteín de muy baja densidad
α-SMA :	Alfa actina de músculo liso

Notas aclaratorias:

En lo referente a la nomenclatura de las proteínas y sus genes, se utilizará el nombre en mayúsculas cuando se refiera a la proteína o a su gen en humanos, y en minúsculas cuando sea de otras especies animales. Por otra parte, cuando se haga referencia al gen, éste siempre aparecerá en cursiva.

Respecto a las OATPs se utilizará la nomenclatura antigua para facilitar la lectura de la Tesis Doctoral en vez de la nueva que se menciona en la introducción.

1. OBJETIVO	3
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR	7
2.2. CÉLULAS HEPÁTICAS	8
2.2.1. Hepatocitos	8
2.2.2. Células ductulares o colangiocitos	9
2.2.3. Células endoteliales	10
2.2.4. Células de Kupffer	11
2.2.5. Células estrelladas	11
2.2.6. Células de stem	12
2.3. ÁCIDOS BILIARES	13
2.3.1. Biosíntesis de ácidos biliares	14
2.3.2. Transporte hepático de los ácidos biliares	14
2.3.3. Papel fisiológico de los ácidos biliares	16
2.4. ESTRÉS OXIDATIVO	19
2.5. COLESTASIS	21
2.6. COLESTASIS Y ESTRÉS OXIDATIVO	23
2.7. SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C	24
2.7.1. Funciones biológicas de la vitamina C	24
2.7.2. Transporte de vitamina C	25
2.7.2.1. Difusión simple de AA y DHA	25
2.7.2.2. Transporte de DHA	25
2.7.2.3. Transporte de AA	26
2.7.3. Familia de transportadores de vitamina C dependientes de sodio: SVCTs	27
2.7.3.1. Estructura génica	27
2.7.3.2. Estructura de proteínas	27
2.7.3.3. Características funcionales	28
2.7.3.4. Variantes no funcionales	28
2.7.3.5. Ontogenia y género	29
2.7.3.6. Distribución tisular y papel fisiológico	29
2.7.3.7. Alteraciones de los niveles de vitamina C en patologías	32

3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	43
3.1.1. Animales	43
3.1.2. Muestras humanas	43
3.1.3. Líneas celulares	43
3.2. PRODUCTOS	44
3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES	46
3.4. MODELOS EXPERIMENTALES	48
3.4.1. Estudio ontogénico	48
3.4.2. Modelos de colestasis	48
3.4.3. Modelo de diabetes	48
3.4.4. Modelo de esteatosis	49
3.5. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS DE RATA	50
3.6. CULTIVO DE CÉLULAS CAN-10	52
3.7. EXPRESIÓN DE mRNA POR RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	53
3.7.1. Aislamiento de RNA total	53
3.7.2. Valoración del RNA y coprobación de su integridad	53
3.7.3. Transcripción reversa (RT)	54
3.7.4. PCR cuantitativa a tiempo real	54
3.7.4.1. Fundamento	54
3.7.4.2. Diseño de <i>primers</i> de la PCR cuantitativa a tiempo real	56
3.7.4.3. Realización de la PCR cuantitativa a tiempo real	56
3.7.4.4. Especificidad de la PCR cuantitativa a tiempo real	57
3.7.4.5. Cálculos de la PCR cuantitativa a tiempo real	57
3.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA	58
3.8.1. Obtención de cortes de tejido	58
3.8.2. Inmunofluorescencia	58
3.9. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	60
3.9.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	60
3.9.2. Inmunodetección	61
3.10. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	62
3.10.1. Parámetros bioquímicos en suero	62
3.10.2. Determinación de ácidos biliares en suero por fluorescencia	62

3.10.3. Determinación de proteínas totales	62
3.11. ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA ÓPTICA	64
3.12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	65
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
4.1. LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SVCTS EN EL TEJIDO HEPÁTICO DE RATA	69
4.2. ESTUDIO ONTOGÉNICO DE LA EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATA	81
4.3. CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATA EN MODELOS EXPERIMENTALES ASOCIADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO	91
4.3.1. Expresión de Svcts en el hígado de ratas obesas (fa/fa) zucker	93
4.3.2. Expresión de Svcts en el hígado de ratas diabéticas	101
4.3.3. Expresión de Svcts en el hígado de ratas con colestasis obstructiva durante 1 semana	109
4.3.4. Expresión de Svcts en el hígado de ratas con colestasis obstructiva durante 8 semanas	117
4.3.5. Efecto de los ácidos biliares en la expresión de Svcts en células hepáticas en cultivo	137
4.4. CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO HUMANO EN HEPATOPATÍAS ASOCIADAS CON ESTRÉS OXIDATIVO	145
5. CONCLUSIONES	153
6. BIBLIOGRAFÍA	157

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) se sintetiza en la mayoría de los mamíferos a partir de glucosa, o se puede obtener a partir de fuentes exógenas. En el caso de varias especies de mamíferos, entre las que se incluye la nuestra, existe una dependencia absoluta del aporte exógeno, ya que carecemos de la enzima que cataliza el último paso de esta vía de síntesis.

Entre las funciones del AA destacan sus propiedades antioxidantes, ya que reacciona fácilmente con radicales libres potencialmente tóxicos para formar en dos pasos ácido deshidroascórbico (DHA), en una reacción reversible, que permite que se regenere el AA y por lo tanto su capacidad antioxidante.

El AA es captado por las células por un sistema de co-transporte con sodio a través de proteínas de la familia SVCT (de las siglas en inglés "Sodium-dependent Vitamin C Transporter") SVCT1 y SVCT2. La SVCT1 está muy expresada en epitelios implicados en el transporte de sustancias como el intestino, túbulo proximal renal, e hígado, mientras que la SVCT2 se caracteriza por su ubicuidad, y alta expresión en células con un metabolismo muy activo.

A pesar de la importancia del hígado en el mantenimiento de la homeostasis de la vitamina C, y de la relevancia de esta vitamina en la detoxificación de sustancias endógenas y xenobióticos, no hay estudios sobre la distribución subcelular de las SVCTs en este órgano en situaciones fisiológicas, ni cómo responde la expresión de estos genes ante una agresión por estrés oxidativo.

Por esta razón, nos planteamos como objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral investigar los cambios de expresión de las proteínas transportadoras de vitamina C de la familia SVCT en el hígado control y en patologías asociadas a daño oxidativo hepático.

Para alcanzar este objetivo global se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- **Objetivo 1.** Estudiar la localización celular de las proteínas Svcts en el tejido hepático de rata.
- **Objetivo 2.** Estudiar la evolución ontogénica de la expresión de Svcts en el hígado de rata.
- **Objetivo 3.** Estudiar los cambios de expresión de las proteínas Svcts en el hígado de rata en modelos experimentales que se acompañan de estrés oxidativo.

- **Objetivo 4.** Estudiar el efecto de los ácidos biliares en la expresión de Svcts en células hepáticas en cultivo.
- **Objetivo 5.** Estudiar los cambios de expresión de SVCTs en el hígado humano en pacientes con hepatopatías que se acompañan de estrés oxidativo.

2.1. SISTEMA HEPATOBILIAR

El hígado es la víscera de mayor tamaño del organismo, en humanos adultos constituye aproximadamente el 2.5% del peso corporal. Presenta como peculiaridad circulatoria el doble origen de su aporte sanguíneo: a través de la arteria hepática le llega sangre arterial procedente del tronco celíaco, mientras que la vena porta le suministra sangre procedente del bazo, páncreas, estómago e intestino. La sangre que alcanza el hígado por esta doble circulación se mezcla en los sinusoides hepáticos y es drenada por las venas centrilobulillares, que convergen para formar la vena suprahepática (Arias, 1982).

El hígado está recubierto exteriormente por una capa de células mesoteliales. Por debajo se encuentra una cápsula de tejido conectivo delgado denominada cápsula de Glisson, que a nivel del hilio (surco transversal situado en la cara inferior del hígado) se extiende ramificándose y penetrando en el parénquima hepático.

A nivel celular, el hígado está formado fundamentalmente por un parénquima constituido por láminas irregulares de células epiteliales o hepatocitos, que se anastomosan entre sí dejando espacios vasculares libres denominados sinusoides. Las distintas capas se orientan radialmente desde un espacio vascular: la vena hepática. La sangre fluye en este laberinto esponjoso que es el parénquima hepático, desde las entradas portales hacia las salidas venosas.

Entre hepatocitos adyacentes, generalmente dos, a veces tres, se encuentra un pequeño espacio formado por la invaginación de sus propias membranas plasmáticas, que constituye el canalículo biliar, en el cual se forma la bilis primaria. Todos los canalículos convergen en conductillos y estos en conductos biliares que, contenidos en los espacios porta, los recorren en sentido inverso a como lo hacen el resto de los elementos que constituyen el espacio porta, es decir, la rama de la arteria hepática y la rama de la vena porta. En el espacio porta se puede observar también un vaso linfático y algunos paquetes nerviosos. Este conjunto está rodeado por tejido conjuntivo procedente de la cápsula de Glisson (Feldmann, 1986).

El estudio microscópico del parénquima hepático revela una organización vascular consistente en la repetición de una unidad estructural, en la que los hepatocitos se disponen formando cordones desde la entrada portal hasta la salida venosa. La localización en el parénquima hepático determina una heterogeneidad de los hepatocitos con importantes implicaciones funcionales (Gumucio y Miller, 1981).

2.2. CÉLULAS HEPÁTICAS

2.2.1. Hepatocitos

Los hepatocitos representan el 65% de las células hepáticas y dado su gran tamaño ocupan el 80% del volumen parenquimal y el 90% de la masa celular del hígado. Cada uno de ellos es una célula poligonal cuyo diámetro varía entre 15-30 μm , con un valor medio de 25 μm (Feldmann, 1986). Presentan una clara polarización, como pone de relieve la diferenciación de su membrana plasmática, en la cual se pueden distinguir tres regiones con especificidad propia, tanto morfológica como funcional (Evans, 1980; Meier, 1988).

- **Membrana sinusoidal:** orientada al polo sanguíneo, es decir, al espacio perisinusoidal o espacio de Disse. Presenta numerosas microvellosidades que aumentan unas seis veces la superficie de intercambio. Aunque discutida durante cierto tiempo (Erlinger, 1982; Nathanson y Boyer, 1991), hoy parece evidente que la actividad $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ se localiza fundamentalmente en esta región de la membrana plasmática de los hepatocitos.
- **Membrana lateral:** se opone a los hepatocitos colindantes. En esta membrana hay distintos tipos de estructuras celulares cuya función es mantener la adhesión mecánica y la conexión funcional entre los hepatocitos adyacentes (Meier, 1988).
- **Membrana canalicular:** es una invaginación de aproximadamente el 3% de la superficie de la membrana celular del hepatocito, en forma de medio cilindro que, al unirse a la formación equivalente del hepatocito adyacente, forma el canaliculo biliar. Esta membrana también presenta numerosas microvellosidades irregulares que sobresalen en la luz canalicular. Alrededor de los canálculos biliares hay una zona de citoplasma pobre en orgánulos, denominada ectoplasma pericanalicular, que posee filamentos y microtúbulos de suma importancia para el mantenimiento de la forma del canaliculo y de la secreción biliar (Meier, 1988; Watanabe *et al.*, 1991).

El núcleo del hepatocito es redondeado, con un gran nucleolo en su interior. Existen hepatocitos binucleados cuyo porcentaje respecto a mononucleados es un aspecto importante en la caracterización del crecimiento hepatocelular, ya que mientras en la proliferación normal los hepatocitos binucleados son relativamente frecuentes durante la regeneración y crecimiento neoplásico disminuye su número (Gerlyng *et al.*, 1992).

Las estructuras del esqueleto intracelular están compuestas por microfilamentos de actina y microtúbulos. Los filamentos forman, junto con las estructuras membranosas, un

complejo sistema de interacción mutua, que juega un papel importante en la regulación de la forma y motilidad, movimientos intracelulares y procesos secretores, mitosis y división celular. Estos microfilamentos forman una red tridimensional que se extiende por todo el citoplasma pero se concentra particularmente alrededor del canalículo biliar y tejido pericanalicular, lo que sugiere una estrecha relación con la secreción de bilis. Hoy se cree que actúan manteniendo el canalículo en estado de contracción parcial (tono canalicular) y regulando el flujo biliar por medio de ciclos de contracciones y relajaciones (French y Davies, 1975). El sistema microtubular parece estar implicado en el transporte de componentes de las membranas celulares hacia su lugar de destino. En este sentido la movilización de transportadores hacia la membrana canalicular puede ser la responsable de la dependencia que presenta la secreción de una sobrecarga de ácidos biliares, sobre todo si tienen carácter muy hidrofóbico, de la integridad del sistema microtubular.

En hepatocitos aislados se altera el carácter polar de los hepatocitos *in vivo*. Todos los elementos extracelulares implicados en la adhesión celular (“tight junctions”, “gap junctions” y desmosomas) sufren endocitosis y se digieren. Cuando los hepatocitos se incuban en cultivos primarios hasta la confluencia se observa en la monocapa que se reestablecen las uniones intercelulares, la polaridad e incluso la misma disposición del citoesqueleto (Berry *et al.*, 1991).

Las células hepáticas no parenquimales constituyen el 35% de la población celular del hígado. Una de las principales diferencias entre estas células y los hepatocitos radica en la baja actividad metabólica de las primeras frente a xenobióticos. En estudios de genotoxicidad esta característica adquiere especial relevancia, ya que los hepatocitos tienen capacidad para activar ciertos promutágenos, mientras que el resto de células hepáticas carecen de esta propiedad (Teepe *et al.*, 1992). Dentro de las células no parenquimales se distinguen los colangiocitos, las células de Kupffer, las células endoteliales, y las células estrelladas, y además hay una pequeña población de células stem.

2.2.2. Células ductulares o colangiocitos

Son las células epiteliales que tapizan los ductos biliares formando una red tridimensional de conductos de diferente tamaño, desde <20 μm hasta >800 μm de diámetro. Los colangiocitos difieren en el tamaño (entre 6-15 μm) y en la forma (cuboidal o plana los colangiocitos que forman los conductos pequeños, y cilíndrica los que forman los conductos grandes).

Ultraestructuralmente, en los colangiocitos se pueden distinguir claramente una membrana apical y una membrana basal, y aparecen microvellosidades, “tight junctions” y abundantes vesículas que, en conjunto, pueden considerarse características típicas de un epitelio transportador (Adjarov *et al.*, 1979). Utilizando colangiocitos en cultivo primario se ha demostrado que entre colangiocitos adyacentes hay comunicación vía “gap junctions” (Alpini *et al.*, 1994).

El núcleo, localizado en la región basal de la célula, tiene una forma redondeada-ovalada y con frecuencia presenta pequeñas invaginaciones. Alrededor del núcleo aparecen numerosas mitocondrias de pequeño tamaño. El aparato de Golgi está bien desarrollado y se encuentra próximo a la membrana apical, y aquí también se localizan vesículas, lisosomas y cuerpos multivesiculares.

Los conductos biliares no son simples túbulos que recogen los productos de secreción de los hepatocitos y los llevan hasta la vesícula biliar o al intestino. Los colangiocitos secretan bilis de forma espontánea y bajo estimulación hormonal (Tavoloni, 1987) y reabsorben agua y electrolitos (Peterson y Fujimoto, 1973). Además pueden transportar carbohidratos y proteínas (Sternlieb y Quintana, 1985), y existen evidencias de que están implicados en el transporte (LaRuso *et al.*, 1991) y metabolismo de ácidos biliares (Hylemon *et al.*, 1990).

2.2.3. Células endoteliales

Son las células que forman las paredes vasculares. Las células endoteliales del sinusoides hepático, a diferencia de las demás del organismo, poseen fenestraciones que permiten el libre movimiento del plasma del espacio intravascular al espacio de Disse y a los hepatocitos y desde éstos a los sinusoides. Diez o más fenestraciones se agrupan formando las placas cribadas; cada fenestración tiene un diámetro de 175 nm lo que permite el paso de la mayor parte de los componentes del plasma excepto los quilomicrones grandes. Una sola célula endotelial puede tener cientos de fenestraciones y éstas son estructuras dinámicas que responden a diferentes estímulos; calcio, serotonina, nicotina, impulsos neuronales, alcohol, endotoxinas, etc.

Puesto que el hígado es el principal sitio de depuración del ácido hialurónico circulante, su elevación en sangre indica daño de la célula endotelial sinusoidal hepática.

2.2.4. Células de Kupffer

Estas células pertenecen al sistema fagocítico mononuclear y son macrófagos específicos del hígado, identificados por primera vez por von Kupffer (1876). Tienen forma irregular y están situadas al lado de las células endoteliales. Contienen numerosos lisosomas muy desarrollados y vesículas pinocíticas, ya que su principal característica es su capacidad fagocítica (Knook y Sleyster, 1980).

Las células de Kupffer desempeñan funciones esenciales para mantener la homeostasis hepática. La endocitosis es esencial para la obtención de varias proteínas plasmáticas y otros materiales hemáticos, y además la interacción de estas sustancias con receptores está directamente acoplada a respuestas metabólicas que llevan a la producción de citokinas y eicosanoides. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son captadas casi exclusivamente por las células de Kupffer (Harkes y van Berkel, 1984). Las células de Kupffer poseen un receptor adicional que se une a las LDL oxidadas, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y la lipoproteína A (van Berkel *et al.*, 1991; De Rijke *et al.*, 1992). En varias patologías, como la cirrosis biliar primaria, la ictericia obstructiva y el consumo de etanol, la capacidad de las células de Kupffer para captar complejos inmunitarios de inmunoglobulinas se reduce, lo que puede llevar a reducir la capacidad de defensa del huésped.

2.2.5. Células estrelladas

También se las conoce como células de Ito o almacenadoras de grasa, principalmente vitamina A. Se localizan entre los hepatocitos y las células endoteliales. Son las células responsables de la síntesis del colágeno depositado en el espacio de Disse (Schnack *et al.*, 1967).

En condiciones fisiológicas, comprenden alrededor del 15% del número total de células hepáticas. Su principal función es el almacenamiento y la homeostasis de la vitamina A y otros retinoides, que se almacenan como gotas lipídicas citoplasmáticas en forma de ésteres de retinilo. Las células estrelladas regulan el flujo sanguíneo sinusoidal y producen apolipoproteínas, prostaglandinas, factores de crecimiento y citokinas, todas las cuales contribuyen a la homeostasis de la matriz extracelular. La síntesis y la degradación de la matriz extracelular hepática normal es esencial para la integridad del espacio de Disse y para la comunicación intra- e intercelular entre células vecinas (Nieto *et al.*, 2002). Después de un estímulo fibrogénico, las células estrelladas experimentan un complejo proceso de activación en el que dejan de ser quiescentes y se transforman en

células parecidas a miofibroblastos (Venkatakrisnan *et al.*, 2001; Friedman, 2000). Como consecuencia sufren cambios fenotípicos: se ensanchan, con agrandamiento nuclear y citoplasmático, elongación de las prolongaciones para establecer contacto entre células, y pérdida de las gotas lipídicas. Al activarse, las células estrelladas aumentan la expresión de actina de músculo liso y de colágeno de tipo I, proliferan y migran al lugar de la lesión, donde se acumula matriz extracelular y se produce cicatrización (Friedman, 2000).

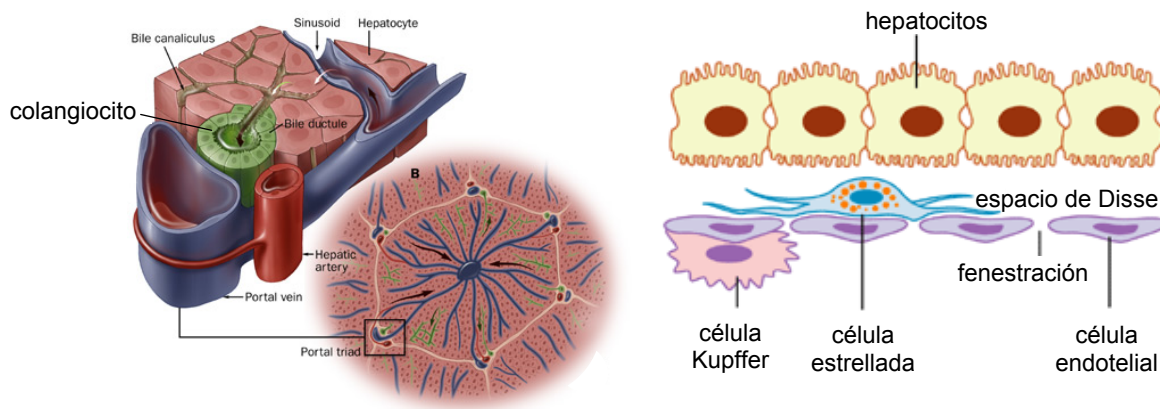


Figura 1. Esquemas de la organización del parénquima hepático y de las distintas células hepáticas.

2.2.6. Células stem

Además, en el hígado hay una población de células indiferenciadas, denominadas células ovas o "stem" con capacidad proliferativa, y capaces de transformarse en los distintos tipos de células especializadas del hígado, y de participar en la regeneración del órgano después de un daño. Estas células tienen un aspecto morfológico similar al de las células ductulares y expresan citokeratinas como carácter propio de su origen biliar, sin embargo, al igual que los hepatocitos, pueden sintetizar albúmina y α -fetoproteína. El hecho de que células de origen biliar respondan a mitógenos específicos para hepatocitos con el HSS ("hepatic stimulator substance") refuerza el concepto de que son células emparentadas con hepatocitos y células ductulares (Gupta, 1992).

2.3. ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares son ácidos carboxílicos que se forman en los hepatocitos como resultado del metabolismo del colesterol, obteniéndose compuestos hidrosolubles, fácilmente excretables y con utilidad en los procesos digestivos. Presentan una estructura anfipática con una región hidrófila y otra hidrófoba, que les confiere propiedades detergentes. Esta estructura peculiar les permite asociarse entre sí y formar micelas a partir de una concentración determinada. Los ácidos biliares se secretan en la bilis durante el proceso digestivo y al formar estas micelas engloban en su interior a los lípidos de las grasas, las emulsionan y facilitan su absorción. Una vez realizada su función en el intestino, son reabsorbidos en el íleon y a través de la vena porta regresan al hígado, desde donde vuelven a ser secretados en la bilis. Este ciclo, denominado circulación enterohepática se lleva a cabo unas 6-10 veces al día (3-4 veces por comida) con escasas pérdidas fecales; los ácidos biliares que se pierden son reemplazados por moléculas de nueva síntesis.

Respecto a su estructura química, los ácidos biliares son esteroides con 24 átomos de carbono, saturados, mono o polihidroxilados y con un grupo carboxilo en la cadena lateral, que puede estar conjugado con glicina o taurina (Lester *et al.*, 1983). Los ácidos biliares primarios son el ácido cólico (CA: 3 α , 7 α , 12 α -trihidroxi-5 β -colanoico) y el ácido quenodesoxicólico (QDCA: 3 α , 7 α -dihidroxi-5 β -colanoico). Se sintetizan directamente en el hígado y a su paso por el intestino las bacterias de la flora intestinal los degradan dando lugar a los denominados ácidos biliares secundarios. Éstos carecen del grupo hidroxilo en posición 7 α y son el ácido desoxicólico (DCA), procedente del CA, y el ácido litocólico (LCA), procedente del QDCA. Además de ésta existen otras transformaciones minoritarias que producen una gran variedad de derivados de los ácidos biliares primarios. En los fluidos biológicos la mayoría de los ácidos biliares se encuentran en forma de sales, formas ionizadas solubles de estos compuestos.

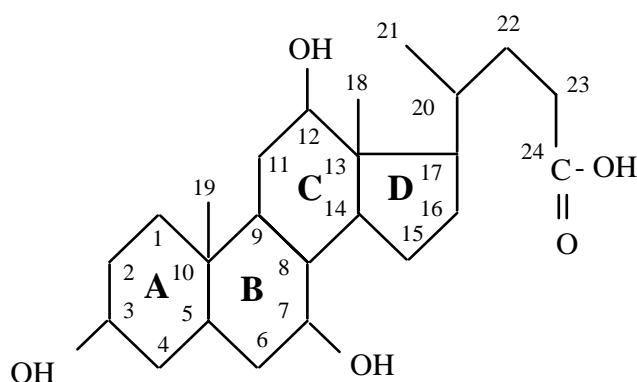


Figura 2. Estructura química del ácido cólico.

2.3.1. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS BILIARES

Los ácidos biliares primarios se sintetizan a partir del colesterol a través de dos vías:

- la vía clásica o vía neutra, así denominada porque los compuestos intermediarios son esteroides neutros. Sus productos principales son el CA y el QDCA, y el paso limitante es la hidroxilación en el C7 del núcleo esteroideo llevada a cabo por la enzima microsomal colesterol 7 α -hidroxilasa (gen *CYP7A1*).
- la vía alternativa o vía ácida, donde los compuestos intermediarios tienen carácter ácido. El producto mayoritario de esta vía es el QDCA (Bjorkhem *et al.*, 1992), y el paso limitante es la hidroxilación en el C27 de la cadena lateral llevada a cabo por la enzima mitocondrial esteroide 27-hidroxilasa (gen *CYP27*).

La contribución relativa de ambas vías a la biosíntesis global de ácidos biliares no está muy clara. Parece ser que la vía clásica desempeña el papel principal en la biosíntesis de ácidos biliares en humanos en condiciones fisiológicas, y que, en estas condiciones la vía alternativa apenas contribuye a la síntesis. Sin embargo, esta vía puede adquirir un papel fundamental en pacientes con enfermedades hepáticas, y parece ser la vía predominante durante la vida fetal (Deleze *et al.*, 1978).

2.3.2. TRANSPORTE HEPÁTICO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

La eficiente **captación hepática** se produce por la existencia de transportadores específicos para los ácidos biliares en la membrana sinusoidal o basolateral del hepatocito. Este proceso se lleva a cabo mediante un sistema de transporte dependiente de Na⁺ o bien de forma independiente de este catión.

Los ácidos biliares conjugados son captados en el hígado fundamentalmente de forma sodio dependiente por una proteína transportadora denominada NTCP (“Na-taurocholate cotransporting polypeptide”) (gen *SLC10A1*). Esta glicoproteína posee 349 aminoácidos y una masa molecular de unos 56 kDa (Hagenbuch y Meier, 1994). Se trata de un sistema electrogénico de cotransporte de dos iones Na⁺ y un AB. La energía que rige este transportador, contra gradiente eléctrico y químico, la suministra la disipación de un gradiente de sodio que se mantiene gracias a la actividad Na⁺/K⁺-ATPasa que existe en esta membrana (Meier, 1989).

Los AB libres, como el CA o el QDCA, son captados por el hepatocito gracias a mecanismos independientes de Na⁺ (Müller y Jansen, 1997). Cierta cantidad de ácidos

biliares conjugados también son transportados de esta manera. El principal sistema de transporte responsable de la recaptación es el formado por la familia de OATPs (“Organic anion transporting polypeptides”) (Hagenbuch y Meier, 2003).

Se han descrito 3 miembros de esta familia de transportadores en hígado de rata (Oatp 1/1a1, 2/1a4 y 4/1b2) y 3 en humanos (OATP-A/1A2, OATP-C/1B1 y OATP-8/1B3) (Meier y Stieger, 2002). El OATP-C (gen *SLCO1B1*) es el principal transportador hepático de aniones orgánicos en humanos, transportando además de ácidos biliares, esteroides, eicosanoides y hormonas tiroideas.

Los ácidos biliares se han identificado también como ligandos de baja afinidad del OATP-8, aunque los experimentos llevados a cabo hasta la fecha no consideraban, porque se desconocía, que los procesos de transporte mediados por la OATP-8 requieren del glutatión como activador (Briz *et al.*, 2006). La OATP-A también es capaz de transportar ácidos biliares, aunque es muy poco abundante en el tejido hepático.

Ya en el **interior del hepatocito** los ácidos biliares tienen que ser transportados desde la membrana basal hasta la membrana canalicular para su posterior secreción a la bilis. El transporte transcelular de estas moléculas se lleva a cabo por dos vías que no son incompatibles:

- Transporte en solución o unidos a proteínas citosólicas hacia la zona pericanalicular, por difusión citoplasmática. Las proteínas más importantes son la “H-BABP” (“hepatic bile acid binding protein”), la glutatión-S-transferasa (GST) (Stolz *et al.*, 1989) y las proteínas de unión I y II (Erlinger, 1996). En el hígado de rata la 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa representa la proteína citosólica mayoritaria que se une a los ácidos biliares (Stolz *et al.*, 1991). En condiciones fisiológicas, los ácidos biliares conjugados trihidroxilados se unen a las proteínas citosólicas alcanzando la membrana canalicular por difusión citoplasmática (Meier, 1995).
- Transporte mediado por vesículas derivadas del aparato de Golgi (Kast *et al.*, 1994). Los ácidos biliares más hidrofóbicos (mono y dihidroxilados) y los trihidroxilados, cuando se encuentran en elevadas concentraciones, se asocian a compartimentos intracelulares membranosos como son vesículas transcitóticas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Coleman, 1987; Nathanson y Boyer, 1991).

La **secreción canalicular** de ácidos biliares representa el paso limitante en el conjunto de procesos de transporte de estos compuestos desde sangre hasta bilis (Erlinger, 1993). Los ácidos biliares conjugados se concentran más de 100 veces en el canalículo biliar,

produciendo así un gradiente osmótico responsable de la principal fuerza generadora del flujo de bilis.

La mayoría de los sistemas de transporte canaliculares implicados en la formación de bilis pertenecen a la familia de las proteínas ABC ("ATP binding cassette") (Gatmaitan y Arias, 1995). Se trata de una superfamilia de proteínas exportadoras dependientes de ATP que se encuentran en la membrana canalicular de los hepatocitos y que son capaces de transportar, en contra de gradiente de concentración, gran cantidad de sustancias, incluidos los ácidos biliares.

La bomba exportadora de sales biliares BSEP ("Bile Salt Export Pump", gen *ABCB11*) media la secreción de ácidos biliares monovalentes dependiente de ATP (Stieger *et al.*, 1992) y es la principal responsable del transporte canalicular de ácidos biliares.

Otra proteína canalicular, la MRP2 ("Multidrug Resistance Associated Protein 2") o cMOAT ("Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter"), gen *ABCC2*, transporta glutatión, leucotrienos, glucurónidos de bilirrubina, bromosulfoftaleína y también puede ser utilizada por los ácidos biliares divalentes conjugados con sulfato o ácido glucurónico en su secreción a bilis (Akita *et al.*, 2001). Pertenece a la subfamilia de las proteínas MRP que confieren resistencia a las células tumorales frente a fármacos por expulsión activa de éstas del interior de las células (Paulusma *et al.*, 1996; Müller y Jansen, 1997).

La BCRP ("Breast Cancer Resistance Protein") o ABCG2 es capaz de transportar una gran variedad de sustratos, desde fármacos antineoplásicos hasta aniones orgánicos. Dentro de los compuestos endógenos que puede expulsar a bilis esta bomba se encuentran la protoporfirina IX (Krishnamurthy *et al.*, 2004), la estrona-3-sulfato (Imai *et al.*, 2003) y otros esteroides entre los que se incluyen probablemente ácidos biliares primarios (Janvilisri *et al.*, 2005). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha encontrado evidencias de la posible participación de BCRP en el transporte de ácidos biliares sulfatados (Blázquez *et al.*, 2008).

2.3.3. PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS ÁCIDOS BILIARES

- **En el hígado:** su secreción a bilis genera la fracción del flujo biliar dependiente de los ácidos biliares. Inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, y modulan la biosíntesis de colesterol. El flujo de ácidos biliares a través del hepatocito determina la cantidad de receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

- **En la bilis:** forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas como el colesterol y fosfolípidos. Actúan como soluciones amortiguadoras para iones Ca^{2+} .
- **En el intestino:** participan en la digestión y absorción de las grasas de la dieta y de las vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E y K) formando micelas que permiten su emulsión. Activan lipasas intestinales. Modulan la actividad de proteasas, la motilidad intestinal y la secreción de hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina (Combettes *et al.*, 1992). Inducen la secreción de agua y electrolitos.
- Además se ha demostrado su participación en el control de la proliferación celular, la regeneración hepática y la muerte celular programada o apoptosis en los tejidos donde los ácidos biliares se encuentran en concentraciones elevadas (Barbero *et al.*, 1995; Blair *et al.*, 1991; Marín *et al.*, 1993; Rodrigues *et al.*, 2000).
- Hace unos años se demostró la relación entre los ácidos biliares y la homeostasis de la glucosa. Pacientes con diabetes tipo II fueron tratados con colestiramina (un agente secuestrador de ácidos biliares, para combatir la alteración en el metabolismo de los lípidos) y además de una disminución del colesterol total y de la LDL, la colestiramina también redujo los niveles de glucosa en sangre un 13% (Garg y Grundy, 1994). Por otra parte, la exposición de hepatocitos aislados de rata a glucosa incrementa los niveles de mRNA del FXR (Duran-Sandoval *et al.*, 2004), y estudios recientes indican que los ácidos biliares a través del FXR regulan la gluconeogénesis, la síntesis de glucógeno y la sensibilidad a insulina (Cariou *et al.*, 2006), y se ha propuesto que los agonistas del receptor $\text{FXR}\alpha$ podrían ser útiles en el tratamiento de la diabetes tipo II.
- Las funciones inmunomoduladoras de algunos ácidos biliares se conocen desde hace tiempo; cuando se observó que la administración oral de ácidos biliares reduce las complicaciones asociadas a endotoxinas en pacientes con colestasis obstructiva (Cahill, 1983; Pain *et al.*, 1991). Este efecto beneficioso de los ácidos biliares se ha atribuido a la inhibición de la producción de TNF ("tumor necrosis factor") (Greve *et al.*, 1989).
- Cuando los ácidos biliares pasan a bilis están en contacto directo con los colangiocitos y se ha demostrado su capacidad para modular la secreción, proliferación y supervivencia de estas células de forma paracrina (Xia *et al.*, 2006).
- Recientemente se ha demostrado que los ácidos biliares funcionan como moléculas señalizadoras con diversas funciones endocrinas y paracrinas a través de diferentes rutas; tras la activación de receptores nucleares, de protein-quinasas intracelulares, o

mediante receptores unidos a membrana plasmática acoplados a proteínas G como el TGR5 (para revisión ver Keitel *et al.*, 2008).

2.4. ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno es el oxidante primario en las reacciones metabólicas diseñadas para obtener energía de la oxidación de una variedad de moléculas orgánicas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son un grupo de metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos, altamente reactivos y de naturaleza variada. Se generan en las células aerobias a través de múltiples mecanismos metabólicos y bajo condiciones normales o fisiológicas. Pueden originarse como subproducto del metabolismo anaerobio del ATP, como segundos mensajeros en vías de transducción de señales, o pueden derivar de fuentes exógenas, bien por captura directa por parte de la célula de su medio extracelular o bien como consecuencia de la exposición de la célula a un daño exterior.

Las ROS pueden ser o no radicales libres, pero tienen relación directa con la formación de éstos. Los radicales libres pueden ser definidos como estructuras altamente reactivas, inestables y con un número impar de electrones en su orbital externo, lo que justifica su tendencia a donar o recibir un electrón para estabilizarse.

Las principales ROS a las que se atribuyen mayor protagonismo como desencadenantes de los procesos oxidativos en los seres vivos son:

- **Radical superóxido (O_2^{\ominus}):** puede generarse en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial, en el retículo endoplásmico por el citocromo P450, y en algunas células como los leucocitos por la NADP-oxidasas.
- **Peróxido de hidrógeno (H_2O_2):** se genera principalmente en los peroxisomas. Si no es reducido a agua puede dar lugar a la formación del radical hidroxilo.
- **Radical hidroxilo ($\cdot OH$):** es el agente oxidante más potente que se conoce.
- **Radical peroxinitrito ($ONOO^{\ominus}$):** se genera en la reacción del radical superóxido con el óxido nítrico cuando las concentraciones de éstos son elevadas.

El estrés oxidativo resulta de las reacciones metabólicas que utilizan oxígeno, y se ha definido como una alteración en el estado de equilibrio entre los sistemas prooxidantes/antioxidantes en las células intactas. Esta definición de estrés oxidativo implica que las células poseen sistemas que continuamente generan y detoxifican oxidantes durante el metabolismo aerobio normal. Cuando existen eventos oxidativos adicionales, el sistema prooxidante desequilibra al sistema antioxidante, ocasionando daño a los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, que en caso de estrés oxidativo severo conduce finalmente a la muerte celular.

El estrés oxidativo crónico puede alterar los sistemas antioxidantes induciendo o reprimiendo proteínas que participan en estos sistemas, así como disminuyendo las reservas celulares de antioxidantes como el glutatión y la vitamina E. El desequilibrio entre los sistemas pro/anti-oxidantes puede ser inducido por una gran variedad de factores, incluyendo la radiación, el metabolismo de contaminantes medioambientales y xenobióticos, así como la respuesta inmune a enfermedades o infecciones.

De un modo global, el estrés oxidativo está implicado en una gran variedad de enfermedades incluyendo la arterioesclerosis, diabetes, fibrosis pulmonar, enfermedades neurodegenerativas como el parkinson, artritis y envejecimiento en general (Finkel y Holbrook, 2000). A nivel celular, el daño causado por las ROS incluye peroxidación lipídica, inactivación enzimática, alteración del estado redox intracelular y del material genético, etc (Slater *et al.*, 1987).

La peroxidación lipídica causa alteración celular dando lugar a pérdidas en la fluidez, permeabilidad y funcionalidad de las membranas celulares, así como la alteración de las proteínas que se encuentran en ellas. Los ácidos grasos poliinsaturados son moléculas muy sensibles al ataque de los radicales libres, debido a que poseen dobles enlaces, aunque este proceso puede darse también en otros lípidos como los esteroides.

Las proteínas también pueden ser dañadas durante el estrés oxidativo en distintos sitios reactivos pudiéndose ocasionar agregación, fragmentación, rotura y modificaciones de grupos funcionales. Estas alteraciones pueden dar lugar a cambios en actividades enzimáticas y transporte de iones y a proteólisis. Entre los aminoácidos más sensibles al daño oxidativo en las proteínas se encuentran histidina, prolina, arginina, lisina y cisteína, de manera que se va a producir la carbonilación de las mismas.

En cuanto al DNA, los radicales libres pueden producir daños que oscilan entre mutaciones puntuales y delección de fragmentos hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales, incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida de cromosomas.

2.5. COLESTASIS

La colestasis se define como una retención del flujo biliar, que como consecuencia produce acumulación en plasma de sustancias que habitualmente se eliminan en la bilis; por ejemplo se alcanzan valores séricos de ácidos biliares superiores a 100 μM (Fischer *et al.*, 1996) y la hiperbilirrubinemia da lugar a ictericia.

La regurgitación de los ácidos biliares desde el hepatocito a la sangre se acompaña de una disminución de estos compuestos en bilis, y esta carencia puede producir una deficiente absorción intestinal de lípidos biliares, esteatorrea y síndromes variados por deficiencia de vitaminas liposolubles. La colestasis prolongada puede conducir a complicaciones por hipovitaminosis como puede ser hipoprotrombinemia, osteomalacia y ceguera nocturna. Por otra parte, se ha demostrado que la bacteriemia y la endotoxemia aparecidas en pacientes con colestasis podrían estar relacionadas con la falta de ácidos biliares en el intestino, ya que éstos inhiben el crecimiento bacteriano y reducen la endotoxemia (Ding *et al.*, 1993). El síntoma más común de la colestasis es el prurito, una sensación cutánea desagradable que provoca deseo de rascarse.

En el hígado sano existe una regulación entre la captación de ácidos biliares, su salida y biosíntesis. El receptor FXR (farnesoid X receptor) que es regulado por el ácido cólico, ácido quenodesoxicólico y ácido litocólico regula la biosíntesis de los ácidos biliares y también regula la expresión de la BSEP (Pratt, 2005).

La MPR4 es una proteína transportadora de sales biliares situada en la membrana basolateral del hepatocito, que en condiciones fisiológicas está muy poco expresada. En modelos animales de colestasis se ha encontrado que se produce un aumento en la expresión de la Mrp4 en el hígado, pero una disminución en el riñón (Denk *et al.*, 2004) lo que parece indicar que se genera una vía de excreción alternativa de los ácidos biliares (Assem *et al.*, 2004).

Existen diferentes situaciones que generan colestasis, como la atresia biliar que se manifiesta durante las primeras semanas de vida y se caracteriza por una progresiva destrucción del árbol biliar extrahepático (Shivakumar *et al.*, 2004). También existen formas hereditarias como la denominada colestasis intrahepática progresiva familiar tipo I que se caracteriza por altos niveles de ácidos biliares en suero (Chen y Chang, 2004) y raras formas genéticas de colestasis neonatal que se han investigado recientemente (Gissen *et al.*, 2004; Lumbroso *et al.*, 2004). Durante el segundo y tercer trimestre del embarazo se puede dar colestasis intrahepática que genera complicaciones fetales con sales biliares en suero $> 40 \mu\text{mol/L}$. La cirrosis biliar primaria se cree que es una enfermedad autoinmune donde individuos susceptibles genéticamente y expuestos a

determinadas condiciones ambientales o agentes infecciosos sufren una pérdida de tolerancia del sistema inmune (Xu *et al.*, 2004). Por último tenemos la colangitis esclerosante primaria que es una enfermedad hepática colestática crónica.

2.6. COLESTASIS Y ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha comentado anteriormente, en situaciones de colestasis se produce acumulación de ácidos biliares y otras sustancias que producen liberación de radicales libres. Además, en modelos animales experimentales de colestasis por ligadura del conducto biliar se ha demostrado que induce estrés oxidativo (Britton y Brown, 1995; Sokol *et al.*, 1995). Este fenómeno se refleja en un incremento plasmático de lípidos peroxidados, apareciendo a su vez una depleción de antioxidantes endógenos y daño oxidativo a nivel del DNA mitocondrial. En estudios *in vitro* se ha descrito que tanto los ácidos biliares hidrofóbicos como los hidrofílicos pueden interrumpir la cadena de transporte de electrones mitocondrial y generar peroxidación lipídica en el hepatocito (Krahenbuhl *et al.*, 1994; Sokol *et al.*, 1995).

La capacidad de los ácidos biliares para inducir estrés oxidativo hepático ha sido ampliamente estudiada en ratas, tanto en cultivos de hepatocitos (Sokol *et al.*, 1993; Sokol *et al.*, 1995) como en hepatocitos *in vivo* (Sokol *et al.*, 1998). Por otra parte, la exposición de dichos cultivos a altas concentraciones de ácidos biliares hidrofóbicos provoca su necrosis (Sokol *et al.*, 1995; Galle *et al.*, 1990); mientras que, a bajas concentraciones, induce alteración de la replicación del DNA (Patel *et al.*, 1994; Gumprich *et al.*, 2000) y desencadena mecanismos de apoptosis. También se ha demostrado que los ácidos biliares más hidrofóbicos pueden estimular a las células de Kupffer provocando un aumento en su producción de radicales libres. Éstos, a su vez, pueden aumentar la peroxidación de los lípidos de la membrana de los hepatocitos induciendo su apoptosis (Ljubuncic *et al.*, 1996).

2.7. SISTEMA ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C

Dentro de los múltiples sistemas de defensa frente al estrés oxidativo se encuentra el sistema de la vitamina C, también llamada ácido ascórbico (AA) o factor antiescorbútico. Este compuesto es un derivado de una hexosa que se sintetiza en el hígado de la mayoría de los mamíferos a partir de glucosa. Sin embargo, el hombre y otros primates, así como los cobayas y murciélagos, carecen de la enzima hepática funcional L-gulono- γ -lactona oxidasa (EC 1.1.3.8) que cataliza la última reacción de su biosíntesis (Nishikimi *et al.*, 1994). De modo que el hombre depende de fuentes exógenas de esta vitamina, que es un micronutriente esencial.

Es importante destacar que el término genérico de vitamina C se emplea para designar a todos aquellos compuestos que poseen, desde el punto de vista cualitativo, la actividad biológica del AA. Éste, en el organismo, se oxida rápidamente y de forma reversible a ácido deshidroascórbico (DHA) en dos pasos en los que pierde cada vez un electrón, pasando por una forma ascorbilo de radical libre. Este compuesto intermedio es seguidamente oxidado a DHA, que puede ser hidrolizado irreversiblemente para dar ácido 2,3-dicetogulónico o se puede regenerar el AA.

2.7.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA VITAMINA C

El AA desempeña funciones esenciales en el organismo actuando como cofactor enzimático en diversas reacciones metabólicas, entre las que destacan las reacciones de hidroxilación y las de amidación. La función de la vitamina C en la mayoría de estas reacciones es transferir electrones a las enzimas para mantener los iones metálicos de sus grupos prostéticos en su estado reducido; Fe_2^+ y CO_2^+ principalmente (Englard y Seiffert, 1986; Levine *et al.*, 1999).

Se ha descrito así su intervención en:

- **Neutralización de radicales libres.** El AA, forma predominante de la vitamina C en la sangre, reacciona fácilmente con radicales libres potencialmente tóxicos ($O_2^{\oplus-}$ y $\cdot OH$) dando lugar a un radical ascorbilo que rápidamente se descompone para producir DHA, o bien nuevamente regenera el AA. Esta propiedad como scavenger o secuestrador directo de radicales libres le confiere una potente acción antioxidante. Sin embargo, también se ha descrito la capacidad del AA para regenerar otros importantes sistemas antioxidantes endógenos, entre los que se incluye el glutatión y la vitamina E.

• **Síntesis de proteínas de la matriz extracelular** (colágeno y mucopolisacáridos), de carnitina, de hormonas esteroideas y ácidos biliares, de neurotransmisores (serotonina, noradrenalina); conversión de ácido fólico en ácido tetrahidrofólico; metabolismo microsomal de diversos fármacos; procesamiento de algunas hormonas peptídicas (oxitocina, hormona antidiurética y colecistoquinina); facilitación de la absorción intestinal de hierro; y finalmente, estimulación del sistema inmunológico.

2.7.2. TRANSPORTE DE VITAMINA C

Todas las células animales necesitan vitamina C para desempeñar funciones vitales, por lo que esta vitamina debe atravesar la membrana plasmática celular. Para ello utiliza varios sistemas de transporte que son diferentes para la forma reducida (ácido ascórbico, AA) y para la forma oxidada (ácido deshidroascórbico, DHA).

Se han descrito varios mecanismos para explicar cómo se lleva a cabo el transporte de vitamina C hacia el interior celular (Wilson, 2005): i) difusión simple de AA y DHA, ii) difusión facilitada de DHA a través de transportadores de hexosas (GLUTs) y iii) transporte activo secundario de AA mediante transportadores dependientes de sodio, SVCTs (sodium-dependent vitamin C transporters).

2.7.2.1. DIFUSIÓN SIMPLE DE AA Y DHA

A pH fisiológico, el AA se encuentra en forma de anión ascorbato y, debido a su tamaño y carga, difunde pobremente a través de la bicapa lipídica. La difusión simple del DHA también es prácticamente despreciable (Rose, 1987). Por lo tanto, la contribución de este mecanismo a la entrada y acumulación de vitamina C en el interior celular es muy baja, siendo insignificante en las células que tienen sistemas de transporte especializados con alta afinidad por el AA o el DHA.

2.7.2.2. TRANSPORTE DE DHA

El DHA atraviesa la membrana plasmática por un mecanismo de transporte facilitado utilizando transportadores de hexosas de la familia GLUT en concreto GLUT1, GLUT3 y GLUT4. El transporte es a favor de gradiente de concentración y por lo tanto sin gasto de

energía. Una vez en el interior de las células el DHA es reducido a AA por distintos sistemas enzimáticos, lo que mantiene bajos los niveles intracelulares y genera el gradiente que favorece su entrada. La captación de DHA se ha descrito en varios tipos celulares, como astrocitos, enterocitos, osteoblastos, etc, (Agus *et al.*, 1997; Daskalopoulos *et al.*, 2002) pero es especialmente relevante en células metabólicamente activas que carecen de sistemas de transporte para AA, como los neutrófilos (Vera *et al.*, 1998). Además, es esencial en la remodelación ósea a nivel de los osteoblastos (Qutob *et al.*, 1998) y se ha sugerido que a nivel de los astrocitos podría constituir un mecanismo de protección neuronal en situaciones de isquemia (Siushansian *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001).

La concentración de DHA en plasma es muy baja, alrededor de 2 μM (Dhariwal *et al.*, 1991), por lo que la cantidad de DHA que se capta a través de los GLUTs es pequeña en condiciones normales de glucemia (Spielholz *et al.*, 1997).

2.7.2.3. TRANSPORTE DE AA

La mayor parte de la vitamina C presente en el plasma se encuentra en forma reducida; siendo la concentración de AA en plasma $\approx 60 \mu\text{M}$ (Dhariwal *et al.*, 1991), lo que ha llevado a sugerir que la captación de vitamina C se lleva a cabo principalmente a través de las proteínas SVCTs.

El AA es captado por un sistema de transporte activo secundario, a través de dos proteínas pertenecientes a una familia de transportadores de bases nitrogenadas, la SVCT1 y la SVCT2, los productos de los genes *SLC23A1* y *SLC23A2*, respectivamente. La captación de AA se lleva a cabo en contra de gradiente electroquímico aprovechando la energía generada por el gradiente de sodio, que es mantenido por la acción de una bomba Na^+/K^+ -ATPasa. La estequiometría de este cotransporte de AA con sodio es 2:1.

2.7.3. FAMILIA DE TRANSPORTADORES DE VITAMINA C DEPENDIENTES DE SODIO: SVCTS

2.7.3.1. ESTRUCTURA GÉNICA

La organización genómica de los dos genes humanos es similar a pesar de la diferencia en tamaño y en localización cromosómica. *SLC23A1* tiene un tamaño de 16.096 pb y se localiza en el cromosoma 5q31.2-32.3, mientras que *SLC23A2* es 10 veces mayor, tiene 158.398 pb, y está localizado en el cromosoma 20p12.2-12.3. Los ORFs de los dos genes tienen un tamaño similar (1791 y 1953 para *SLC23A1* y *SLC23A2*, respectivamente) y la similitud entre sus secuencias es del 58% (Stratakis *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Por otro lado, la homología de los transcritos humanos con los de otras especies (ratón, rata y cerdo) es de 86-95% para ambos mRNA de SVCTS (Daruwala *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2002), lo que ha llevado a sugerir que ambos transportadores derivan de un gen ancestral común.

2.7.3.2. ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS

En humanos, las secuencias aminoacídicas de SVCT1 (598 aa) y SVCT2 (650 aa) presentan una homología de un 65% (Daruwala *et al.*, 1999), y la homología es similar en las isoformas de rata y ratón (Tsukaguchi *et al.*, 1999; Faaland *et al.*, 1998). Existe cierta controversia sobre el peso molecular de las SVCTS humanas; en células transfectadas los valores son similares a los descritos para rata y ratón, con bandas entre 65 y 75 KDa dependiendo del grado de glicosilación (Lutsenko *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007), mientras que *in vivo*, se ha detectado una banda de aproximadamente 50 KDa (Savini *et al.*, 2007; 2008).

Los "Hydropathy plot analyses" predicen que las dos proteínas son estructuralmente similares, con 12 dominios transmembrana y con los extremos amino y carboxi terminal localizados en el interior celular, sin embargo, no presentan homología estructural con ningún otro transportador de membrana en mamíferos. La diferencia entre ambas isoformas es que la SVCT2 presenta dos secuencias adicionales de 12 y 44 aminoácidos en el extremo amino terminal, en las posiciones 2 y 38, respectivamente (Liang *et al.*, 2001).

Existen 2 posibles sitios de glicosilación [Asn¹³⁸, Asn¹⁴⁴] para SVCT1 y [Asn¹⁸⁸, Asn¹⁹⁶] para SVCT2 en el loop extracelular entre los dominios transmembrana 3 y 4, y un tercer sitio [Asn²³⁰] sólo para SVCT1 en el “loop” extracelular entre los dominios transmembrana 5 y 6 (Liang *et al.*, 2001). Recientemente se ha descrito que la glicosilación es esencial para que las proteínas SVCTs sean funcionales (Subramanian *et al.*, 2008).

Además, presentan múltiples sitios de fosforilación, en concreto SVCT1 contiene cinco sitios de fosforilación dependientes de protein kinasa C (PKC) y uno dependiente de PKA, mientras que SVCT2 presenta seis sitios dependientes de PKC (Daruwala *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

2.7.3.3. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Ambas isoformas llevan a cabo la captación de ácido L-ascórbico de forma específica, y ni el ácido D-ascórbico, ni el DHA, ni otros derivados de la vitamina C son transportados por las SVCTs. Por otra parte, la capacidad de transporte de estas proteínas depende exclusivamente de la presencia de sodio, ya que la sustitución de este ion por otros como litio o potasio impide el transporte. El pH óptimo de transporte es de 7.5 (Liang *et al.*, 2001), a menor pH disminuye la afinidad de los transportadores por el AA y por lo tanto se reduce el transporte.

Las dos isoformas de SVCT difieren en sus propiedades cinéticas. Los valores de Km obtenidos en diferentes modelos experimentales (para revisión ver Savini *et al.*, 2008) para la SVCT1 humana varían entre 65-237 μ M y para la SVCT2 entre 8-62 μ M. La capacidad de transporte de AA es distinta según los sistemas de expresión utilizados pero, en todos los casos, los valores de Vmax de SVCT1 son mayores que los de SVCT2. Estos resultados han llevado a plantear que SVCT1 es un transportador de alta capacidad y baja afinidad, mientras que el SVCT2 presenta alta afinidad y baja capacidad.

2.7.3.4. VARIANTES NO FUNCIONALES

Se ha descrito la existencia de variantes no funcionales para las SVCT1 y SVCT2 humanas. La variante de SVCT1, identificada en la línea celular Caco-2, de adenocarcinoma de colon humano (Wang *et al.*, 1999) resulta de la lectura de 12 pb adicionales durante el “splicing” alternativo que codifican para la secuencia de aminoácidos VGLH que se inserta entre E-155 y V-156 de la proteína funcional. La

variante de SVCT2 se detectó en las células 293T, derivadas de la línea celular de riñón embrionario humano HEK 293 transfectada con el antígeno T de SV40 (Lutsenko *et al.*, 2004). Esta variante surge de la delección de 345 pb, lo que elimina los dominios transmembrana 5 y 6 y parte del 4. Esta isoforma truncada no es funcional para la captación de AA, sin embargo tiene una función reguladora de la función de SVCT2 y en menor medida de SVCT1 (Lutsenko *et al.*, 2004).

2.7.3.5. ONTOGENIA Y GÉNERO

Existen estudios que indican que la capacidad de captación de AA disminuye con la edad (Brubacher *et al.*, 2000), así los niveles plasmáticos de vitamina C en ancianos son menores que en adultos jóvenes o de mediana edad incluso aunque los ancianos tenían una mayor ingesta de esta vitamina.

Una menor captación de AA se ha observado en hepatocitos aislados de ratas viejas comparas con los obtenidos de ratas jóvenes, y esto se ha relacionado con un descenso en los niveles de expresión de SVCT1, pero no de SVCT2 (Michels *et al.*, 2003).

Al menos en ratones, se ha encontrado que las hembras presentan mayores niveles de AA en plasma, menor excreción en orina y mayores niveles de SVCT1 en los tejidos en los que se expresa esta isoforma (Kuo *et al.*, 2004).

2.7.3.6. DISTRIBUCIÓN TISULAR Y PAPEL FISIOLÓGICO

En todos los tejidos examinados se ha encontrado al menos una isoforma de SVCT. La SVCT1 está muy expresada en hígado, intestino y riñón (Tsukaguchi *et al.*, 1999), mientras que la SVCT2 se caracteriza por su ubicuidad, aunque la expresión es especialmente alta en cerebro, retina, placenta, hueso y cartílago (Rajan *et al.*, 1999; Tsukaguchi *et al.*, 1999).

Intestino

En los enterocitos se han identificado ambas isoformas de SVCTs (Maulen *et al.*, 2003). La SVCT1 se localiza en la membrana apical, por lo que sería responsable de la

captación de AA desde el lumen intestinal (MacDonald *et al.*, 2002), mientras que la presencia de SVCT2 en la membrana basolateral sugiere que capta AA desde la sangre en periodos de reducida o pobre absorción (Boyer *et al.*, 2005).

Hígado

A pesar de la importancia del hígado en el mantenimiento de la homeostasis de la vitamina C y de su papel en la detoxificación de sustancias endógenas y xenobióticas para prevenir el estrés oxidativo, no hay muchos estudios de expresión de SVCTs en el tejido hepático.

Recientemente se ha demostrado que en el hígado humano los niveles de expresión del mRNA de SVCT1 son similares a los de SVCT2 (Savini *et al.*, 2008), mientras que en el hígado de rata la expresión de Svct1 es mayor que la de Svct2 (Michels *et al.*, 2003). La diferencia en los niveles de expresión de la dos isoformas en humanos y en ratas podría deberse a la capacidad de sintetizar AA en los roedores que no existe en humanos.

Riñón

En el riñón, se ha demostrado la presencia de SVCT1 en el borde en cepillo de las células de los túbulos proximales por inmunohistoquímica (Lee *et al.*, 2006), lo que ha permitido sugerir que este órgano podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de esta vitamina a través de una mayor o menor reabsorción de AA.

Cerebro

En el cerebro, la SVCT2 identificada en las células neuroepiteliales del plexo coroideo (Tsukaguchi *et al.*, 1999) permitiría el transporte de AA al líquido cefalorraquídeo y, en un segundo paso, esta misma isoforma facilitaría la captación de esta vitamina por las neuronas (Qiu *et al.*, 2007). Además, algunas células de la neuroglía también expresan este transportador (Mun *et al.*, 2006). La actividad de la SVCT2 es esencial para el desarrollo, la maduración funcional y la defensa frente al estrés oxidativo en las neuronas (Qiu *et al.*, 2007).

Sistema respiratorio

Las dos isoformas de SVCT se han identificado a lo largo del tracto respiratorio, en la membrana apical de las células epiteliales, desde la tráquea a los bronquiolos y en algunos alveolos, por inmunohistoquímica (Jin *et al.*, 2005). Su localización sugiere que las proteínas SVCT transportan AA desde el líquido en “airway surface” a las células (Jin *et al.*, 2005). Además, se ha sugerido que la vitamina C podría participar en la activación del “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel” (CFTR) (Fischer *et al.*, 2004).

Ojo

La proteína SVCT2 es la responsable de la elevada concentración de AA en el cristalino, lo que permite que esta vitamina participe, junto con el glutatión, en la protección frente al estrés fotooxidativo que se produce por la exposición a la luz UV, especialmente en las especies expuestas a la luz diurna (Varma, 1987; Hegde y Varma, 2004). Esto justifica que los valores determinados en humanos se encuentren entre 1-3 mM, mientras que en especies con un comportamiento especialmente nocturno, como los roedores, las concentraciones es de 0.1-0.3 μM .

Hueso

En el tejido óseo también se expresa la SVCT2, y varios factores necesarios para el desarrollo óseo como el Ca^{2+} , el Zn^{2+} y la dexametasona (Wu *et al.*, 2003a; 2003b; Fujita *et al.*, 2001) producen una sobre-expresión de este transportador, lo que favorece la diferenciación de osteoblastos, y la mineralización ósea (Wu *et al.*, 2004). La captación de AA también está mediada por la SVCT2 en los condrocitos humanos, lo que permite la acumulación de esta vitamina necesaria para la síntesis de colágeno (McNulty *et al.*, 2005).

Glándulas adrenales

En las glándulas adrenales, la isoforma SVCT2 permite que este tejido sea uno de los que acumula mayores cantidades de vitamina C del organismo, tanto en la corteza como

en la médula (Patak *et al.*, 2004). El AA es un cofactor necesario tanto para la síntesis de catecolaminas como para la síntesis de hormonas esteroideas.

Piel

En la piel humana se han identificado ambas isoformas; la SVCT1 se encuentra en los keratinocitos de la epidermis, mientras que la SVCT2 está presente en la epidermis y dermis, en keratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Steiling *et al.*, 2007).

Placenta

La vitamina C es necesaria para el desarrollo fetal, así como para la normal progresión de la gestación. Recientemente se ha confirmado la expresión de SVCT2 en las vellosidades coriónicas de placentas humanas de primer trimestre, aunque no a término (Biondi *et al.*, 2007). Este transportador mediaría la transferencia de AA desde el compartimento materno al fetal. En la placenta de rata los niveles de SVCT2 también son mucho mayores que los de SVCT1 (Perez *et al.*, 2008).

2.7.3.7. ALTERACIONES DE LOS NIVELES DE VITAMINA C EN PATOLOGÍAS

Debido al importante papel del AA en diferentes funciones de las células, la deficiencia de vitamina C es la causa de muchas alteraciones entre las que se incluyen: anemia, escorbuto, susceptibilidad a infecciones, sangrado de encías, degeneración muscular, alteración en la cicatrización, hemorragias capilares y formación de placas de ateroma. Cambios neuronales más complejos se han asociado con una deficiencia de vitamina C, como la depresión, hipocondría, histeria y varias alteraciones psicomotoras (Naidu, 2003). Por otro lado, la ingesta excesiva de vitamina C raras veces es tóxica porque el AA y el DHA son muy solubles en agua y se pueden eliminar fácilmente por el organismo. La única posible complicación es la interferencia en la absorción de cobre por el intestino cuando el contenido de vitamina C en la dieta es muy alto (Finley y Cerklewski, 1983). Aunque en el pasado se propuso que el AA favorecía la excreción urinaria de oxalato y la formación de piedras, este concepto, que puede deducirse de la conversión *in vitro* del AA a oxalato durante el almacenaje y procesamiento de las muestras, ha sido descartado (Gerster, 1997). A pesar de que cierta parte del oxalato en la orina deriva del AA

metabolizado, la ingesta de altas dosis de vitamina C no aumenta el riesgo de que se formen piedras de oxalato cálcico en el riñón. Esto es debido probablemente a la existencia de factores fisiológicos reguladores, como una absorción gastrointestinal y reabsorción tubular renal saturables, y el hecho de que la transformación metabólica de AA a oxalato está también limitada (Gerster, 1997). A continuación revisaremos los cambios en el manejo de la vitamina C en diferentes situaciones patológicas. En algunas de ellas, ha sido posible establecer una clara relación con los procesos de transporte, mientras que en otros, sólo se han identificado alteraciones en los niveles séricos o tisulares de la vitamina C.

Diabetes mellitus

Los pacientes con diabetes *mellitus* presentan niveles bajos de vitamina C en suero y leucocitos (Cunningham *et al.*, 1991). Se ha sugerido que la vitamina C participa en la prevención de la glicosilación de proteínas y de la acumulación de sorbitol que inducen un gran daño en tejidos de estos pacientes, como el ojo y el riñón (Will y Byers, 1996).

La diabetes *mellitus* afecta a la homeostasis de la vitamina C debido a la alteración de la concentración de glucosa en sangre y otros fluidos corporales, y a que modifica la capacidad de algunas células de captar glucosa. La hiperglicemia en diabetes, similar a la causada por cirugía y sepsis, puede inhibir competitivamente la captación de DHA mediada por GLUT. Además, se ha sugerido que la diabetes causa una disminución de los niveles de glucosa en algunos tejidos, lo que da lugar a una menor actividad de la ruta de las pentosas fosfato. Esto induce una reducción de los niveles intracelulares de NADPH y glutatión reducido, lo que a su vez produce un desequilibrio entre DHA y AA. Esto junto con la captación de DHA dañada puede ocasionar un incremento en los niveles de DHA en suero y una disminución de la concentración intracelular de AA, en muchos tipos celulares, en particular en leucocitos.

Además del efecto inhibitor agudo, la exposición crónica a la hiperglicemia puede afectar a la captación de vitamina C por una regulación negativa de los transportadores GLUT, principalmente GLUT1 en músculo esquelético (Korcok *et al.*, 2003). Por el contrario, la incubación de células musculares esqueléticas L6 en un medio con bajas concentraciones de glucosa induce una regulación positiva de GLUT, lo que aumenta su capacidad de captación de DHA mediante difusión facilitada (Korcok *et al.*, 2003). Además, la insulina y el factor de crecimiento insulínico I (IGF-I), aunque 10 veces menos

eficaz que la insulina, son capaces de activar el transporte de DHA (Qutob *et al.*, 1998). Además, en la diabetes tipo I, pero también en otras condiciones patológicas como nefropatías, la velocidad máxima de transporte para la captación de DHA está disminuida (Ng *et al.*, 1998). Estos cambios producen un retraso en la captación de DHA y que conduce a un desequilibrio en la regeneración de AA. De acuerdo con esto, en suero y nervio ciático de ratas con diabetes inducida por administración de estreptozotocina, las concentraciones de AA disminuyen, mientras que el DHA aumenta (Obrosova *et al.*, 2001; 2003). Esto tiene importantes repercusiones; por ejemplo, como se necesita un cierto nivel de AA intracelular para la síntesis de colágeno por los osteoblastos (Franceschi *et al.*, 1995), un déficit en la regeneración de AA en estas células puede contribuir a la presencia de osteopenia. Esto concuerda con la observación de que cuando las ratas diabéticas gestantes son alimentadas con una dieta rica en vitamina C, el desarrollo esquelético de sus hijos mejora, y la osteopenia se reduce (Braddock *et al.*, 2002).

Enfermedad ocular

La vitamina C es un importante agente antioxidante en los ojos (Taylor *et al.*, 1991), donde puede contribuir a prevenir o al menos retrasar la formación de cataratas reduciendo el estrés oxidativo (Palmquist *et al.*, 1984). De hecho, se ha encontrado que la capacidad antioxidante en los ojos con cataratas es menor (Jacques y Chylac, 1991), por lo que se ha asociado con un menor contenido de vitamina C (Bron y Brown, 1987).

Además de reducir el riesgo de padecer cataratas, la administración de vitamina C también retrasa el desarrollo de glaucoma (Hankinson *et al.*, 1992) debido en parte a la reducción de la presión intraocular inducida por la vitamina C (Fishbein y Goodstein, 1972). La vitamina C también mejora los síntomas de la retinopatía (Sinclair *et al.*, 1992). De acuerdo con los efectos beneficiosos descritos anteriormente, personas con altos niveles de vitamina C, vitamina E y selenio tienen un 70% menos de riesgo de desarrollar degeneración macular (Sinclair *et al.*, 1992).

Usando células epiteliales de cristalino humanas, se ha descrito que la expresión de SVCT2 aumenta en respuesta a la incubación de los cultivos con el agente pro-oxidante tert-butil hidroperóxido (1,1-dimetiletil hidroperóxido). Los autores de ese estudio sugieren que este sistema de transporte puede estar regulado a nivel de la transcripción por el grado de estrés oxidativo (Kannan *et al.*, 2001).

En las ratas con diabetes inducida por administración de estreptozotocina se ha encontrado una baja capacidad de las células epiteliales pigmentarias de la retina de acumular AA (Salceda y Contreras-Cubas, 2007). En condiciones normales es probable que ocurra con la participación de los transportadores de vitamina C dependientes de sodio. Por esta razón, se ha sugerido que las SVCTs pueden jugar un papel en el estrés oxidativo siendo un importante factor que participa en la patogénesis de la retinopatía diabética (Salceda y Contreras-Cubas, 2007).

Enfermedades cardiovasculares

Las propiedades beneficiosas de la vitamina C juegan un papel crucial en el mantenimiento del estado de salud del sistema cardiovascular. Así, la vitamina C contribuye a mantener bajos los niveles de colesterol en suero y la presión arterial, y protege frente a diferentes agresiones oxidantes (Whitaker, 1985; Trout, 1991; Rath, 1993). Además, la vitamina C inhibe la modificación oxidativa de LDL, que reduce el riesgo de arteriosclerosis (Frei, 1991) y mejora la función arterial debido a su participación en la síntesis de colágeno vascular. Además, la vitamina C previene la adhesión de las células blancas sanguíneas a la pared endotelial de las arterias (Lehr *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1996).

Se ha encontrado en un estudio de una población de USA una cierta asociación inversa de los niveles séricos de AA y la mortalidad (Simon *et al.*, 2001). Esto es probablemente debido en parte a la capacidad de AA de prevenir ataque al corazón por infarto de miocardio y el accidente cerebrovascular (Gale *et al.*, 1995). El mismo estudio también reveló un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular en poblaciones con bajos niveles de AA en suero (Simon *et al.*, 2001).

Infección, cirugía e inflamación

La vitamina C también mejora la defensa contra infecciones. La inmunidad humoral y celular se ven favorecidas por la administración de vitamina C (Leibovitz y Siegel, 1978). Además, la vitamina C también posee un efecto antiviral por la estimulación de la síntesis de interferón (Geber *et al.*, 1975). Sin embargo, un hecho común en muchas infecciones es la presencia de niveles disminuidos de vitamina C en suero y leucocitos (Basu y Schorah, 1982).

En cuanto al efecto anti-inflamatorio, bajos niveles de vitamina C se han asociado con aumento de la concentración de histamina en suero. La suplementación de estos pacientes con vitamina C produce un efecto antihistamínico con una reducción significativa de los niveles de histamina en suero (Bouhuys, 1974). Debido a su actividad anti-oxidante, y probablemente anti-histaminica, la vitamina C es beneficiosa para el tratamiento del asma (McNally, 1953). La vitamina C alivia los espasmos bronquiales causados por estímulos tóxicos o cuando aumenta la tensión del dolor por el ejercicio (Schachter y Schlesinger, 1982).

En los procesos inflamatorios asociados a cirugía, trauma o sepsis hay una disminución de la concentración de AA en suero y leucocitos (Lee *et al.*, 1988; Louw *et al.*, 1992; Borrelli *et al.*, 1996; Schorah *et al.*, 1996; Fain *et al.*, 2003). Por ejemplo, la cirugía ortopédica se ha asociado con un incremento del ratio DHA/AA en orina, lo cual sugiere que el estrés quirúrgico induce la oxidación de AA a DHA (Kubin *et al.*, 2003). Esto es probablemente un reflejo de la situación de las regiones del organismo donde la inflamación es más intensa. Así, en la piel dañada el ratio DHA/AA esta también incrementado (Kim *et al.*, 1994). Como una consecuencia clínica, en muchos pacientes enfermos, la depleción de AA inducida por la cirugía puede ocasionar una hemorragia difusa (Blee *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la alimentación de animales con dietas ricas en AA incluso administrando por vía venosa este compuesto, disminuye la cantidad de vitamina C en tejidos que sufren procesos inflamatorios (Demling *et al.*, 1994). La razón para esta reducción de la entrada de vitamina C a las células se desconoce. Se ha sugerido que las citocinas pro-inflamatorias, como TNF α y IL-1 β son capaces de inhibir la captación de AA por las células endoteliales que expresan Svct2 (Seno *et al.*, 2004).

En astrocitos, cuando el proceso séptico fue mimetizado por incubación con lipopolisacárido y la citokina pro-inflamatoria interferon- γ , se observó una inhibición de la reducción de DHA a AA y de la captación de AA mediado por SVCT2, que dio lugar a una reducción de la capacidad de estas células para mantener los niveles intracelulares de AA (Korcok *et al.*, 2002).

Enfermedades de la piel y sistema esquelético y muscular

En pacientes con artritis reumatoide las concentraciones de vitamina C en sangre son bajas. Esto ha sugerido un papel de esta vitamina en la protección contra el daño

inducido por el proceso inflamatorio en las articulaciones (Lunec y Blake, 1985; Halliwell *et al.*, 1987). Una reducción rápida de la capacidad de la vitamina C en el lugar de la inflamación, como un punto reumático, induce la aceleración del daño proteolítico (Halliwell *et al.*, 1987).

El dolor asociado a una intensa actividad muscular es aliviado por la vitamina C porque éste es debido a la acumulación de radicales libres que dañan el tejido muscular, induciendo inflamación y estimulando los receptores del dolor (Dekkers *et al.*, 1996).

Usando keratinocitos humanos como modelo experimental *in vitro*, se ha observado que la exposición a luz ultravioleta da lugar a un aumento en la capacidad de AA. Esto es debido a la estimulación de la translocación de SVCT1 del citosol a la membrana plasmática. Además, la vitamina C regula la respuesta inflamatoria de la piel expuesta a luz ultravioleta mediante la inhibición de la producción de IL-8 y MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein-1”) (Kang *et al.*, 2007).

Enfermedades gastrointestinales

Se ha sugerido que en pacientes con enfermedad inflamatoria de la mucosa gástrica asociada a gastritis crónica hay una alteración del transporte de vitamina C. La vitamina C está presente en el jugo gástrico a altas concentraciones (Sobala *et al.*, 1989; Schorah *et al.*, 1991) como ocurre en otros epitelios donde la secreción de la vitamina C participa en la defensa contra agresiones oxidantes (Paterson y O’Rourke, 1987). En general, la concentración de vitamina C en el jugo gástrico disminuye en la gastritis crónica. Esto está asociado a la respuesta inflamatoria porque el cambio no se presenta en la gastritis química debido al reflujo duodenal, una patología en la que la invasión de la mucosa gástrica por los leucocitos es pobre. La administración de vitamina C no es capaz de restablecer los niveles de esta vitamina en el jugo gástrico en pacientes con gastritis crónica a pesar del marcado aumento en suero de la vitamina que se encuentra en estos casos. Una hipótesis para explicar estos hallazgos es que en la gastritis crónica hay una alteración en el sistema de transporte encargado de la secreción de AA al jugo gástrico. Otra posibilidad es que la cantidad de vitamina C secretada es normal pero la infiltración leucocitaria y la generación de radicales libres por estas células transforman AA en DHA, el cual es reabsorbido de manera muy eficiente. Además, esta situación se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de estómago (Sobala *et al.*, 1991).

Enfermedades hepáticas

En muchas enfermedades hepáticas existe una mayor necesidad de varias vitaminas, incluyendo la vitamina C, con dos objetivos: ayudar al tejido hepático a restablecer su estructura y/o función, y compensar la disminución de la capacidad de este órgano de almacenar y distribuir vitaminas (Leevy *et al.*, 1970). En la colestasis hepatocelular experimental inducida en ratas por administración de naftil isotiocianato, se ha descrito una disminución del contenido hepático de vitamina C (Ohta *et al.*, 2000). Esto está de acuerdo con hallazgos recientes realizados por nuestro grupo de investigación usando un modelo de hipercolanemia materna en ratas durante la gestación inducida por colestasis obstructiva. Encontramos un aumento en la expresión de Svct1 y Svct2 en hígado materno, fetal y placenta, probablemente como parte de la respuesta al estrés oxidativo y a un aumento del consumo de vitamina C (Perez *et al.*, 2008). Cuando esta situación fue investigada *in vitro* utilizando células de hepatoblastoma humano HepG2, se observó que los ácidos biliares y la bilirrubina, que se acumulan durante la colestasis, son capaces de inducir la expresión de los transportadores de vitamina C. Más concretamente, los ácidos biliares inducen una regulación positiva de Svct2, mientras que la bilirrubina es capaz de aumentar la expresión de Svct1 y Svct2 (Perez *et al.*, 2008).

Cáncer

En cuanto a la prevención del cáncer, dietas ricas en vitamina C reducen de forma eficiente el riesgo de desarrollar cáncer de mama, cérvix, colon, recto, esófago, laringe, pulmón, cavidad oral, próstata y estómago (Block, 1991; 1992; Frei, 1994; Levine *et al.*, 1996; Feiz y Mobarhan, 2002). Sin embargo, se ha descrito que hay una relación entre los niveles en suero de AA y un aumento del riesgo de muerte debido al cáncer. Sorprendentemente esta relación es inversa en mujeres (Simon *et al.*, 2001).

Como conclusión podemos decir que varias circunstancias patológicas pueden afectar la función y/o expresión de los transportadores de vitamina C y como consecuencia alterar la biodisponibilidad de esta vitamina para todo el organismo o sólo para ciertas células específicas. Por otro lado, cambios en la capacidad de los órganos que participan en la homeostasis de la vitamina C de realizar una eficiente captación de AA y DHA puede afectar de forma importante a la capacidad defensiva contra el daño oxidativo o alterar diversas funciones que requieren vitamina C. Aunque el conocimiento sobre el papel actual de los transportadores de vitamina C en muchas enfermedades es escaso, se está llevando a cabo una intensa investigación para aclarar las bases moleculares de estos mecanismos. Futuros avances podrán permitir el desarrollo de actuaciones farmacológicas que modulen la captación de vitamina C y mejorar la biodisponibilidad de este compuesto.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Animales

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratas de la raza Wistar, procedentes del animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca y ratas genéticamente obesas Zucker (*fa/fa*) proporcionadas por la casa comercial Charles River.

Los animales tenían libre acceso tanto al agua como al alimento (preparado comercial de Panlab, Madrid) y se mantuvieron en una habitación a temperatura (20°C) y humedad relativa controladas, con un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Los animales fueron manipulados siguiendo las directivas de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005), así como la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio del NIH (USA, 2002). Todos los protocolos experimentales empleados durante la realización de este trabajo fueron aprobados por el Comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca.

3.1.2. Muestras humanas

Se utilizaron muestras de tejido hepático obtenidas a partir de remanentes de biopsias realizadas con fines diagnósticos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario de Salamanca, y también se consiguieron muestras de tejido hepático sano que rodeaba a piezas quirúrgicas o que quedaba adherido a la cápsula de Glisson en extirpaciones de la vesícula biliar. En todos los casos se había obtenido previamente el consentimiento firmado de los pacientes, y los protocolos habían sido aprobados por el Comité Ético de investigación clínica del área de salud de Salamanca.

Los datos personales de los pacientes fueron tratados con confidencialidad y seguridad, de acuerdo con la normativa basada en la Ley 15/99 (R.D. 994/99).

3.1.3. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular Can-10 obtenida a partir de células Fao de hepatoma de rata tras su cultivo en esferoides (Peng *et al.*, 2006). Estas células se caracterizan por presentar una alta y estable polarización (Decaens *et al.*, 2008).

3.2. PRODUCTOS

Los productos utilizados en este estudio fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales:

- Abbot Laboratorios (Madrid): pentobarbital sódico (Nembutal N.R.).
- Air Liquide (Valladolid): carbógeno y CO₂.
- Amersham Biosciences: reactivos de detección ECL (Enhanced Chemiluminescence) y anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa.
- Applied Biosystems (Madrid): SYBER Green® I Master Mix y “Taqman® Universal PCR Master Mix”, y kit de RNA ribosómico Taqman®.
- B. Braun (Melsungen, Alemania): sutura de seda.
- BioRad (Madrid): acrilamida, marcadores de pesos moleculares de proteínas, membranas de nitrocelulosa, persulfato de amonio, rojo ponceau y TEMED.
- Dako: medio de montaje.
- Invitrogen (Barcelona): Dapi, patrones de DNA para electroforesis (de 25 y 100 bp DNA ladder) y de RNA (de 0.24-9.5 Kb).
- Menarini Diagnostics (Barcelona): portas Optiplus™.
- Molecular Probes (Leiden, Holanda): anticuerpos secundarios fluorescentes anti-IgG de ratón, conejo o cabra marcados con Alexa® 488 ó 594, PicoGreen dsDNA Quantitation Kit y Ribo-Green RNA-Quantitation Kit, para valoración de DNA y RNA, respectivamente.
- Pronadisa: agarosa de resolución normal y de alta resolución MS-8.
- Quiagen (Izasa, Madrid): agente estabilizador (RNA/later) y columnas de extracción del RNA (RNeasy).
- Roche (Barcelona): ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (Hepes) y tripsina.
- Santa Cruz Biotechnology (Barcelona): anticuerpos anti-CD163, anti-citokeratina-7 (CK-7), anti-GAPDH, anti-Svct1 y anti-Svct2.
- Serotec (Madrid): anticuerpos anti-CD163 y anti-Reca1.
- Sigma-Aldrich (Madrid): ácido quenodesoxicólico (QDCA), ácido taurocólico (TCA), ácido ursodesoxicólico (UDCA), albúmina bovina fracción V, azul de Tripán, bromuro de etidio, cocktail antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B),

cocktail de inhibidores de proteasas, dietilpirocarbonato (DEPC), dodecil sulfato sódico (SDS), estreptozotocina, D-glucosa, glutamina, kit Enhanced Avian RT-PCR, medio de cultivo F-12 Coon's, piruvato sódico, y trizma base.

- Sigma Genosys (Cambridge, UK): cebadores o "*primers*".
- T.D.I. (Madrid): Suero bovino fetal.
- El anticuerpo frente a la proteína Oatp4 fue amablemente proporcionado por el Dr. Bruno Stieger, del Hospital Universitario de Zürich (Suiza), y el anticuerpo frente a la ZO-1 por la Dra. Doris Cassio, de la Universidad de Orsay (Francia).

Todos los demás reactivos utilizados fueron del grado requerido para cada caso.

3.3. MEDIOS INSTRUMENTALES

Las pesadas se realizaron en una balanza electrónica digital Precisa 125 A (Pacisa). Para pesar a los animales se utilizó una balanza electrónica digital Precisa, modelo 600C (Pacisa).

El agua utilizada en la realización de los experimentos se purificó mediante un equipo Milli-RO plus 10 y una unidad de agua ultrapura milli-Q plus 185 (Millipore Iberica).

Para la determinación del pH se utilizó un electrodo de pH marca Crison micro pH 2002 (C.R. Marés S.A.).

El material de vidrio utilizado en biología molecular se trató mediante calor seco, durante un mínimo de 4 h, en una estufa termostatzada a 180 °C, modelo S-20 (Selecta).

Las centrifugaciones se realizaron en distintas centrifugas: ultracentrífuga Beckman L8-70, una centrífuga refrigerada Beckman J2-21M (Beckman Instruments), una microcentrífuga Biofugue 13 (Heraeus Sepatach), una Megafuge 1.0 R (Heraeus Sepatach) y una Eppendorf Centrifuga 5417R (Hucoa Erlös).

Para la agitación de tubos se utilizó un agitador Vortex (Ika Works).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2000 (Pacisa+Giralt) provisto de termostatzación mediante un sistema Peltier portacubetas (Temperature Controller SDR 30, Hitachi). Para la cuantificación fluorimétrica se utilizó un fluorímetro Hitachi (Pacisa+Giralt) modelo Fluorescence Spectrophotometer F-4010.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado tipo fuera borda Selecta modelo Unitronic-320 (Pacisa+Giralt).

Para la canulación del conducto biliar común se usaron cánulas de polietileno PE-10 (Biotrol Pharma). El hilo de sutura de seda natural, no absorbible se obtuvo de B. Braun (Melsungen, Alemania).

Los cortes histológicos se realizaron en un criostato (Leica CM1900 UV) y para la visualización de la fluorescencia se utilizó un microscopio confocal LSM 510 de la casa Zeiss.

La homogenización de tejidos y células se realizó en un homogeneizador tipo Potter (B. Braun) o en un homogenizador Polytrón PT 2100 (Kinematica AG).

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un termociclador Robot Cycler gradient 96 de Stratagene. Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un aparato ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Las electroforesis de DNA en geles de agarosa se realizaron en un sistema de geles horizontales sumergidos modelo MT-1001 de la casa Ecogen. El transiluminador empleado para la visualización de los ácidos nucleicos fue el modelo Gel Doc 2000 (BioRad) perteneciente al instituto de Microbiología/Bioquímica (CSIC/ Universidad de Salamanca).

Las electroforesis de proteínas en geles SDS-poliacriamida se realizaron en un aparato Bio-Rad Mini Gel, y la electrotransferencia en un modelo mini Trans-Blot Transfer Cell conectado a una fuente de alimentación modelo Power Pac 3000 (BioRad). Las membranas utilizadas para la realización de los western blots fueron de nitrocelulosa de 0.45 μm (BioRad).

Para el revelado de las películas de autorradiografía se utilizó la máquina de autorrevelado modelo M35 X-OMAT processor de Kodak.

Las muestras se conservaron en un congelador de -80°C marca Revco (Pacisa+Giralt) y en contenedores de nitrógeno líquido.

El manejo de células se realizó en una campana de flujo laminar vertical modelo Telstar AV 30/70 (Telstar Industrial). Las células se mantenían a 37°C en una estufa en ambiente de CO_2 modelo New Brunswick Scientific (Pacisa+Giralt) y se observaban a través de un microscopio Leitz Fluovert F S (Leitz). La esterilización de soluciones para cultivo se hizo mediante filtros Sterivex de 0.22 μm (Millipore Iberica, Madrid). Las placas de cultivo de 3 cm, 10 cm y de 96 pocillos así como los frascos Roux de cuello inclinado de 40 y 260 ml eran de la marca Nunc (Biotech S.L.). El material de cultivos se esterilizaba en un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Pacisa+Giralt).

3.4. MODELOS EXPERIMENTALES

3.4.1. Estudio ontogénico

Se utilizaron ratas hembras preñadas y sus crías. Tras el parto, las crías se mantuvieron con sus madres hasta el día 21 de vida, momento en el que fueron destetadas y pasaron a alimentarse con pienso comercial.

En las distintas camadas se fueron separando crías en los días 0, 7, 14, 21, y tras el destete, a los 28 y 56 días. Además, se utilizaron ratas de 9 y 24 meses de vida. De estos animales, bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/Kg p.c.), se extrajeron muestras de tejido hepático que se sumergieron inmediatamente en RNA^{later}® para conservar el RNA.

3.4.2. Modelos de colestasis

La colestasis obstructiva se indujo quirúrgicamente en animales anestesiados con furano. Tras afeitar el campo operatorio, se desinfectaba con tintura de yodo y se practicaba una laparotomía media de 4-5 cm desde el cartílago xifoides. Seguidamente, se disecaba el conducto biliar común, se realizaba una doble ligadura y se cortaba entre las dos. A continuación, se cerraba la cavidad abdominal por planos con sutura continua en el peritoneo y músculo, y con puntos individuales en “U” en el caso del plano cutáneo. La región abdominal se impregnaba exteriormente con violeta de genciana para evitar posibles infecciones. Los animales se sacrificaron al cabo de 1 semana o tras 8 semanas.

En los animales control, tras localizar y disecar el conducto biliar, se cerraba de igual forma la cavidad torácica.

3.4.3. Modelo de diabetes

La diabetes se indujo por tratamiento con estreptozotocina (6 mg/100 g p.c.) por vía i.p. (García-Marin *et al.*, 1988) y se recogieron muestras a los 6 días. Se determinó la glucemia antes de la administración de estreptozotocina, y los días 3 y 6 para confirmar que los animales habían desarrollado diabetes (presentaban niveles de glucosa en suero superiores a 200 mg/dl).

Los animales control recibían únicamente el vehículo, solución salina, por vía i.p.

3.4.4. Modelo de esteatosis

Como modelo de esteatosis utilizamos las ratas obesas y diabéticas Zucker (*fa/fa*), que son homocigóticas para la sustitución de glutamina por prolina en el dominio extracelular de su receptor OB (Carpenter *et al.*, 1998; Unger y Orci, 2000), lo que produce una drástica reducción de la expresión del receptor OB-R en la superficie celular, y por tanto una menor unión de la hormona.

Estas ratas son hiperfágicas y obesas y muestran niveles elevados de triglicéridos y glucocorticoides en suero (Cusin *et al.*, 1996).

En todos los casos, los animales de los distintos grupos experimentales se sacrificaron bajo anestesia con pentobarbital sódico (50 mg/Kg p.c.), se obtuvo sangre de la vena cava para posteriormente realizar una analítica completa en suero y además, se recogieron muestras de hígado para extraer RNA total, y se almacenaron piezas de tejido para procesarlas para Western blot o para inmunofluorescencia.

3.5. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS DE RATA

Para el aislamiento de hepatocitos de rata se siguió una adaptación del método de Berry (Berry y Friend, 1969; Berry *et al.*, 1991) con algunas modificaciones (Monte *et al.*, 1999).

Como donantes de hepatocitos se utilizaron ratas macho de peso comprendido entre 180-200 g a las que se privaba de alimento la noche anterior. El acceso al agua era libre en todo momento.

Para el aislamiento de hepatocitos se siguió la técnica de perfusión con colagenasa, en una preparación quirúrgica similar a la utilizada para preparaciones de hígado de rata aislado y perfundido "in situ" (Marin *et al.*, 1991).

Se iniciaba el proceso anestesiando al animal con pentobarbital sódico vía intraperitoneal con una dosis de 50 mg/kg p.c.

Una vez afeitado y desinfectado el campo operatorio con alcohol al 70%, se practicaba una laparotomía ventral media. Posteriormente, se situaban hilos para llevar a cabo ligaduras en la vena gastroduodenal y la arteria hepática, así como en la vena porta y la vena cava inferior justo por encima de los pedículos renales. Se procedía entonces a la canulación de la vena porta, a través de la cual se comenzaba una pre-perfusión con PBS sin calcio (previamente gaseado con carbógeno y estabilizado a 37°C). Rápidamente, se cortaba la vena cava inferior a nivel abdominal y se cerraban todas las vías de salida excepto la vena cava inferior, en la que se insertaba una cánula a través de la aurícula derecha. Esta primera perfusión se mantenía, de manera no recirculante, durante 10 minutos, a una velocidad aproximada de 40 ml/min.

El siguiente paso era la perfusión del hígado con la solución de colagenasa en sistema recirculante durante 7 minutos. Después, se extraía el hígado y se colocaba en un crisol que contenía 10 ml de la solución de colagenasa y se disgregaba el tejido con cuidado diluyendo después con PBS con calcio hasta aproximadamente 200 ml; la suspensión resultante se hacía pasar a través de tres mallas de diferente tamaño, eliminando los restos más grandes de tejido.

Para separar los hepatocitos vivos de las células no parenquimales y de los hepatocitos dañados o muertos se realizaban cuatro centrifugaciones a 43 xg durante 2 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendía en PBS con calcio, excepto en la tercera centrifugación en la que se resuspendía en PBS con calcio y albúmina. La quinta y última centrifugación se hacía en las mismas condiciones durante 4 minutos usando tubos tarados para poder calcular el peso del precipitado húmedo, que posteriormente se resuspendía en medio Earle's.

Para el conteo de las células, se recogía una alícuota que se teñía con azul de tripán (al 0.4% en PBS, pH 7.4) y se llevaba a una cámara de Neubauer para determinar el

porcentaje de células vivas (no teñidas) y muertas (de color azul intenso) y conocer la viabilidad de la preparación.

Si el porcentaje de hepatocitos vivos era elevado ($\geq 85\%$), se utilizaba una alícuota para extraer RNA y utilizarlo como calibrador en las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real.

3.6. CULTIVO DE CÉLULAS CAN-10

Las células Can-10 se cultivaron en medio F-12 Coon's modificado al que se añadía suero bovino fetal inactivado por calentamiento durante 30 minutos a 56°C (al 10%) y mezcla de antibióticos y antimicóticos: penicilina (20 U/ml), estreptomycin (0.02 mg/ml) y anfotericina B (0.05 µg/ml).

Tanto al recibir las células, como al recuperarlas del nitrógeno líquido en el que se almacenaban, la descongelación de los criotubos se hacía en condiciones de esterilidad en baño maría a 37°C. Una vez descongeladas, se centrifugaban a 250 xg durante diez minutos. El precipitado se resuspendía en el medio de cultivo correspondiente y se pasaba a frascos Roux que se introducían en la estufa a 37°C, en atmósfera del 5% de CO₂ en aire y humedad relativa del 80%.

El crecimiento de las células se producía tras la adhesión a la superficie de la placa. Una vez sobrecrecido el cultivo, se realizaba una tripsinización (siguiendo las instrucciones del proveedor) para desprender las células de la placa de cultivo, y así, poder realizar los pases, sembrar en las placas adecuadas, o bien congelar alícuotas para su almacenamiento.

Efecto de la exposición a ácidos biliares sobre los niveles de expresión de Svcts y Oatps

Para estudiar el efecto de la exposición de las células Can-10 a los ácidos biliares taurocólico (TCA), tauroquenodesoxicólico (TQDCA), taurodesoxicólico (TUDCA), las células se sembraron a una densidad de $3.5 \times 10^3/\text{cm}^2$ en placas Petri de 10 cm de diámetro o en cubres. Las células cultivadas en placas se utilizaron para extraer RNA y las crecidas en cubres para inmunofluorescencia (Cassio *et al.*, 2007).

Las soluciones stock (5 mM) de los ácidos biliares se prepararon solución salina estéril. Las células se cultivaron durante 3 días. Se sembraron en medio normal y a las 24h se cultivaron sin (Control) o con TCA, TQDCA, o TUDCA (50 µM).

3.7. EXPRESIÓN DE mRNA POR RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

3.7.1. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

Para la extracción del RNA de las muestras se utilizó el método comercial *RNAeasy® spin columns* (Quiagen), que permite extraer RNA total a partir de homogenados de tejidos o extractos celulares. La técnica se basa en la unión del RNA a las membranas de sílica-gel de las columnas de extracción y su posterior lavado y elución con solventes adecuados. Las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

En primer lugar las muestras biológicas se lisan y homogenizan en un tampón desnaturante, buffer *RLT* suplementado con β -mercaptoetanol, que contiene isotiocianato de guanidina que inactiva inmediatamente las RNAsas, asegurando la integridad del RNA durante la extracción. En este trabajo se procesaron unos 20 mg de tejido, y aproximadamente 6×10^6 de células. Tras la homogenización en un tampón desnaturante y centrifugación para eliminar los posibles restos de tejidos o membranas que pudieran obstruir las columnas de extracción, se añadía etanol para proporcionar las condiciones adecuadas de retención, y las muestras se aplicaban a las columnas, donde el RNA se une a las membranas y los contaminantes se eliminan por lavados y centrifugaciones sucesivas. Finalmente, el RNA total se eluía de las columnas con agua ultrapura.

3.7.2. VALORACIÓN DEL RNA Y COMPROBACIÓN DE SU INTEGRIDAD

La concentración del RNA total se valoró por fluorimetría utilizando el método comercial RiboGreen RNA-Quantitation Kit. La técnica se basa en la utilización del reactivo RiboGreen, que se une específicamente al RNA y emite fluorescencia de forma proporcional a la cantidad de RNA presente en la muestra. La fluorescencia se cuantificó en un fluorímetro a una $\lambda_{\text{excitación}}$: 500 nm y una $\lambda_{\text{emisión}}$: 525 nm.

La integridad del RNA extraído se comprobó por visualización tras electroforesis en geles desnaturantes de agarosa al 1%. Todo el material utilizado en la realización de los geles fue convenientemente tratado para eliminar RNAsas y evitar así la degradación del RNA.

En cada calle del gel se cargaba una alícuota de RNA diluido con una solución de carga que contenía bromuro de etidio, un agente que emite fluorescencia cuando se une a los ácidos nucleicos. En la primera calle se cargaba un estándar comercial de pesos moleculares de RNA. La electroforesis se realizó en tampón MOPS a un voltaje constante

de 50 V. Al finalizar, los geles se fotografiaron en un transiluminador, y se consideró que no había degradación si eran visibles de forma nítida y localizada, las bandas correspondientes al RNA ribosómico 18S y 28S.

3.7.3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Para obtener el DNA complementario (cDNA) a partir del RNA total extraído, se realizó una RT mediante el método comercial Enhanced Avian RT-PCR Kit, que utiliza una transcriptasa reversa obtenida del virus de la mieloblastosis de las aves, AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase).

El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar 2 µg de RNA se incubaron durante 10 min a 70°C con una mezcla de desoxinucleótidos fosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y random nonámeros, que actúan como cebadores o *primers* de la transcripción. A continuación se añadió la enzima transcriptasa reversa en un tampón adecuado y las muestras se incubaron primero durante 15 min a 25°C, y a continuación 50 min a 46°C, para que se llevase a cabo la síntesis del cDNA. Por último, se calentaban las muestras 5 min a 95°C, para inactivar la retrotranscriptasa, evitando así su posible interferencia en pasos posteriores.

3.7.4. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

3.7.4.1. Fundamento

La PCR cuantitativa a tiempo real es una técnica que no sólo amplifica una secuencia específica de DNA, sino que permite medir el producto acumulado en la PCR a tiempo real y calcular el número de copias inicialmente presentes en la reacción. Esta técnica se llevó a cabo en un termociclador ABI Prism 5700 (Applied Biosystems).

Como la PCR es un proceso exponencial, pequeñas diferencias en la eficiencia de cada ciclo pueden producir grandes diferencias en la cantidad de producto amplificado. Por eso, los métodos que sólo determinen la cantidad acumulada de producto al final de la PCR no son fiables a la hora de cuantificar el número de copias de partida de un DNA en la muestra. La PCR cuantitativa a tiempo real permite cuantificar el producto durante la fase exponencial del proceso, cuando todos los componentes de la reacción están en exceso y no son limitantes.

Cuanto mayor sea la concentración inicial de la secuencia a amplificar, menor será el número de ciclos necesarios para alcanzar un nivel concreto de producto. Se define el Ct (*Cycle threshold* o ciclo umbral) como el primer ciclo de la PCR durante el que se detecta un aumento estadísticamente significativo de la fluorescencia por encima de un umbral arbitrario y que se obtiene en la fase de crecimiento exponencial de la PCR. Este valor de Ct es inversamente proporcional al número de copias del gen diana presente en la muestra, cuantas más copias iniciales menos ciclos se requieren para alcanzar la fase exponencial de amplificación. Si la amplificación en la PCR es exponencial, produciéndose el doble de producto en cada ciclo, la pendiente de la recta que relaciona el Ct con el logaritmo del número de copias de DNA presentes en la muestra, será -3.3, ya que se requieren 3,3 ciclos para generar un incremento de 10 veces en el producto. Si la amplificación es menos eficiente la pendiente será mayor.

El SYBR Green I contenido en la mezcla de reacción utilizada es un fluorógeno genérico que se une al surco menor de cualquier doble hélice de DNA generada durante la amplificación y al hacerlo, aumenta enormemente su fluorescencia. Una amplificación no específica o la formación de dímeros entre los primers pueden hacer que se produzcan errores significativos en la cuantificación de pequeñas cantidades iniciales de DNA molde. Por ello, para confirmar la especificidad de los productos amplificados en la PCR, al terminar ésta se puede programar una secuencia de desnaturalización, en la que la temperatura se va aumentando progresivamente mientras se registra la fluorescencia. Así, en la curva que se obtiene al representar la primera derivada de la absorbancia frente a la temperatura, sólo debe obtenerse un pico, que corresponderá a un único producto de DNA amplificado durante la PCR.

En el caso de que no se obtenga un único producto de DNA con el método anterior, se puede recurrir a otro sistema de detección, utilizando sondas Taqman. Se trata de diseñar un oligonucleótido específico complementario a una de las cadenas de DNA a amplificar y situado entre los primers previamente diseñados. Esta sonda debe marcarse con dos fluorocromos, uno en 5' (*reporter*) y otro en 3' (*quencher*). Mientras la sonda permanezca intacta, la proximidad del *quencher* hace que la emisión del *reporter* no se detecte. Sin embargo, a medida que la reacción progresa, la sonda va hibridando con el DNA y la actividad 5'-3' exonucleasa de la AmpliTaq DNA polimerasa libera al *reporter*, que produce fluorescencia de intensidad proporcional al producto obtenido.

Los niveles de expresión de mRNA generalmente se miden como proporción respecto a un gen de referencia o normalizador, un *housekeeping gene*, después de comprobar que ese gen no se afecta por el tratamiento utilizado o no varía en los distintos tejidos que se quieren comparar. El normalizador permite corregir las pequeñas variaciones que

puedan producirse en el proceso de obtención de RNA y en la RT. En este trabajo, se han utilizado como normalizadores la β -actina o el RNA ribosómico 18S, que se midió utilizando los reactivos *Taqman Ribosomal RNA Control Reagents Kit* (Applied Biosystems) y la mezcla de reacción *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

3.7.4.2. Diseño de *primers* de la PCR cuantitativa a tiempo real

Los *primers* específicos para el DNA codificante de cada una de las proteínas a estudiar se diseñaron con el programa Primer Express (Applied Biosystems) y su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El programa busca *primers* teniendo en cuenta las siguientes pautas:

- Mantener el contenido de G-C en el rango de 20-80%.
- Evitar varios nucleótidos idénticos seguidos, especialmente para la guanina (<4G).
- La temperatura de desnaturalización (T_m) debe estar entre 58-60 °C.
- Los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' no deben tener más de 2 G o C.

Para la sonda Taqman además de lo anterior se recomienda:

- El extremo 5' no debe comenzar por G.
- La temperatura de desnaturalización (T_m) debe estar entre 68-70 °C.
- El *primer forward* debe estar próximo a la sonda pero sin que se superponga.

Los *primers* diseñados fueron suministrados por Sigma-Genosys. Antes de su uso, se disolvieron en agua ultrapura y se valoraron en un espectrofotómetro a una λ : 260 nm.

3.7.4.3. Realización de la PCR cuantitativa a tiempo real

Una vez obtenido el cDNA mediante RT se diluyó 1:5 con agua. Se procesaron 2 μ l de acuerdo con las especificaciones del Kit comercial SYBR Green y/o Taqman. Se optimizaron las condiciones de reacción (concentración de *primers*, temperatura y número de ciclos) para cada pareja de primers.

Tras finalizar la PCR, cuando se utilizó SYBR Green, se incluyó un gradiente de temperatura de 60°C a 95°C para analizar las curvas de desnaturalización con el fin de observar la especificidad de los productos amplificados.

3.7.4.4. Especificidad de la PCR cuantitativa a tiempo real

Además de las curvas de desnaturalización, la especificidad de la PCR se comprobó mediante electroforesis de los productos amplificados, así como de los blancos de reacción en geles de agarosa no desnaturalizante. Se prepararon geles de agarosa al 2.5% en tampón TAE conteniendo bromuro de etidio. Se cargaron 20 μ l de la mezcla final de PCR en cada calle, así como un estándar comercial de ADN. Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón TAE a voltaje constante (60 V), y a continuación los geles se observaron y fotografiaron en un transiluminador acoplado a una cámara de vídeo e impresora.

3.7.4.5. Cálculos de la PCR cuantitativa a tiempo real

La abundancia del DNA problema en cada muestra se corrigió por la del normalizador determinado paralelamente en cada muestra. Las determinaciones se realizaron siempre por triplicado y se incluyeron blancos de reacción, es decir, tubos en los que se sustituyó el cDNA por agua ultrapura. Para cuantificar se realizaron curvas de calibrado utilizando diluciones seriadas de un cDNA obtenido por RT a partir de hepatocitos (calibrador), concretamente hepatocitos de rata macho adulta sana en la medida de la expresión de las proteínas Svct1, Svct2, Oatp1, Oatp2 y Oatp4. En el caso de las proteínas humanas SVCT1, SVCT2, OATP-A; OATP-8 y OATP-C se utilizó cDNA obtenido de hígado humano. Los resultados se expresaron siempre como abundancia relativa con respecto a la determinada en las muestras control, que se consideró del 100%. Para calcular el porcentaje de abundancia del mRNA de una muestra respecto al calibrador, se usa la siguiente fórmula:

$$(\%) = 2^{-n}, \text{ donde } n = \Delta\Delta Ct \quad \text{siendo } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_c$$

$$\Delta Ct_m = Ct \text{ del gen diana en la muestra} - Ct \text{ del gen normalizador en la muestra}$$

$$\Delta Ct_c = Ct \text{ del gen diana en el calibrador} - Ct \text{ del gen normalizador en el calibrador}$$

3.8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

3.8.1. OBTENCIÓN DE CORTES DE TEJIDO

Los fragmentos de tejido que se obtenían de los animales bajo anestesia se congelaban por inmersión rápida en N₂ líquido y a continuación las muestras se almacenaban a -20°C.

Los cortes de tejidos de 5 µm se realizaron en un criostato a una temperatura entre -20°C y -15°C y se colocaron en portas, que se guardaron a -20°C hasta su procesamiento.

3.8.2. INMUNOFLUORESCENCIA

Tras secar al aire los portas durante 2 horas, las muestras se fijaban con metanol frío durante 3 min, y tras 3 lavados rápidos, se realizaba un bloqueo con suero bovino fetal al 10% en PBS durante 30-40 min.

La incubación con los primeros anticuerpos diluidos en PBS con 5% de suero bovino fetal se realizó a temperatura ambiente durante 1h. La siguiente tabla muestra las diluciones de los anticuerpos primarios utilizados en este estudio:

Anticuerpo primario	Especie	Dilución
Anti-CK-7	ratón	1:100
Anti-CD163	ratón	1:50
Anti-Oatp4	conejo	1:200
Anti-Reca1	ratón	1:20
Anti-αSMA	ratón	1:200
Anti-Svct1	cabra	1:100
Anti-Svct2	cabra	1:100

A continuación se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y se llevó a cabo la incubación, durante 1h en oscuridad, con los anticuerpos secundarios apropiados en cada caso anti-IgG de ratón, conejo o cabra conjugados con Alexa 488® o Alexa 594® (diluidos 1:1000) y Dapi para teñir los núcleos (diluido 1:5000).

Tras tres lavados con PBS de 10 min, se realizó el montaje con Dako Fluorescent Mounting Medium. Se colocó el cubre objetos y se selló con laca de uñas. La visualización del marcaje se realizó con un microscopio confocal.

Controles negativos

Para comprobar la especificidad de la técnica de inmunofluorescencia se han llevado a cabo los siguientes controles negativos:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.
- Omisión de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia para detectar autofluorescencia del tejido o de los anticuerpos primarios.
- En los casos de doble marcaje, incubación de cada anticuerpo primario con el secundario del otro anticuerpo primario para detectar uniones cruzadas.

3.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Reactivos

- Gel de poliacrilamida-SDS constituido por un gel inferior o *separador* (poliacrilamida 7.5%) y un gel superior o *concentrador* (poliacrilamida 4%).
- Tampón RIPA: PBS, nonidet 1% (p/v), desoxicolato sódico 0.5% (p/v), SDS 0.1% (p/v).
- Tampón T-PBS: PBS suplementado con 0.5% (v/v) de Tween-20.
- Solución de bloqueo: T-PBS suplementada con 5% (p/v) de leche descremada.
- Solución de incubación: T-PBS suplementado con 1% (p/v) de leche descremada.
- Reactivos de detección ECL (*Enhanced ChemioLuminiscence*) de la casa Amersham Biosciences, que incluye los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y los reactivos de detección 1 y 2.
- Tampón de electroforesis: Tris 0.025 M, L-glicina 0.192 M y 1% SDS.
- Tampón de transferencia: Tris 0.025 M, L-glicina 0.192 M y metanol 20% (v/v), pH 8.3.

Obtención de homogenados tisulares

Se homogeneizaron trozos de tejido utilizando un politrón, sobre hielo, en tampón RIPA suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas, y se incubaron sobre hielo durante 20 min. A continuación, esta suspensión se centrifugó a 4 °C y 20.000x g durante 20 min, y el sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su utilización.

3.9.1. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Tras cuantificar la concentración de proteínas totales en las muestras obtenidas en tampón RIPA, se procedía al procesamiento de dichas muestras tratándolas con un volumen igual al suyo de Tris-HCl 0.25 M pH 6.8 conteniendo SDS 5% (p/v), 0.1 µl de azul de bromofenol al 4% (p/v) por cada µl de muestra, 0.05 µl de glicerol por cada µl de muestra y añadiendo 0.025 µl de 2-mercaptoetanol como agente reductor. Se incubaban durante 5 min en un baño de agua hirviendo y, antes de hacer la electroforesis, se centrifugaban 1 min a 20.000x g.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 7.5% en Tris-HCl, a una corriente constante de 10 mA para el gel *concentrador*, incrementándose a 20 mA para el

gel *separador*. La cantidad de proteína total de cada tipo de muestra cargada en las calles de un mismo gel fue en todos los casos de 50 µg.

Terminada la electroforesis se procedió a la transferencia a una membrana de nitrocelulosa en cámara húmeda a 250 mA durante 90 min utilizando tampón de transferencia (Towbin *et al.*, 1992).

3.9.2. INMUNODETECCIÓN

La membrana se sometía al siguiente procedimiento a temperatura ambiente: se realizaba el bloqueo durante 60 min con leche descremada al 5% (p/v) en T-PBS en agitación. Acto seguido se lavaba la membrana con T-PBS en agitación durante 5 min, y se incubaba durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente, también en agitación continua. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios, en las diluciones indicadas por los proveedores:

Anticuerpo primario	Especie	Dilución
Anti-GAPDH	ratón	1:1000
Anti-Svct1	cabra	1:300
Anti-Svct2	cabra	1:300

Tras lavar la membrana con T-PBS (4 lavados de 15 min, en agitación), se incubaba durante 60 min en agitación con el anticuerpo secundario adecuado marcado con peroxidasa y diluido en la solución de incubación según las indicaciones del proveedor. A continuación se procedía de nuevo al lavado de la membrana con T-PBS en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Se eliminaba el exceso de tampón T-PBS y se procedía a la detección mediante incubación de la membrana durante 1 min, sin agitación, con los reactivos de detección ECL 1 y 2 mezclados a partes iguales (volumen requerido, 0.125 ml/cm²). Se eliminaba el exceso de reactivos 1+2, se envolvía la membrana en papel de plástico y se exponía a una película de autorradiografía el tiempo necesario para encontrar una señal detectable y poco ruido de fondo.

3.10. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.10.1. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO

Se determinaron marcadores de daño hepático y renal en muestras de suero en un Vitros 5,1 FS Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnostics, Barcelona) y un Analizador Modular DPP (Roche Diagnostics, Barcelona).

3.10.2. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS BILIARES EN SUERO POR FLUORESCENCIA

La extracción de los ácidos biliares del suero, para su posterior determinación por fluorescencia requería la separación de las proteínas. Para ello se diluía el plasma con un medio alcalino (1:4) y se calentaba a 64°C durante 2 horas. Como medio alcalino se utilizó NH_4HCO_3 0.4M (Herranz y Codoceo, 1985). Posteriormente se extraían con 4 ml de metanol por cromatografía en cartuchos Sep-Pak con relleno C18.

Se dejaba secar el extracto y se resuspendía en 200 μl de metanol, de los cuales 10 ó 20 μl se utilizaban para el análisis de ácidos biliares totales.

Los ácidos biliares totales en suero se determinaron siguiendo el método de Talalay (1960) modificado por Mashige *et al.* (1976). Esta determinación aprovecha la existencia de grupos hidroxilo en posición 3α del núcleo esteroideo de los ácidos biliares, para oxidarlos a grupos ceto en presencia de NAD por acción de la enzima 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que convierte el NAD en NADH, para posteriormente regenerar el NAD a partir de NADH, utilizando el poder reductor de esta reacción y transformar resazurina en resorfina, en presencia de diaforasa. La resorfina es una sustancia fluorescente que da una señal más intensa que la absorción de luz por el NADH. Este método permite determinar concentraciones de ácidos biliares entre 0 y 100 μM .

La fluorescencia se medía en un fluorímetro Hitachi a una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión de 585 nm ("Band Pass" 5 nm). La recta patrón se realizó utilizando concentraciones de ácido taurocólico entre 5 y 100 μM .

3.10.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para medir la concentración total de proteínas se utilizó el método de Markwell (Markwell *et al.*, 1978), que es una modificación simplificada del método de Lowry (Lowry

et al., 1951). Se basa en la reducción de las proteínas con cobre en medio alcalino y la posterior reducción del ácido fosfomolibdico fosfotúngstico con las proteínas tratadas.

Reactivos:

- Patrón de albúmina: solución madre de seroalbúmina bovina (fracción V, Sigma) en agua destilada, 25 mg/100 ml.
- Reactivo A: carbonato sódico 2%, hidróxido sódico 0.4%, tartrato sódico 0.16% y dodecil sulfato sódico 1%.
- Reactivo B: sulfato de cobre 4%.
- Reactivo C: mezcla de los reactivos A y B en proporción 100:1 (A:B).
- Reactivo D: dilución del preparado comercial Folin Ciocalteu al 50% en agua destilada.

Procedimiento

En cada tubo de ensayo se añadían 200 μ l de agua destilada, 50 μ l de muestra problema diluida adecuadamente en PBS y 750 μ l de reactivo C. Tras agitar e incubar durante 15 min a temperatura ambiente, se añadían 75 μ l de reactivo D. A continuación se agitaban de nuevo y se incubaban a temperatura ambiente, protegidas de la luz durante otros 15 min. Transcurrido ese tiempo se procedía a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a una λ : 660 nm.

Para calcular la concentración de proteínas presente en las muestras, se elaboró una recta patrón utilizando una solución madre de seroalbúmina bovina con un rango de concentraciones de: 12.5, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 μ g/ml. La concentración final de proteína, una vez tenidas en cuenta las diluciones realizadas, se expresó en mg/ml.

3.11. ESTUDIO HISTOLÓGICO. MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras de hígado se cortaron en bloques de aproximadamente 1 cm de espesor y se congelaron inmediatamente en N₂ líquido.

De cada muestra se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor que tras ser fijados en paraformaldehído durante 1 hora, se tiñeron por el método clásico de hematoxilina-eosina, se deshidrataron por inmersión en soluciones crecientes de alcohol y por último en xilol, y se realizó el montaje con entellán para su estudio al microscopio óptico.

3.12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM).

Para calcular la significación estadística de la comparación entre dos medias se utilizó el test de *t*-Student para valores independientes o para valores apareados, según el tipo de experimento. Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las correlaciones se obtuvieron por el método de los mínimos cuadrados. Para el análisis estadístico se utilizó un ordenador Macintosh G5 (Apple Computer, Inc., Cupertino, CA).

4.1. LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SVCTS EN EL TEJIDO HEPÁTICO DE RATA

Durante los últimos años, tras la clonación y caracterización funcional de las isoformas de proteínas transportadoras de vitamina C dependientes de sodio de la familia SVCT (SVCT1 y SVCT2), en la rata (Tsukaguchi *et al.*, 1999) y en humanos (Daruwala *et al.*, 1999), se han publicado varios estudios sobre la distribución tisular y el papel fisiológico de estas dos proteínas (para revisiones ver Savini *et al.*, 2008, Marin *et al.*, 2009).

En todos los tejidos estudiados, tanto en humanos como en el ratón o en la rata, se ha detectado al menos una de las isoformas de SVCT.

Como se ha comentado con detalle en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la proteína SVCT1 está muy expresada en intestino, riñón, e hígado (Tsukaguchi *et al.*, 1999), mientras que la SVCT2 se caracteriza por su ubicuidad, aunque es más abundante en tejidos especializados y metabólicamente muy activos como cerebro, retina, y células del hueso y del cartílago (Rajan *et al.*, 1999; Tsukaguchi *et al.*, 1999). Algunos tejidos, como el pulmón, el intestino y la placenta expresan ambas isoformas (Boyer *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2005; Perez *et al.*, 2007; 2008).

En el tejido hepático de rata se han detectado las dos isoformas a nivel de mRNA (Kuo *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2007; 2008) y se ha descrito que la expresión de Svct1 es mayor que la de Svct2 (Kuo *et al.*, 2001, Perez *et al.*, 2007), mientras que en el hígado humano los niveles de expresión del mRNA de la isoforma SVCT2 son ligeramente mayores que los de SVCT1 (Savini *et al.*, 2008).

A pesar de la importancia del hígado en el mantenimiento de la homeostasis de la vitamina C, y de la relevancia de esta vitamina en la detoxificación de sustancias endógenas y xenobióticos en el hígado para prevenir el estrés oxidativo, no hay datos de estudios de distribución de las SVCTs en el tejido hepático, similares a los que se han llevado a cabo en pulmón (Jin *et al.*, 2005), cerebro (Mun *et al.*, 2006) y riñón (Lee *et al.*, 2006) y que han sido de gran utilidad para comprender la función de cada isoforma de este transportador en los distintos tejidos.

Por esta razón, como primer objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral nos planteamos estudiar la distribución celular de las isoformas de proteínas transportadoras de vitamina C dependientes de sodio de la familia SVCT en el hígado de rata utilizando las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal.

Para ello, en primer lugar fue necesario elegir marcadores adecuados para identificar las distintas poblaciones celulares del hígado y poner a punto las condiciones de los anticuerpos seleccionados. Para los hepatocitos se seleccionaron dos anticuerpos; uno frente a la isoforma 4 de la proteína transportadora de aniones orgánicos (Oatp4), localizada exclusivamente en la membrana basolateral de estas células (Cattori *et al.*, 2001), con la peculiaridad de que la expresión es mayor en los hepatocitos pericentrales que en los periportales (Donner *et al.*, 2007), y otro frente a la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos 2, (Mrp2), presente en la membrana canalicular y responsable de la secreción a bilis de bilirrubina conjugada (Keppler y König, 1997).

La figura 1 muestra imágenes de microscopía confocal obtenidas en un corte de hígado control marcado conjuntamente con los dos anticuerpos. Se observa el marcaje característico de las membranas basolateral (en verde, 1A) y canalicular (en rojo, 1B) de los hepatocitos alrededor de una vena central (VC). La figura 1C corresponde a la superposición de las señales obtenidas en A y B. Para facilitar la interpretación de las imágenes los núcleos se tiñeron con Dapi (en color azul). Como era de esperar, el marcaje simultáneo de las proteínas Oatp4 y Mrp2 permitía marcar toda la membrana de los hepatocitos.

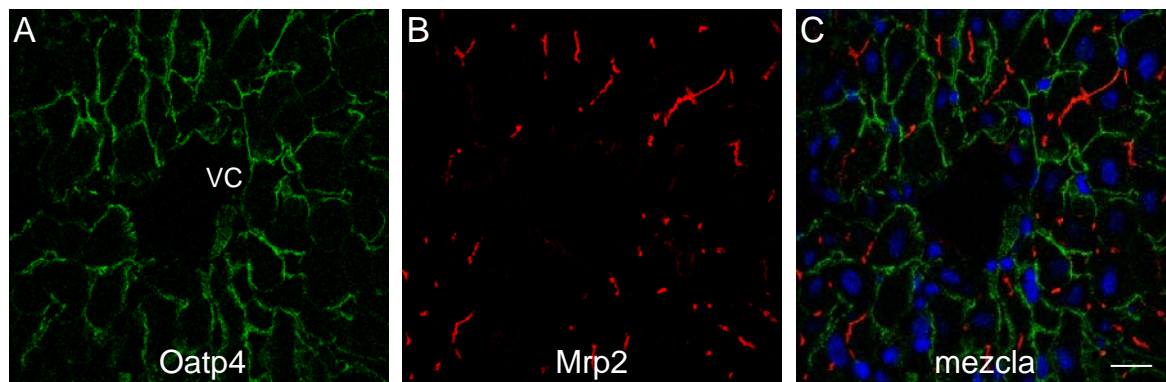


Figura 1. Doble marcaje por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de Oatp4 (A) como marcador de la membrana basolateral de los hepatocitos y Mrp2 (B), como marcador de la membrana canalicular. C muestra la mezcla de A y B. Los núcleos se tiñeron con Dapi. VC: vena central. Barra de escala = 20 μ m.

Como marcador de las células que tapizan los ductos biliares o colangiocitos se eligió la citokeratina 7 (CK-7) (Vojtesek *et al.*, 1990). Esta citokeratina da una tinción citoplasmática positiva en las células que tapizan los ductos biliares de mayor tamaño en el hígado sano, pero más débil en los colangiolos pequeños, por lo que para facilitar la puesta a punto del anticuerpo se utilizaron cortes de hígado de rata con colestasis

inducida por ligadura del conducto biliar común mantenida durante 8 semanas, ya que esta manipulación experimental induce proliferación ductular (Desmet *et al.*, 1995).

En la figura 2 se observa la tinción en un corte de hígado en el que aparecen varios ductulos biliares de gran tamaño, cuyas células presentan un marcaje intracelular en color verde.

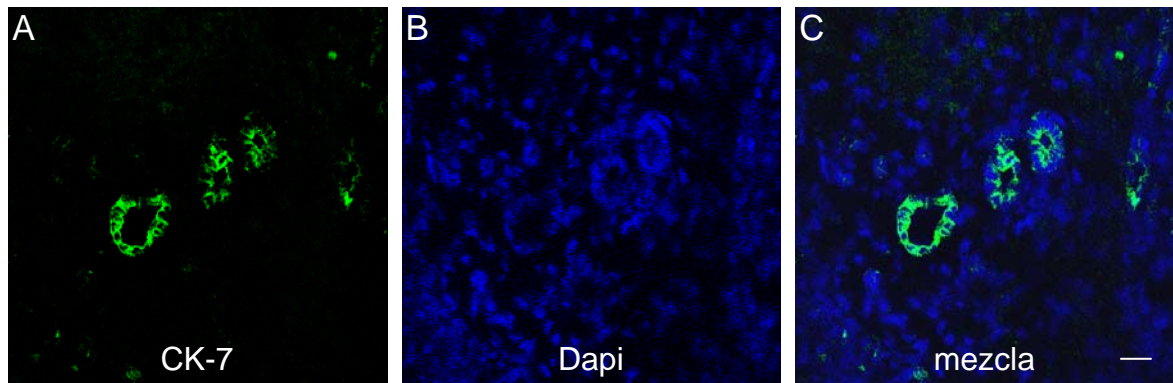


Figura 2. Localización por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata con colestasis obstructiva por ligadura del conducto biliar de la CK-7 (A) como marcador de células de ductulos biliares. Los núcleos se tiñeron con Dapi (B). C muestra la mezcla de A y B. Barra de escala = 20 μ m.

Las células endoteliales se marcaron con un anticuerpo frente a Reca1, un antígeno de superficie expresado en todas las células endoteliales de rata (Duijvestijn *et al.*, 1992). La figura 3 muestra el inmunomarcaje de Reca1 en un corte de hígado de rata control. Se aprecia la tinción de las células endoteliales alrededor de una vena central y en el endotelio alineado con los hepatocitos.

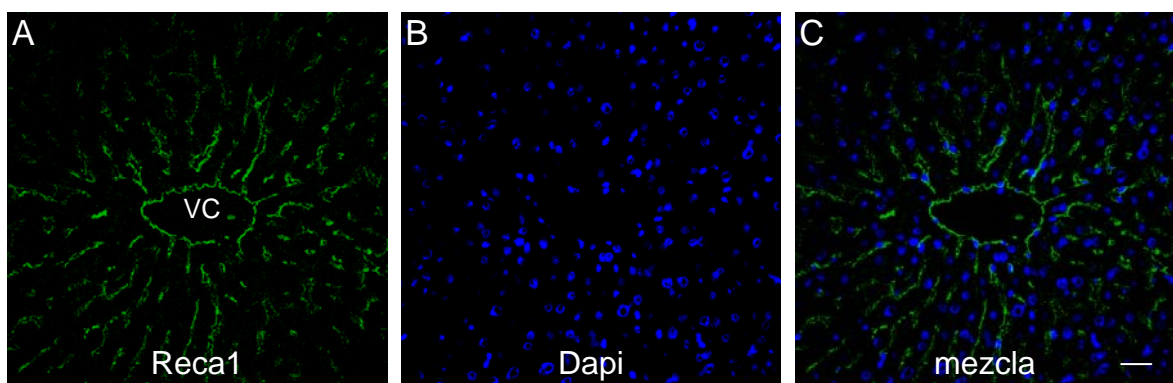


Figura 3. Localización por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control del antígeno de superficie Reca1 (A) como marcador de células endoteliales. Los núcleos se tiñeron con Dapi (B). C muestra la mezcla de A y B. VC: vena central. Barra de escala = 20 μ m.

Los macrófagos residentes hepáticos o células de Kupffer se identificaron utilizando un anticuerpo específico frente a la glicoproteína CD163, también conocida como ED2. Esta proteína se expresa en la mayoría de los macrófagos tisulares, aunque no en macrófagos alveolares, monocitos, y células de la microglía (Barbe *et al.*, 1990).

La figura 4 muestra una imagen representativa de inmunomarcaje de células de Kupffer en un corte de hígado de rata control. Se observa una fuerte inmunorreactividad en células distribuidas por el parénquima.

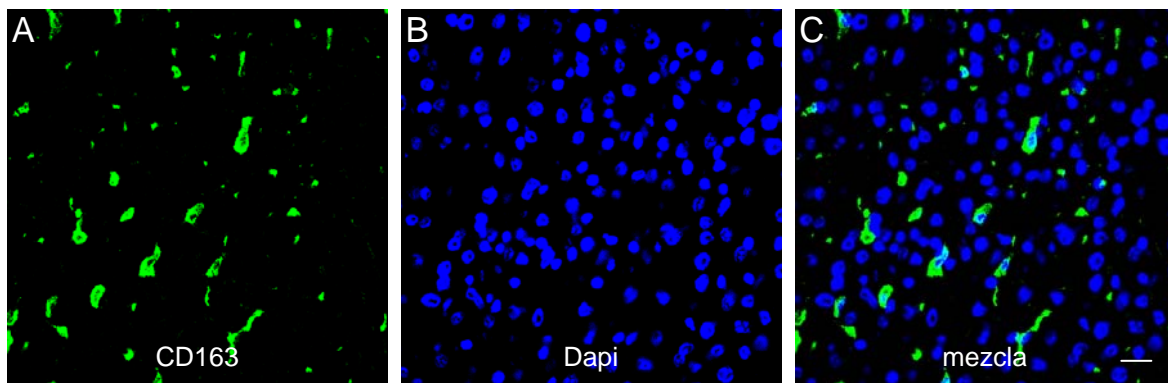


Figura 4. Localización por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de la proteína de superficie CD163 (A) como marcador de células de Kupffer. Los núcleos se tiñeron con Dapi (B). C muestra la mezcla de A y B. Barra de escala = 20 μ m.

Por último, para marcar las células estrelladas se utilizó un anticuerpo frente a la isoforma α de la actina de músculo liso (α SMA). La actina pertenece al sistema de microfilamentos del citoesqueleto, y aunque durante mucho tiempo este marcador se ha utilizado como indicador de activación o transformación fenotípica de las células estrelladas hepáticas, porque se consideraba que estas células en estado quiescente no expresaban la α SMA, recientemente se ha demostrado que, aunque la señal es más débil que en las activadas, también es posible detectarla en las células quiescentes en el hígado sano (Lepreux *et al.*, 2001). Por esta razón, para facilitar la puesta a punto del anticuerpo utilizamos cortes de hígado de rata con colestasis obstructiva durante 8 semanas, ya que en este modelo está inducida la activación y proliferación de las células estrelladas (Desmet *et al.*, 1995).

La figura 5 muestra una imagen representativa de la tinción obtenida utilizando el anticuerpo frente a la α SMA. Se obtuvo un marcaje fuerte y específico en células distribuidas de forma heterogénea en el parénquima hepático. Esta distribución es debida, como comentaremos con detalle más adelante, a que la colestasis crónica produce una desorganización del tejido hepático.

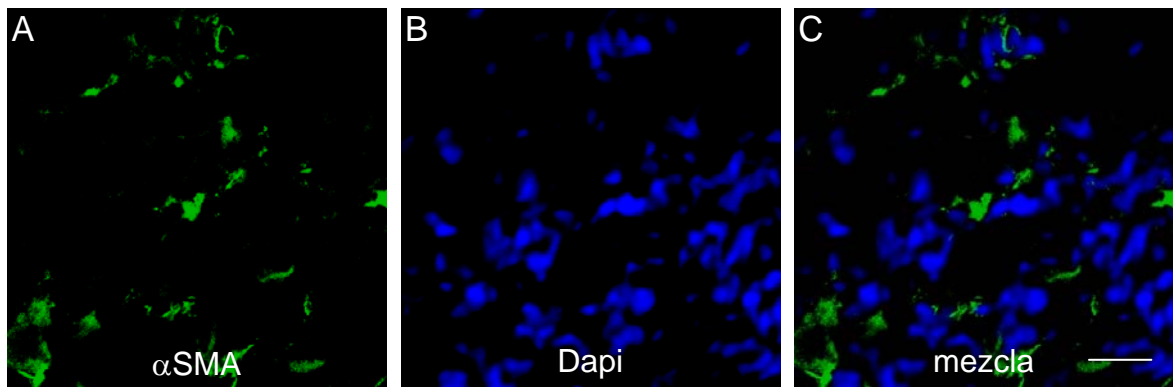


Figura 5. Localización por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata con colestasis obstructiva de la proteína α SMA (**A**) como marcador de células estrelladas. Los núcleos se tiñeron con Dapi (**B**). **C** muestra la mezcla de A y B. Barra de escala = 20 μ m.

Una vez que conseguimos seleccionar y poner a punto las técnicas y los marcadores para identificar las células más características del tejido hepático en la rata, la siguiente etapa fue estudiar la distribución subtisular de las proteínas Svct1 y Svct2 en los distintos tipos celulares del parénquima hepático. El hecho de que los anticuerpos comerciales frente a las dos Svcts estuvieran obtenidos en cabra nos resultó muy útil, ya que nos permitió combinarlos con los marcadores de las distintas poblaciones de células hepáticas, que estaban obtenidos en ratón o en conejo.

La figura 6 muestra la localización de Svct1 (A-C) y Svct2 (D-F) en el hígado de rata control. La proteína Svct1 estaba expresada en la membrana basolateral de los hepatocitos, como se demostró por la co-localización con la proteína Oatp4 (color anaranjado en 6C), pero no con la proteína canalicular Mrp2 (datos no mostrados). Además, otras células (punta de flecha en 6C) presentaban un fuerte marcaje de Svct1.

Respecto a Svct2, la inmunorreactividad en el parénquima fue más débil que la detectada para Svct1. En los hepatocitos no se observó una señal clara, ya que aunque aparecía un marcaje similar al característico de membrana basolateral, no parecía co-localizar con la fluorescencia de la proteína Oatp4, por lo que, por su distribución, podría corresponder a células endoteliales. Además, también se observó una fuerte tinción en células localizadas entre las filas de hepatocitos (punta de flecha en 6F) que, por su distribución en el tejido, podrían ser células de Kupffer.

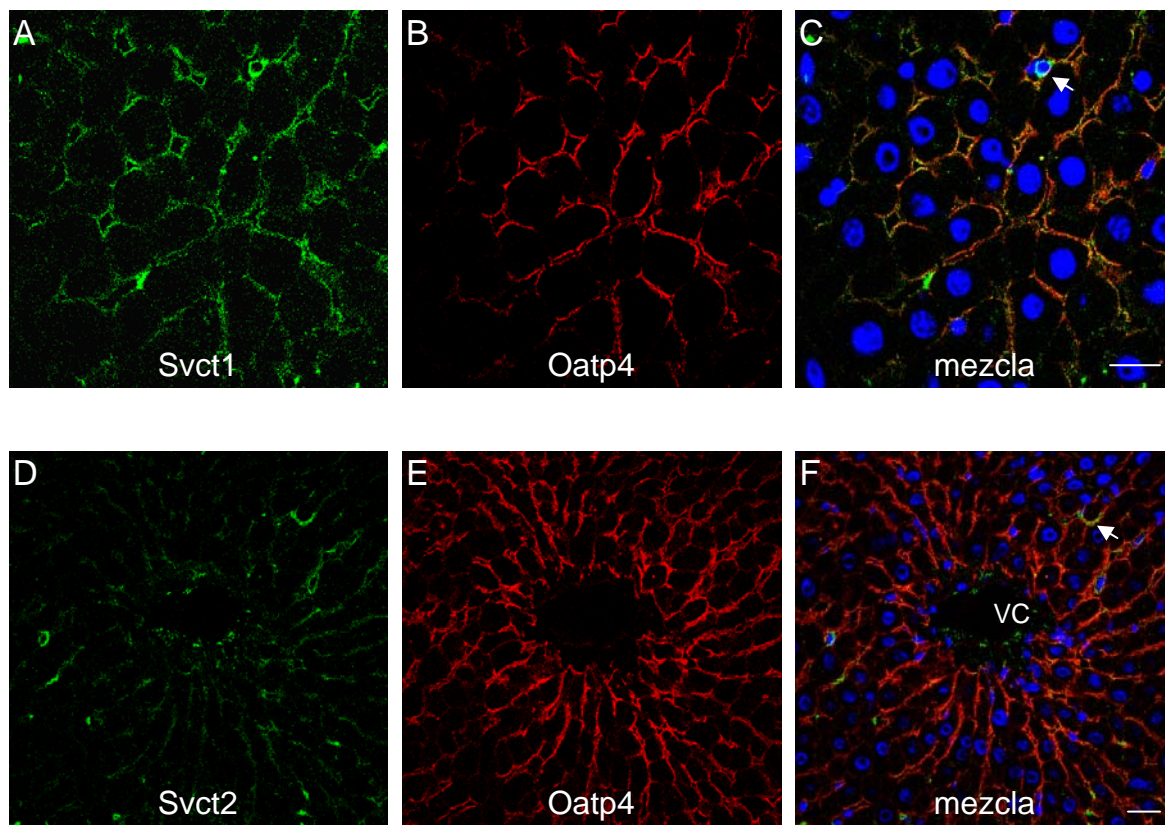


Figura 6. Doble marcaje por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de Svct1 (A) o Svct2 (D) y Oatp4 (B, E), como marcador de la membrana basolateral de los hepatocitos. C muestra la mezcla de A y B. F corresponde a la mezcla de D y E. Los núcleos se tiñeron con Dapi. VC: vena central. Barras de escala = 20 μ m.

Así pues, un hallazgo importante de este estudio es que la proteína Svct1 podría ser la responsable de la captación a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos del AA que puede llegar al hígado a través de la vena porta procedente de la dieta.

Para investigar si las células ductulares expresaban alguna de las isoformas de las proteínas transportadoras de AA se llevó a cabo un doble marcaje con los anticuerpos frente a cada una de las Svcts y frente a la CK-7. En los ductulos de mayor tamaño fue posible comprobar que los colangiocitos de rata marcados con CK-7 (figura 7B) presentaban una fuerte inmunoreactividad para Svct1 (figura 7A). La superposición de las imágenes correspondientes a las fluorescencias de Svct1 y CK-7 (figura 7C) parecía indicar que la Svct1 estaba localizada en la membrana apical de estas células, es decir, la membrana que está en contacto directo con la bilis. Sin embargo, como se observa en las figuras 7D-F, no fue posible detectar la isoforma Svct2 en los colangiocitos; ni en las células de los ductulos pequeños ni en las de los de gran tamaño.

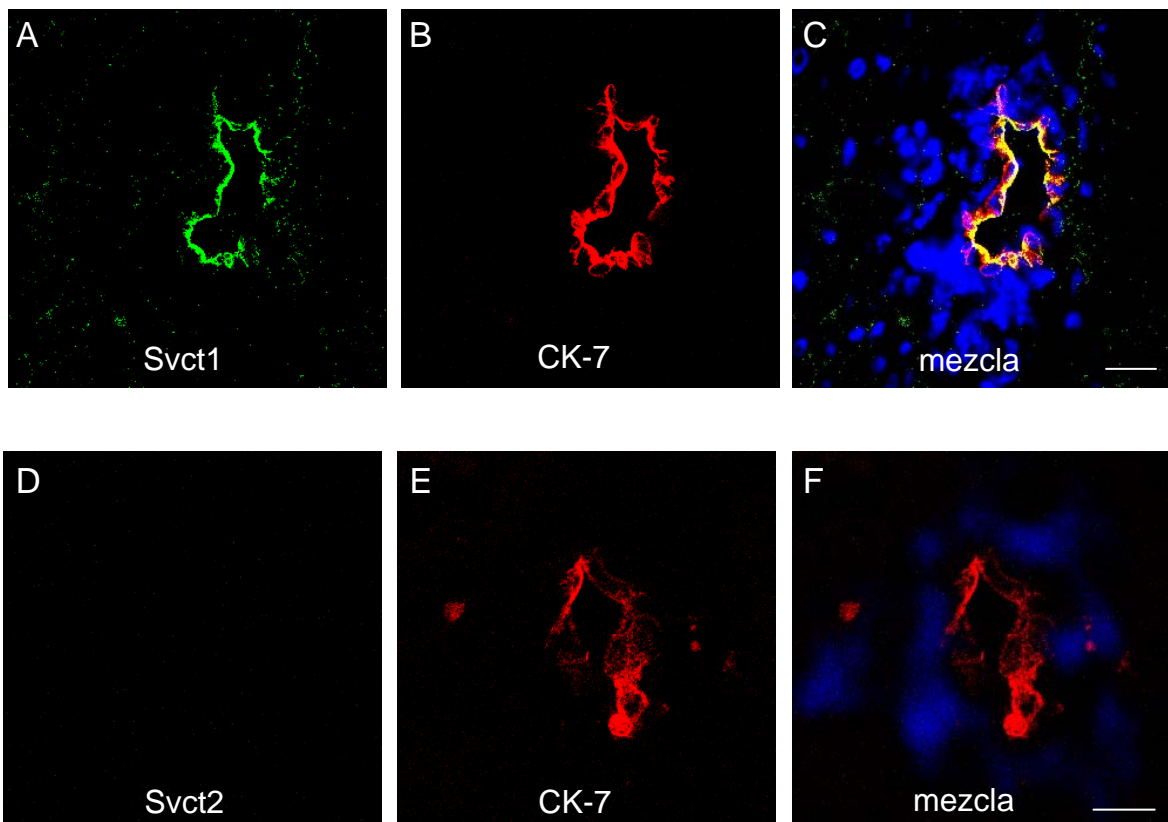


Figura 7. Doble marcaje por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de Svct1 (A) o Svct2 (D) y CK-7 (B, E), como marcador de colangiocitos. C muestra la mezcla de A y B. F corresponde a la mezcla de D y E. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

La presencia de Svct1 en la membrana apical de los colangiocitos permite sugerir que estas células podrían captar el AA que alcanza la bilis. Hasta la fecha no hay datos en la bibliografía que describan esta vitamina se secreta en bilis, sin embargo, recientemente,

en nuestro laboratorio hemos confirmado por HPLC/MS/MS que la bilis de rata presenta niveles de vitamina C del orden de 15 μM (comunicación personal M.J. Monte y J.J.G. Marin, 2009) lo que apoya que el resultado de localización apical de esta proteína podría tener un sentido funcional si este transportador actúa recuperando esta sustancia de la bilis a su paso por el árbol biliar.

En las células endoteliales, marcadas con Reca1 (figuras 8B y 8E), se encontró marcaje de Svct1 (figura 8A) y de Svct2 (figura 8D), como se demostró en la superposición de las señales (figuras 8C y 8F, respectivamente). La inmunorreactividad de Svct1 en estas células fue mayor que la de Svct2. Además, la Svct1 estaba presente en otras células hepáticas (marcaje en verde en figura 8C) que, por su distribución, parecen hepatocitos que, como hemos comentado anteriormente, expresan esta isoforma. Sin embargo, la señal de Svct2 de la imagen 8D correspondía mayoritariamente a células positivas para Reca1 (marcaje anaranjado en figura 8F).

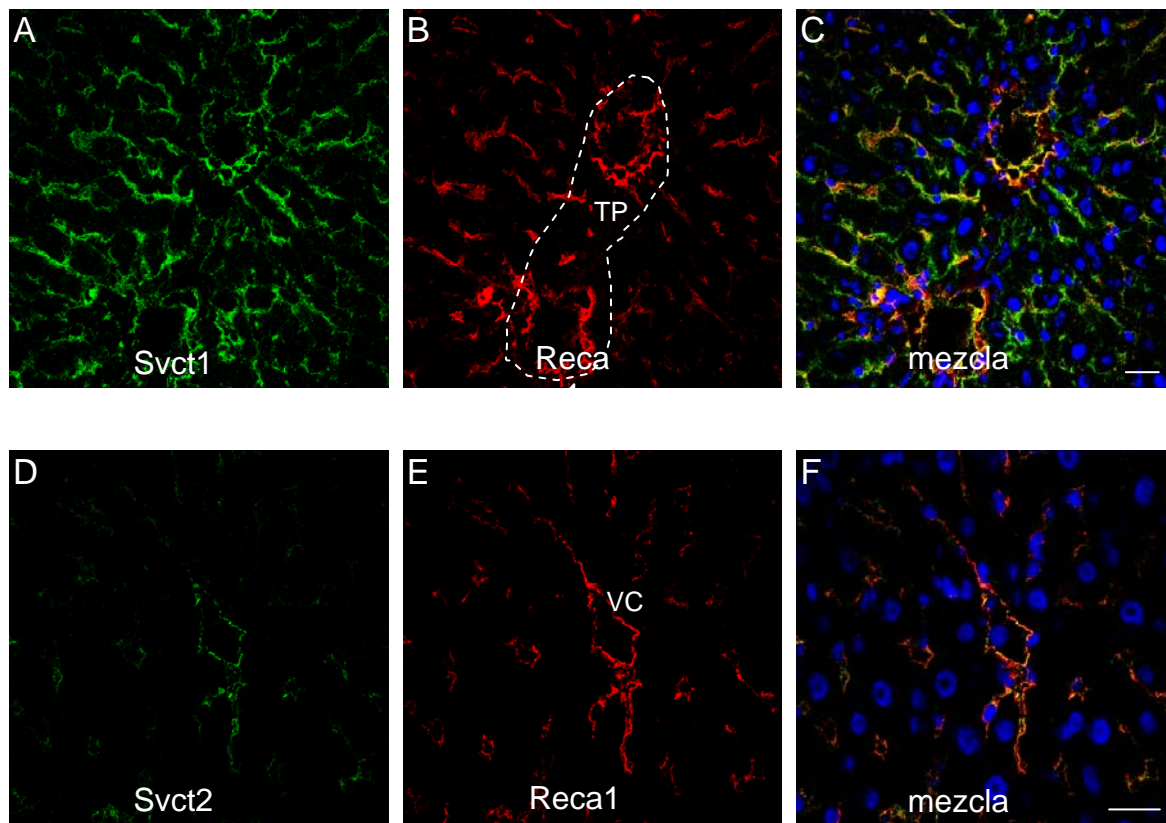


Figura 8. Doble marcaje por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de Svct1 (A) o Svct2 (D) y Reca1 (B, E), como marcador de las células endoteliales. C muestra la mezcla de A y B. F corresponde a la mezcla de D y E. TP: tracto portal, VC: vena central. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μm .

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados en células endoteliales en cultivo en los que se ha descrito que expresan ambas isoformas, la Svct2

(Best *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2007) y en menor medida la Svct1 (Best *et al.*, 2005) y que almacenan grandes cantidades de AA.

Recientemente se ha demostrado que el AA es esencial para prevenir el daño oxidativo en el tejido endotelial. Por otra parte, la vitamina C es necesaria para la síntesis de colágeno tipo IV y para estimular la proliferación celular (Aguirre y May, 2008). La presencia de las dos isoformas de Svcts permitiría mantener los requerimientos adecuados de vitamina C en estas células. Además, se ha propuesto que en determinadas situaciones la liberación del AA secuestrado en las células endoteliales podría ayudar a combatir el estrés oxidativo y a proteger del daño a las células vecinas (Best *et al.*, 2005).

Al igual que las células endoteliales, las células de Kupffer, marcadas en rojo en las figuras 9B y 9E, expresaban también las dos isoformas de las Svcts (figuras 9A y 9D), como se demostró por co-localización en las figuras 9C y 9F, respectivamente (marcaje amarillo-anaranjado).

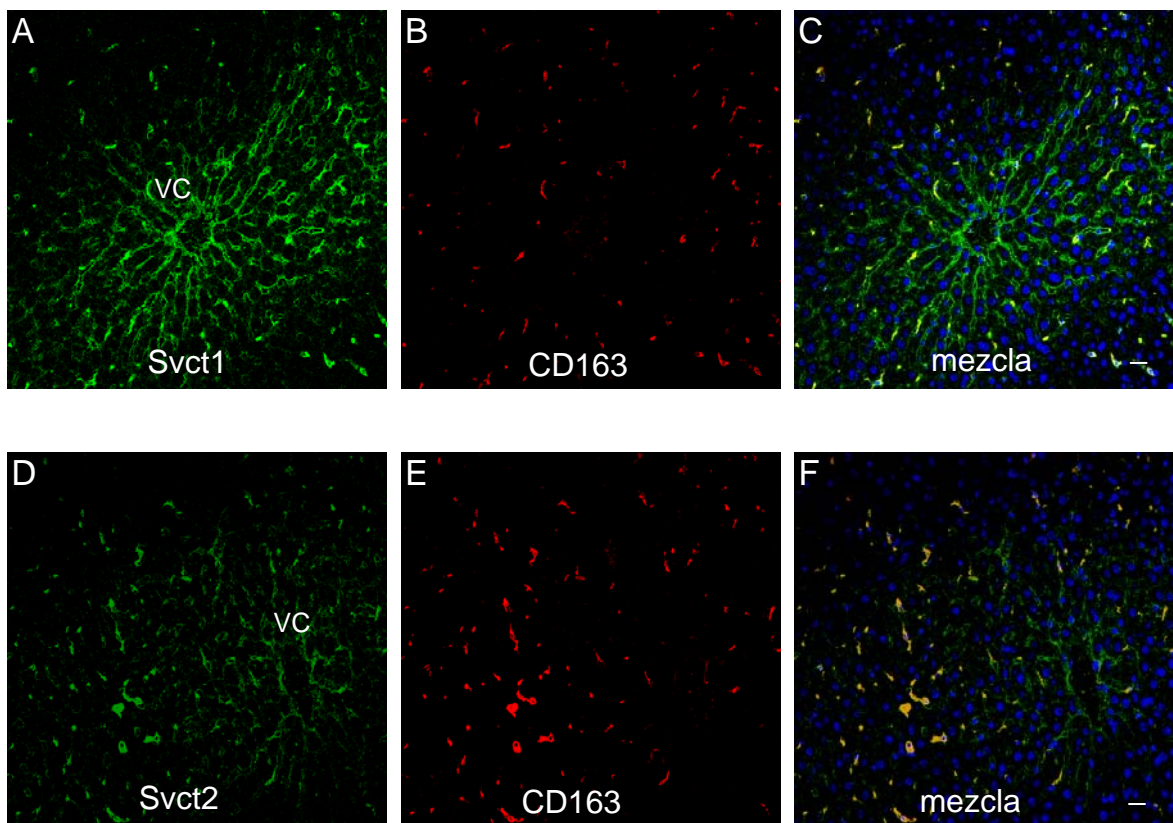


Figura 9. Doble marcaje por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de Svct1 (A) o Svct2 (D) y CD163 (B, E), como marcador de las células de Kupffer. C muestra la mezcla de A y B. F corresponde a la mezcla de D y E. Los núcleos se tiñeron con Dapi. VC: vena central. Barras de escala = 20 μ m.

Las células de Kupffer generan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno durante su actividad habitual, pero cuando se producen agresiones hepáticas que dan lugar a reacciones inflamatorias y reparadoras, la producción de especies reactivas de oxígeno por las células de Kupffer activadas aumenta considerablemente. Estos macrófagos del tejido hepático tienen una gran capacidad de detoxificación gracias a la presencia de diversos sistemas antioxidantes como el GSH, la superóxido dismutasa o SOD, la glutatión peroxidasa y la catalasa (Cepinskas *et al.*, 2002).

Las células de Kupffer utilizan el AA para combatir el estrés oxidativo que se genera cuando son activadas y además, para regenerar GSH (Aguirre y May, 2008). La presencia de Svct1 y Svct2 en estas células y su elevada expresión son indicativas de la importancia que tiene esta vitamina en los macrófagos hepáticos.

En cuanto a las células estrelladas, en el hígado control observamos un resultado similar al encontrado en los hepatocitos, una clara señal de Svct1 (figuras 10A-C) y mucho más débil de Svct2 (figuras 10D-F).

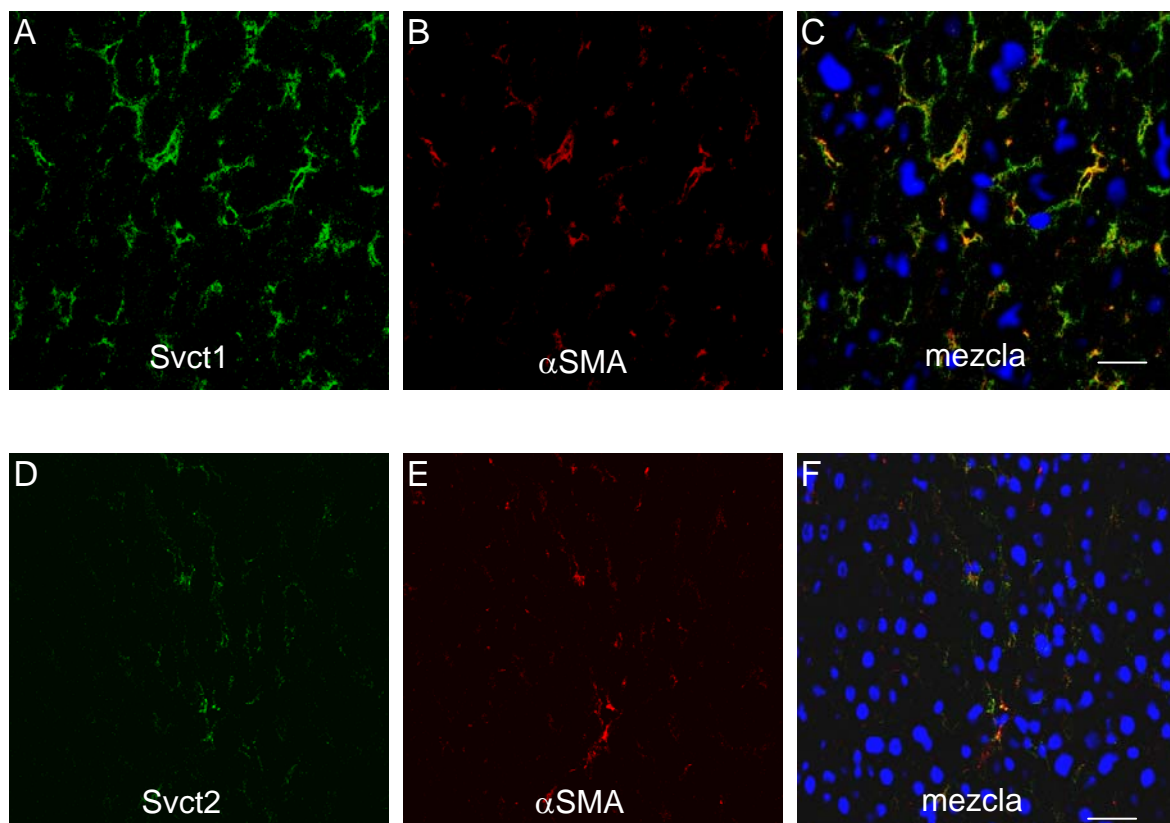


Figura 10. Doble marcaje por inmunofluorescencia en cortes de hígado de rata control de Svct1 (A) o Svct2 (D) y α SMA (B, E), como marcador de las células estrelladas. C muestra la mezcla de A y B. F corresponde a la mezcla de D y E. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Hasta la fecha, no existen datos en la literatura sobre la expresión de Svcts en las células estrelladas hepáticas, aunque por PCR cuantitativa a tiempo real, hemos comprobado que los niveles del mRNA de Svct1 en la línea celular CFCS, obtenida a partir de un hígado de rata cirrótico por tratamiento con Cl₄C (Greenwel *et al.*, 1993), fueron similares a los detectados en hepatocitos de rata recién aislados, mientras que la expresión de Svct2 en esta línea celular fue 9 veces superior a la de los hepatocitos (datos no mostrados). El hecho de que estas células no expresen de forma mayoritaria la misma isoforma que el tejido sano no es sorprendente y ya se ha observado en otras células tumorales (Perez *et al.*, 2007).

En resumen, estos resultados muestran que todas las células hepáticas expresan al menos una isoforma de Svct, lo que permite la captación eficaz y concentrativa de la vitamina C necesaria para que lleven a cabo sus distintas funciones vitales.

En hepatocitos y colangiocitos sólo hay Svct1, y dado que son las células mayoritarias del hígado (más del 70%), este hecho explicaría la mayor expresión de Svct1 cuando las determinaciones de abundancia del mRNA se llevan a cabo en homogenado de tejido hepático. Por otro lado, las células más expuestas a daño oxidativo (endoteliales y Kupffer) aparecen ambas Svct1 y Svct2. Quizás las características cinéticas de ambas isoformas justifiquen este hecho, como hemos comentado en la introducción la Svct1 presenta una baja afinidad pero una alta capacidad para transportar AA, mientras que la Svct2 presenta una alta afinidad, pero una baja capacidad para transportar esta vitamina.

El tejido hepático comparte con los otros tejidos que expresan Svct1 y Svct2 el que está muy expuesto a agresiones que inducen estrés oxidativo. Lo mismo ocurre en el pulmón y el intestino por estar en contacto con el medio externo (mayor exposición, mayor daño) o en la placenta (protección fetal).

4.2. ESTUDIO ONTOGÉNICO DE LA EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATA

El siguiente objetivo de este trabajo fue investigar los cambios que se producen en la expresión hepática de los miembros de la familia de transportadores de vitamina C dependientes de sodio (Svct1 y Svct2), implicados en la captación activa de AA, durante las diferentes etapas de la vida de la rata. Además, decidimos comparar los niveles de expresión con los de las tres proteínas transportadoras de aniones orgánicos de la familia Oatp (Oatp1, Oatp2 y Oatp4), responsables de la captación sodio-independiente a través de la membrana sinusoidal de los hepatocitos, de varios aniones orgánicos, entre los que se encuentran los ácidos biliares, las hormonas tiroideas, diversos esteroides conjugados y algunos fármacos (Kullak-Ublick *et al.*, 2004).

El diseño de este estudio ha permitido hacer un seguimiento en las diferentes etapas de la vida del animal; desde el momento del nacimiento, haciendo una investigación más exhaustiva de la etapa neonatal y juvenil, para continuar en el individuo adulto y finalizar con la etapa senescente. Para ello, se recogieron muestras de hígado de neonatos en el primer día de vida, de ratas jóvenes de 1, 2, 3 y 4 semanas de edad, de ratas adultas de 8 semanas y de ratas senescentes de 9 y 24 meses.

Las camadas se destetaron a los 21 días de vida. Tanto el momento del destete, como el considerar como adultos a los animales de 8 semanas, son prácticas habituales de laboratorio para el manejo de esta especie. En trabajos previos en nuestro grupo se había estudiado en profundidad la función hepatobiliar en la rata Wistar de 4 y 8 semanas (Monte *et al.*, 1996; El-Mir *et al.*, 1997) y se había confirmado que a las 8 semanas ya se había alcanzado la maduración de la función biliar.

La tabla 1 muestra la evolución del peso corporal, del peso hepático y la relación hepatosomática de los animales utilizados en el estudio.

Durante las 4 primeras semanas de vida se registró un incremento mantenido de todos los parámetros. El crecimiento fue más acusado entre la cuarta y la octava semana, con un aumento algo superior a cuatro veces del peso corporal y hepático. El paralelismo entre el incremento del peso corporal y el hígado se perdió en las etapas avanzadas de la vida; mientras que el peso medio de los animales de 9 y 24 meses fue 2.3 y 2.6 veces mayor, respectivamente, que el de las ratas adultas de 8 semanas, las diferencias en el peso hepático fueron mucho menores, lo que determinó que la relación hepatosomática en las ratas de 9 meses y 2 años fuera un 50% de la calculada en las ratas de adultas de 2 meses.

Tabla 1. Evolución temporal del peso corporal, peso hepático y relación hepatosomática durante la vida de la rata. Los valores son media \pm EEM de 6-9 animales pertenecientes al menos a 3 camadas diferentes en cada grupo.

Edad (semanas)	Peso corporal (g)	Peso hepático (g)	Relación hepatosomática
0	6.03 \pm 0.05		
1	16.2 \pm 1.4	0.51 \pm 0.05	3.14 \pm 0.25
2	32.5 \pm 2.8	0.96 \pm 0.09	2.95 \pm 0.19
3	35.1 \pm 4.6	1.3 \pm 0.2	3.82 \pm 0.17
4	49.5 \pm 6.8	2.0 \pm 0.1	4.11 \pm 0.18
8	201.5 \pm 2.2	8.4 \pm 0.3	4.19 \pm 0.10
36	461.7 \pm 24.3	9.6 \pm 0.4	2.08 \pm 0.03
96	523.7 \pm 28.7	10.4 \pm 1.1	1.98 \pm 0.12

El estudio de los niveles de expresión del mRNA de las proteínas de interés se llevó a cabo por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. La tabla 2 recoge las secuencias de los nucleótidos utilizados como cebadores o *primers* en las reacciones de PCR. Aparece también el tamaño, en pares de bases (pb), del producto que se espera amplificar en cada caso y el número de acceso con el que cada secuencia aparece registrada en la base de datos GeneBank de PubMed disponible en la dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez>.

Tabla 2. Secuencias de los *primers* utilizados en el análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión génica de *Oatp1* (*Oatp1a1*), *Oatp2* (*Oatp1a4*), *Oatp4* (*Oatp1b2*), *Svct1* (*Slc23a1*) y *Svct2* (*Slc23a2*) de rata.

Gen	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)	Número de acceso
Svct1	TGTTCCAGGCCAGTGCCTT	ACCACGCTGGACACCATGATT	181	NM_017315
Svct2	ACTGTCCGGAATGCAGATGTC	TCTTTATCAGCTCACTGTGGCTT	107	NM_017316
Oatp1	CTACTGCCCTGTTCAAGGCC	ATTGTATCTCTCAGGATTCCGAGG	68	L19031
Oatp2	TGCGGAGATGAAGCTCACC	TCCTCCGTCACCTTCGACCTT	69	U88036
Oatp4	AGACGTTCCCATCACAACCAC	GCCTCTGCAGCTTTCCTTGA	68	AJ271682

Los *primers* se diseñaron siguiendo las recomendaciones del programa Primer Express. En primer lugar se confirmó la especificidad de todas las parejas de *primers*. La detección se llevó a cabo utilizando el fluorocromo SYBR Green I.

La figura 11 muestra los resultados obtenidos con los *primers* diseñados para Svct2. La figura 11A muestra la evolución de la fluorescencia durante la amplificación de distintas diluciones de cDNA de hígado de rata y del blanco (-DNA).

En la figura 11B se observa la curva de desnaturalización al final de la PCR en la muestra de hígado (diana) y en el blanco. La doble hélice del producto de la PCR presentaba una fase de transición (desnaturalización) a unos 84°C, mientras que en el blanco no apareció ningún pico en todo el intervalo de temperaturas.

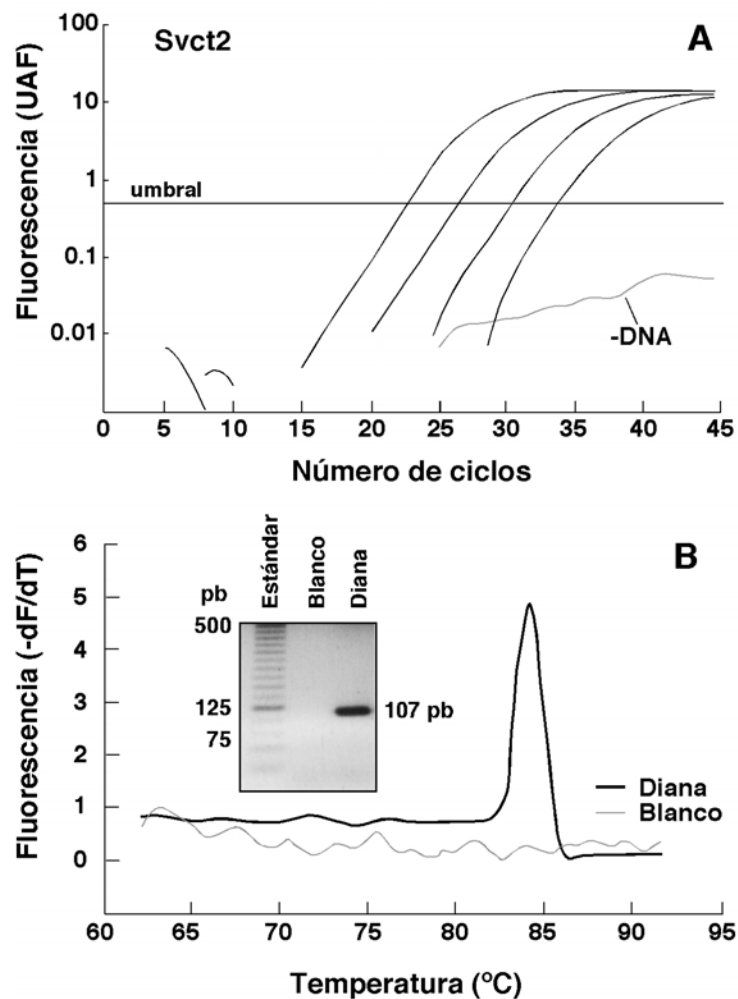


Figura 11. (A) Curvas de evolución de la fluorescencia durante la amplificación de la PCR en distintas diluciones de cDNA de hígado de rata y un control negativo (-DNA) utilizando *primers* específicos para amplificar un fragmento de 107 pb correspondiente a la secuencia de la proteína Svct2. (B) Curva de desnaturalización del producto amplificado por PCR. El inserto muestra el producto de la PCR tras la electroforesis en un gel de agarosa al 2.5%. Calle 1: estándar; calle 2: blanco de reacción; calle 3: producto de PCR utilizando como molde cDNA de hígado de rata adulta.

El hecho de que apareciera un único pico indicaba que sólo se había amplificado un producto, pero para confirmarlo se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, cuyo resultado se muestra en el inserto de la figura 11B. Se encontró una única banda del tamaño esperado (107 pb) en la muestra problema y no aparecieron bandas en la calle correspondiente al control negativo.

Este estudio se llevó a cabo con cada pareja de *primers* para comprobar la ausencia de reacciones inespecíficas. Para todos los genes se obtuvo un único pico de disociación.

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos tras llevar a cabo las PCR cuantitativas. El tamaño de las bandas tras la realización de una electroforesis en gel de agarosa, que en todos los casos se correspondían con los esperados a los fragmentos amplificados, rectas patrón obtenidas para cada pareja de *primers* y eficacia calculada de las reacciones de PCR. En todos los casos los coeficientes de correlación fueron muy buenos y la eficacia de las reacciones osciló entre el 81.13% que se obtuvo para la amplificación del gen que codifica para la *Oatp4* y el 98.61% encontrado para *Oatp2*.

Tabla 3. Datos obtenidos para cada una de las parejas de *primers* tras las reacciones de PCR-cuantitativa: tamaño del producto amplificado, ecuaciones de las rectas patrón y eficacia de las reacciones.

Gen	Gel de agarosa (tamaño banda, pb)	Recta patrón	R ²	Eficacia
Svct1	≈ 181	$y = 25.05 - 3.74 \log(x)$	0.987	85.09
Svct2	≈ 107	$y = 23.88 - 3.37 \log(x)$	0.988	98.03
Oatp1	≈ 68	$y = 20.51 - 3.58 \log(x)$	0.995	90.11
Oatp2	≈ 69	$y = 20.87 - 3.35 \log(x)$	0.995	98.61
Oatp4	≈ 68	$y = 19.87 - 3.87 \log(x)$	0.985	81.13
rRNA 18S	≈ 200	$y = 13.99 - 3.49 \log(x)$	0.994	93.40

Para una correcta utilización de la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real es necesario minimizar las posibles variaciones que se pueden cometer en la manipulación de las muestras durante procesos como la extracción y la cuantificación del RNA total o la transcripción reversa. Por esta razón, los resultados se expresan respecto a un gen de referencia o normalizador, cuya expresión debe mantenerse constante o, al menos, sufrir variaciones mínimas en las muestras que se quieren comparar. Ningún gen es absolutamente estable en protocolos experimentales que incluyen manipulaciones quirúrgicas o tratamientos farmacológicos (Bond *et al.*, 2002), por lo que hay que comprobar para cada tipo de estudio qué gen puede ser más adecuado como normalizador.

En todos nuestros estudios decidimos investigar la utilidad de varios normalizadores: la β -actina, la ubiquitina C y el RNA ribosómico (rRNA) 18S. En el caso del estudio ontogénico, después de comprobar que no había cambios importantes en la estabilidad de ninguno de ellos, seleccionamos como normalizador el rRNA 18S, ya que la estabilidad de los niveles de expresión en el hígado de los animales desde el nacimiento hasta la senescencia era ligeramente mejor.

La figura 12 recoge los valores de ciclo umbral (Ct) para este normalizador en todos los periodos estudiados. Estos valores fueron muy similares entre sí, indicando que la cantidad de rRNA 18S en el hígado se mantiene constante a lo largo de la vida en esta especie, y por lo tanto se puede utilizar como referencia. El rRNA 18S ha sido utilizado como normalizador con anterioridad en trabajos de nuestro grupo de investigación por su alta estabilidad (Perez et al., 2005; Macias et al., 2006).

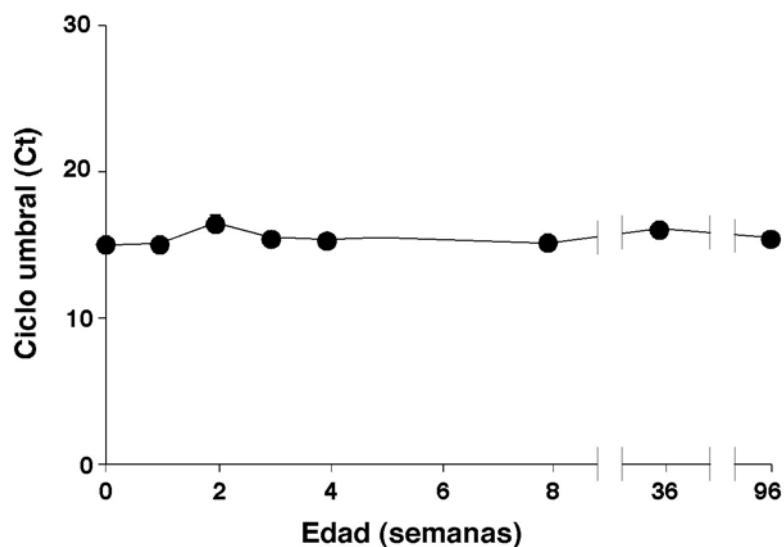


Figura 12. Valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para el RNA ribosómico 18S durante la amplificación por PCR cuantitativa de cDNA de hígado obtenido de ratas sacrificadas a los tiempos que se indican. Los valores son media \pm EEM de 6-8 animales en cada grupo. El cálculo estadístico se llevó a cabo por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni (*, $p < 0.05$, respecto al grupo de ratas adultas de 8 semanas).

En primer lugar se analizó la expresión de las proteínas Svct1 (figura 13A) y Svct2 (figura 13B) y se encontró que tenían un comportamiento diferente en cuanto a su evolución temporal. Los niveles relativos del mRNA de Svct1 en el momento del nacimiento fueron significativamente menores que los de los individuos adultos y se mantuvieron así durante las dos primeras semanas de vida. A partir de la tercera semana de vida los valores alcanzaron los del adulto con una pequeña subida transitoria, no significativa, tras el destete. En las ratas de 36 y 96 semanas los niveles estaban

reducidos más del 50% y eran similares a los de las primeras semanas de vida. El perfil para Svct2 fue muy diferente, ya que sus niveles de expresión se mantuvieron relativamente estables a lo largo de toda la vida de la rata.

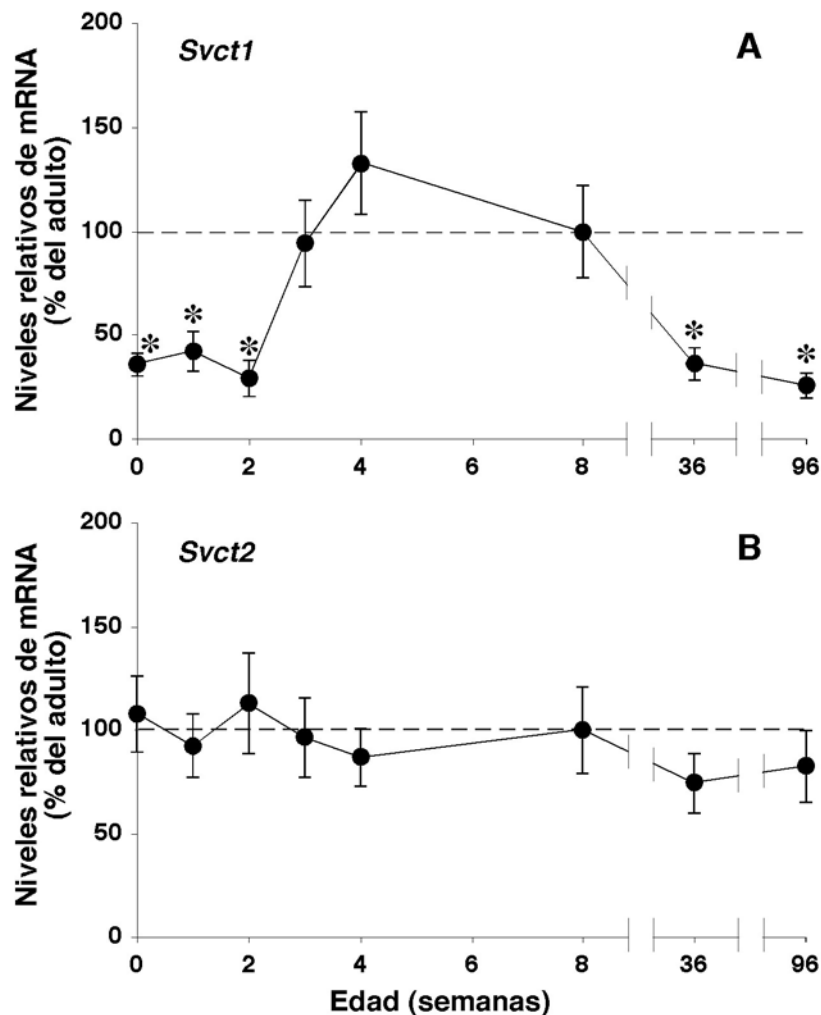


Figura 13. Evolución temporal durante la vida de la rata de la abundancia relativa en tejido hepático del mRNA de los genes *Svct1* (A) y *Svct2* (B), que codifican respectivamente para las proteínas Svct1 y Svct2, determinada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 6-9 animales, pertenecientes a 3 camadas diferentes en cada grupo. El cálculo estadístico se llevó a cabo por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni (*, $p < 0.05$, respecto al grupo de ratas adultas de 8 semanas).

La diferencia en los patrones de expresión de Svct1 y Svct2 durante el desarrollo que hemos encontrado es un hallazgo interesante que sugiere que existen mecanismos de regulación transcripcional muy distintos para cada gen, que se activan de forma peculiar durante la ontogenia de esta especie.

Respecto a la abundancia del mRNA de Svct1 y Svct2 en el hígado de rata adulta (8 semanas), el hecho de que el valor de Ct para Svct2 fuera 3.5 ciclos mayor que el obtenido para Svct1 (datos no mostrados) indicaba que el mRNA de Svct1 era más de 10 veces más abundante que el de Svct2, lo que también está de acuerdo con lo que se ha descrito en el tejido hepático de roedores adultos, tanto en la rata (Michels *et al.*, 2003) como en el ratón (Kuo *et al.*, 2004) y con nuestros propios resultados de expresión de ambas proteínas en el parénquima hepático en el estudio inmunohistoquímico que hemos descrito en el apartado anterior (Figuras 6-10).

El proceso de envejecimiento se asocia con un incremento más o menos generalizado del estrés oxidativo que se ha relacionado con una reducción de los niveles de algunas sustancias antioxidantes en los diferentes tejidos (Erdinler *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 1997; Hagen *et al.*, 1998; 1999; Lykkesfeldt *et al.*, 1998; Suh *et al.*, 2001).

En el caso de la vitamina C, se ha comprobado que la capacidad de sintetizar AA en la rata no disminuye con el envejecimiento (Xu *et al.*, 1996; Lykkesfeldt *et al.*, 1998), por lo que se ha sugerido que la caída de concentración de AA encontrada en el tejido hepático de ratas viejas (van der Loo *et al.*, 2003) podría deberse a un aumento en su utilización en reacciones enzimáticas, tales como la síntesis de óxido nítrico (May, 2000), la biosíntesis de carnitina y la síntesis de hidroxiprolina para la formación de colágeno (Barnes, 1975; Levine, 1986; Levine *et al.*, 1999), así como a un mayor consumo en la defensa antioxidante ya que existe un ambiente tisular más pro-oxidante (Shigenaga *et al.*, 1994). También se ha propuesto que podría deberse a una alteración en el transporte de esta vitamina (Michels *et al.*, 2003).

Nuestro estudio de expresión de Svcts durante la ontogenia amplía una investigación realizada en hepatocitos de rata en cultivo en el que se describía que la expresión de Svct1 estaba disminuida en los hepatocitos obtenidos de ratas viejas comparada con la de los aislados de ratas jóvenes (3-5 meses), mientras que no había cambios en los niveles de Svct2 entre ratas jóvenes y viejas (Michels *et al.*, 2003). Estos investigadores propusieron que la disminución de Svct1 podría ser la razón por la que los hepatocitos aislados de ratas viejas presentaban una menor capacidad de captar AA que los de ratas jóvenes (Michels *et al.*, 2003). La caída significativa de expresión durante la senescencia de Svct1, el transportador responsable de la captación de AA por los hepatocitos apoya la hipótesis propuesta por Michels *et al.* (2003).

Como hemos comentado anteriormente, como referencia, comparamos nuestros resultados de ontogenia de las Svcts con los de las proteínas transportadoras de aniones

orgánicos colefilicos *Oatp1*, *Oatp2* y *Oatp4*, abundantemente expresadas en el parénquima hepático (Kullak-Ublick *et al.*, 2004).

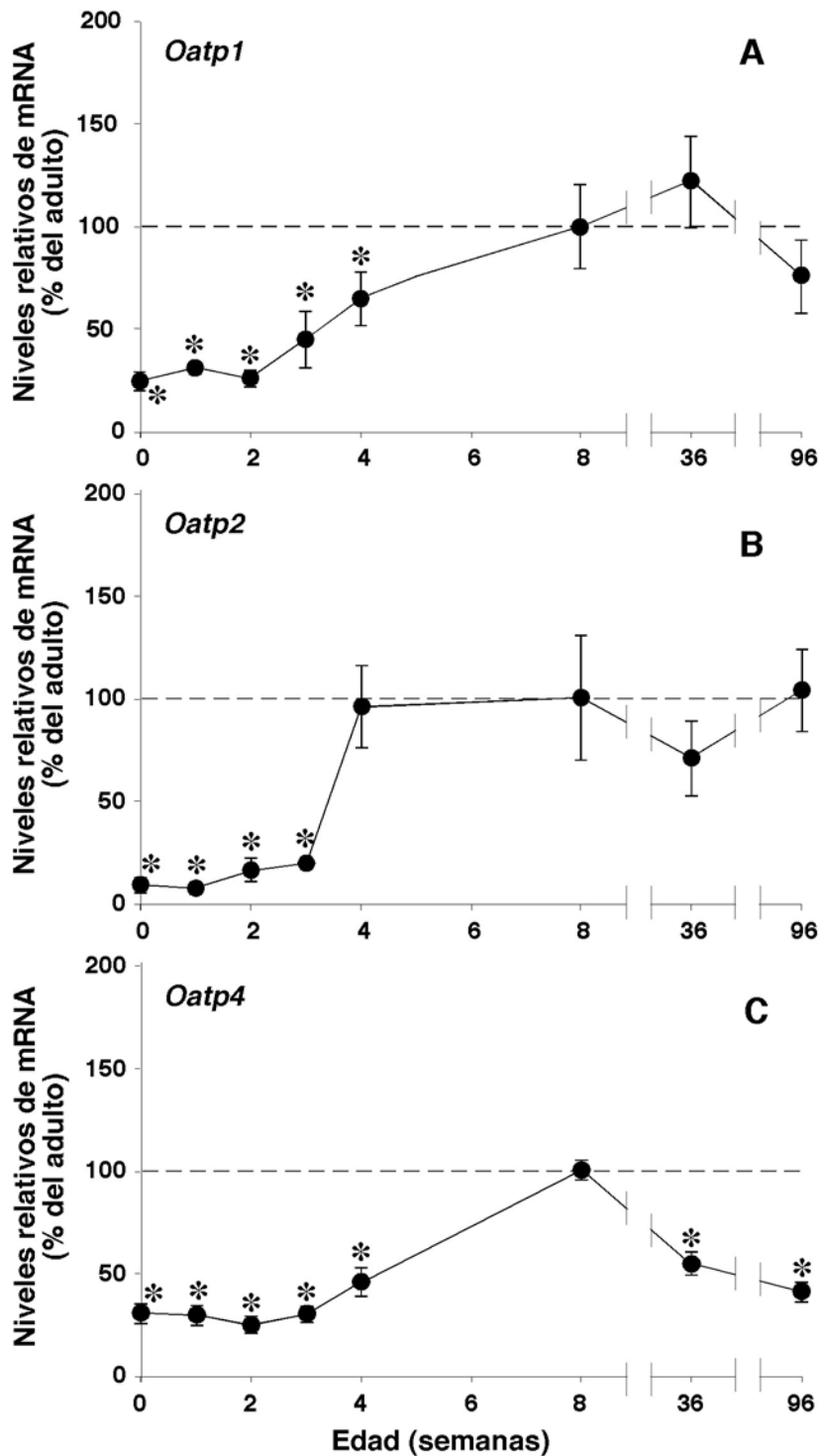


Figura 14. Evolución temporal durante la vida de la rata de la abundancia relativa en tejido hepático del mRNA de los genes *Oatp1a1* (A), *Oatp1a4* (B) y *Oatp1b2* (C), que codifican respectivamente para las proteínas *Oatp1*, *Oatp2* y *Oatp4*, determinada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 6-9 animales, pertenecientes a 3 camadas diferentes en cada grupo. El cálculo estadístico se llevó a cabo por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni (*, $p < 0.05$, respecto al grupo de ratas adultas de 8 semanas).

La evolución temporal de la expresión hepática de la Oatp1 (figura 14A) se caracterizó por unos niveles de mRNA bajos en los neonatos y por un aumento progresivo durante las primeras semanas de vida, aunque a las 4 semanas de edad los niveles aún fueron significativamente inferiores a los del adulto. Durante la vejez los niveles se mantuvieron en el rango de los adultos.

Los niveles de Oatp2 (figura 14B) fueron muy bajos durante la primera semana de vida, alrededor de un 10% respecto al adulto, y a las 3 semanas sólo alcanzaban el 20% para llegar al nivel de adulto una semana después del destete. A partir de ese momento los valores no se modificaron.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden sólo parcialmente con los obtenidos en el estudio realizado por Gao *et al.* (2004). En lo que se refiere al mRNA de Oatp1, ellos describieron que se alcanzaban los niveles del adulto a las 4 semanas, y en nuestro estudio a esa edad la expresión del transportador seguía siendo significativamente más baja. Respecto a Oatp2, ambos estudios están más en desacuerdo, ya que ellos encontraron que a las 2 semanas de vida los niveles de expresión eran similares a los del adulto, y en nuestro caso a las 2 semanas tenemos un 20% de los niveles de adulto.

Respecto a la Oatp4 (figura 14C), hemos encontrado que los niveles del mRNA en el hígado neonatal eran un 30% respecto al adulto y a las 5 semanas de vida habían aumentado hasta un 50%. Por otra parte, en la senescencia los niveles también se redujeron significativamente y estaban en el rango de los encontrados en las primeras semanas de vida.

En un estudio llevado a cabo hace unos años entre nuestro grupo de investigación y el que dirigía el Dr. Peter Meier en el Hospital Universitario de Zürich (St-Pierre *et al.*, 2004) se describió que los niveles de expresión en el hígado fetal durante la tercera y última semana de gestación eran muy bajos, casi indetectables para Oatp1 y Oatp2, y algo superiores para Oatp4. Esos datos concuerdan con los que hemos encontrado en este trabajo en neonatos de rata en las primeras horas de vida.

En resumen, podemos decir que los niveles de expresión de todas las Oatps en el hígado de rata son bajos en el momento del nacimiento y aumentan progresivamente durante el primer mes de vida para alcanzar los niveles de adulto primero para Oatp2 y un mes después para Oatp1 y Oatp4. Por otro lado, durante la etapa senescente, la expresión de Oatp4 es la única que cae de forma significativa. Sin embargo, y a pesar de las diferencias entre las tres isoformas, que hemos comentado, el patrón ontogénico de

expresión de las tres Oatps es bastante similar entre ellas, al contrario de lo que ocurría para las dos isoformas de Svcts.

Hay que tener en cuenta que la Oatps se encuentran expresadas mayoritariamente en los hepatocitos, mientras que las Svcts están presentes en todas las células hepáticas con distinta abundancia en cada tipo de célula, aunque dado el porcentaje que suponen los hepatocitos en el total del parénquima probablemente estamos siguiendo principalmente el mRNA de los hepatocitos.

La abundancia del mRNA de Svct2 no cambia durante la ontogenia, de acuerdo con un papel constitutivo en las células en las que más se expresa, endoteliales y Kupffer, que quizás son las más expuestas a daño oxidativo. Sin embargo, el perfil de Svct1 se parece al de los transportadores de la familia Oatp expresados en los hepatocitos. Maduran entre el primero y el segundo mes de vida, lo que podría estar relacionado con la evolución de la madurez fisiológica de los hepatocitos.

4.3. CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATA EN MODELOS EXPERIMENTALES ASOCIADOS CON ESTRÉS OXIDATIVO

A continuación, decidimos investigar si los niveles de expresión de las Svcts en el hígado de rata cambiaban en patologías que generalmente están asociadas a daño por estrés oxidativo hepático.

Para ello, elegimos dos modelos de enfermedades metabólicas que producen estrés oxidativo hepático: la diabetes inducida por administración de una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (Garcia-Marin *et al.*, 1988) y las ratas Zucker (*fa/fa*) que carecen del receptor de la leptina y se vienen utilizando desde hace varios años como modelo de esteatosis hepática (Ogawa *et al.*, 1995).

Además, incluimos el modelo de colestasis obstructiva por ligadura del conducto biliar. Este modelo de colestasis inducida en ratas gestantes durante la tercera y última semana de gestación ha sido ampliamente utilizado en nuestro grupo de investigación para estudiar el efecto de la hipercolanemia materna en el transporte de aniones orgánicos colefilicos por el hígado materno y a través de la placenta (Macias *et al.*, 2000; Briz *et al.*, 2003a). Por otra parte, se han realizado estudios que han permitido demostrar que la colestasis materna induce estrés oxidativo y apoptosis en el hígado materno y fetal y en la placenta (Perez *et al.*, 2005; 2006).

En un grupo experimental, la colestasis obstructiva se mantuvo 1 semana, mientras que en otro grupo la colestasis se prolongó durante un periodo más largo (8 semanas) para mimetizar lo que ocurre en varias hepatopatías en humanos que se asocian con colestasis más o menos severa de forma crónica.

La determinación de los niveles de Svcts se investigó por PCR cuantitativa a tiempo real, y de nuevo al igual que comentamos en el estudio ontogénico seleccionamos entre varios genes (rRNA 18S, β -actina, ubiquitina C, y HPRT) un normalizador que no se viera afectado en los distintos modelos experimentales, para poder comparar los cambios que se produjeran en las distintas situaciones experimentales.

Encontramos que la expresión de β -actina no presentaba variaciones importantes entre los distintos grupos experimentales, como se observa en la figura 15, y tampoco encontramos diferencias en el rRNA 18S (datos no mostrados), sin embargo, en este caso, decidimos utilizar la β -actina como normalizador porque sus valores de Ct eran más próximos a los de los genes objeto de esta parte del estudio.

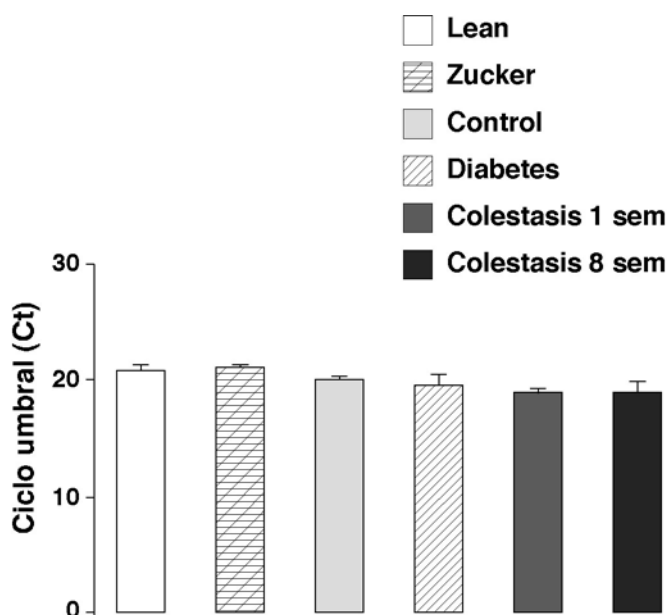


Figura 15. Validación de la utilización de la β -actina como normalizador en la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real en hígado de rata. Valores de ciclo umbral (Ct) encontrados para la β -actina durante la ampliación por PCR cuantitativa de cDNA obtenido de hígado de rata de los distintos grupos experimentales ($n \geq 5$ animales en cada grupo). El cálculo estadístico se realizó por el método de comparaciones múltiples de Bonferroni (*, $p < 0.05$, respecto al grupo Control).

La tabla 4 recoge las secuencias de los *primers* utilizados para detectar la β -actina. La especificidad de los *primers* se confirmó de la misma forma que comentamos para el resto de genes utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral; aparecía un único pico al aumentar progresivamente la temperatura al final de la PCR, indicativo de que sólo se amplifica un producto en la reacción, y en el gel de agarosa sólo encontramos una banda del tamaño esperado, ≈ 70 pb (datos no mostrados).

Tabla 4. Secuencias de los *primers* utilizados en el análisis por PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión génica de β -actina de rata.

Gen	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Amplicón (pb)	Número de acceso
β -actina	TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA	CTGCTTGCTGATCCACATCTG	69	NM_031144

4.3.1. EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATAS OBESAS (*fa/fa*) ZUCKER

La enfermedad de hígado graso no alcohólico es una condición patológica que engloba un rango amplio de daño hepático; desde esteatosis a esteatohepatitis, que puede avanzar a fibrosis y a cirrosis (Alba y Lindor, 2003; Malaguarnera *et al.*, 2009). Los datos obtenidos tanto en humanos como en modelos experimentales sugieren que los hígados grasos son más sensibles a los distintos tipos de agresiones a las que puede verse expuesto este órgano (Koneru y Dikdan, 2002).

La mayoría de los estudios que han puesto de manifiesto la mayor susceptibilidad de los hígados con esteatosis a agresiones como la exposición a endotoxina o la isquemia (Yang *et al.*, 1997; Koneru *et al.*, 1995) se han realizado en roedores genéticamente obesos; en los ratones *ob/ob*, que no producen leptina, o en las ratas Zucker *fa/fa*, que carecen del receptor para la leptina. Tanto la ausencia de leptina, como la de su receptor, se asocia con un marcado aumento de la ingesta de alimento, un menor gasto energético, obesidad, resistencia a la insulina e hígado graso (Koteish y Diehl, 2001).

Durante los últimos años se han realizado numerosos estudios para intentar comprender los mecanismos responsables de esta mayor susceptibilidad a la inflamación y a la fibrosis del hígado graso. Se ha demostrado que la función de las células de Kupffer está alterada y que los hepatocitos son más sensibles al $TNF\alpha$ cuando están expuestos a endotoxina (Yang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002), y en modelos de isquemia/reperfusión se ha encontrado que el hígado graso presenta una mayor peroxidación lipídica, infiltración leucocitaria, liberación de $TNF\alpha$ y además, está alterada la microcirculación del hígado graso comparado con el tejido sano (Koneru y Dikdan, 2002). También se ha descrito que las ratas Zucker tienen la función secretora biliar alterada por disminución de la expresión de la proteína Mrp2 (Pizarro *et al.*, 2004), lo que induce una colestasis moderada, y se ha sugerido que esto podría contribuir a la mayor sensibilidad de estos animales ante un daño hepático.

Para estudiar los niveles de expresión de Svcts en el hígado de ratas Zucker elegimos machos de 12 semanas, ya que estudios previos describían que la esteatosis es evidente a partir de 12-14 semanas, sin que aparezcan aún signos significativos de inflamación (Pizarro *et al.*, 2004).

Como era de esperar, con 3 meses de edad, el peso corporal medio de las ratas obesas Zucker (385 g) fue 40% mayor ($p < 0.05$) que en las ratas heterocigóticas o "lean" de la misma edad utilizadas como control (273 g). De igual forma, el peso hepático fue significativamente mayor en las ratas Zucker (13.7 ± 0.9 g) que en las correspondientes

controles (8.2 ± 0.8 g) y también la relación hepatosomática fue superior en las ratas Zucker que en las “lean”.

La tabla 5 recoge los parámetros bioquímicos determinados en el suero de estos animales. Los niveles séricos de glucosa y triglicéridos fueron significativamente superiores en las ratas Zucker que en las “lean”, y no se encontraron otros cambios significativos de daño hepático, ni renal.

Los niveles séricos de ácidos biliares y bilirrubina en estos animales fueron similares a los encontrados en ratas Wistar de la misma edad, lo que indicaba que la eliminación biliar de estos aniones orgánicos no parecía estar afectada en las ratas Zucker.

Tabla 5. Marcadores séricos de funcionalidad hepática y renal determinados en ratas lean y obesas. Los valores son media \pm EEM de 7 animales en cada grupo.
^a, $p < 0.05$ comparando las ratas obesas con las lean por el test de *t* de Student.

Parámetros bioquímicos	Lean (μ /fa)	Obesas (fa/fa)
Glucosa (mg/dl)	69 ± 11	193 ± 59^a
AST (U/l)	150 ± 23	118 ± 37
ALT (U/l)	34.5 ± 0.5	42.5 ± 1.5
GGT (U/l)	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
AP (U/l)	95.5 ± 6.5	155 ± 37
Bilirrubina total (mg/dl)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Ácidos biliares (μ M)	15.2 ± 0.9	14.0 ± 1.3
Colesterol (mg/dl)	72.5 ± 2.5	91.5 ± 2.5
HDL (mg/dl)	51.5 ± 0.5	52.0 ± 1.0
Triglicéridos (mg/dl)	29 ± 2	216 ± 32^a
Urea (mg/dl)	31 ± 0.8	35.2 ± 1.9
Creatinina (mg/dl)	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0

Además de la diferencia de tamaño entre el hígado de las ratas Zucker y el de las “lean”, también a nivel macroscópico se observaron diferencias, ya que los hígados de las ratas obesas tenían un color más claro y una menor consistencia, lo que es compatible con la acumulación de grasa en el tejido.

El estudio de microscopía óptica permitió comprobar que el aspecto del parénquima hepático de las ratas “lean” parecía normal (figura 16), similar al tejido hepático de ratas Wistar control de la misma edad.

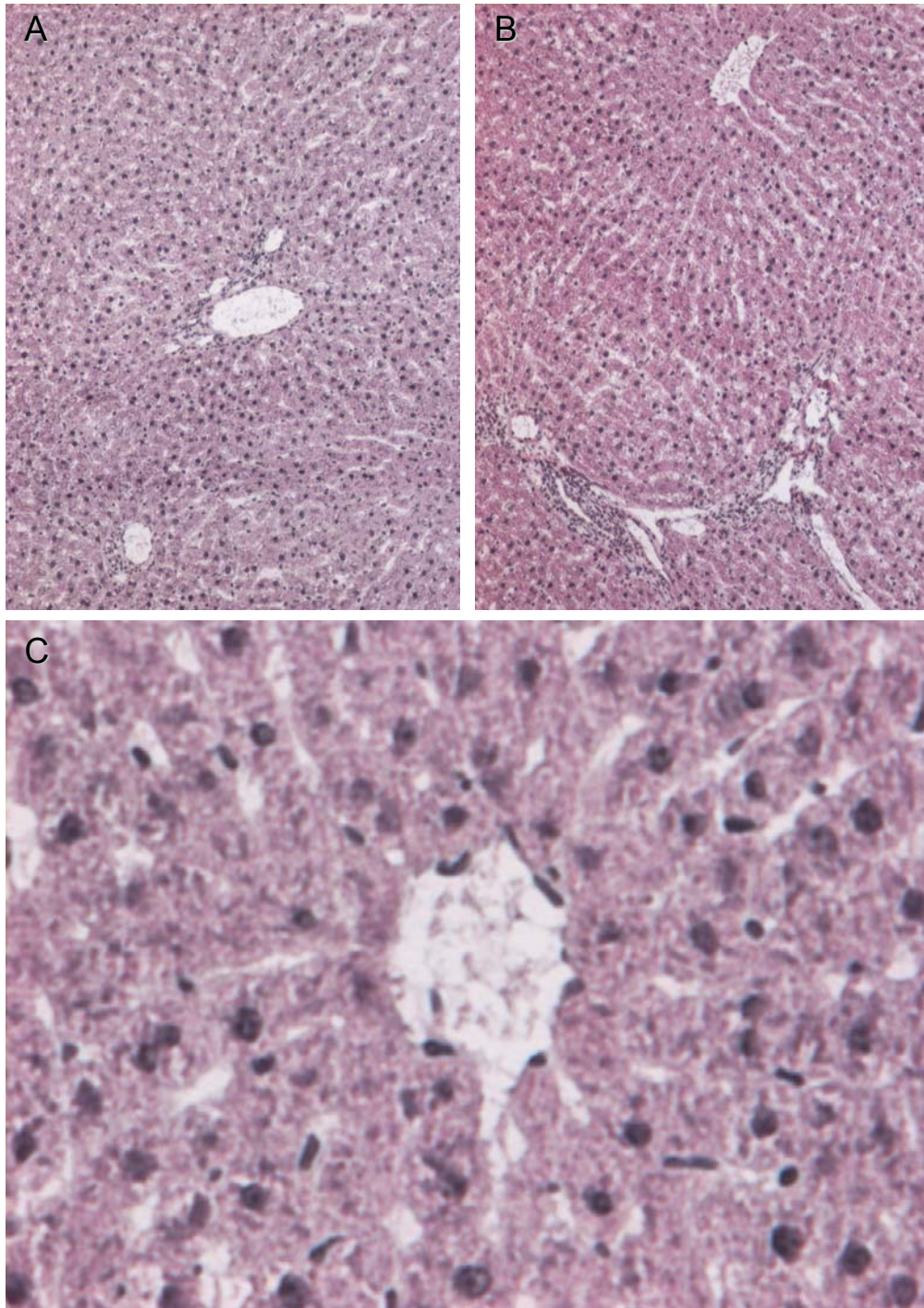


Figura 16. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata “lean”, teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina, observadas al microscopio óptico. **A, B:** objetivo 10x; **C:** objetivo 40x.

Sin embargo, en las ratas obesas de 12 semanas (figura 17) se observó que el parénquima hepático estaba ligeramente desorganizado y aparecían algunas zonas con esteatosis microvesicular y muchas más con esteatosis macrovesicular (asteriscos en figura 17).

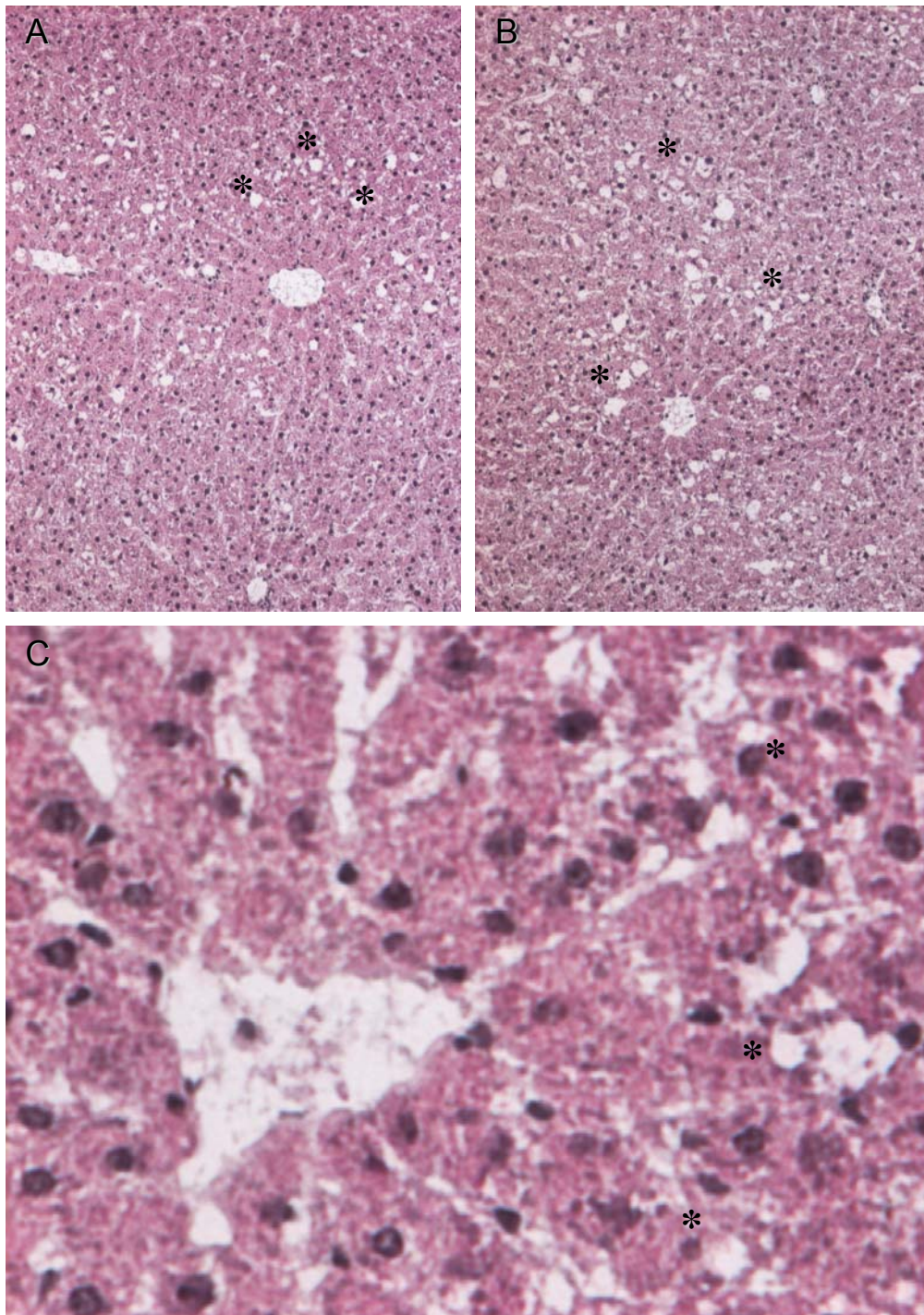


Figura 17. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata obesa Zucker, teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina, observadas al microscopio óptico. Los asteriscos indican acúmulos de grasa. **A, B:** objetivo 10x; **C:** objetivo 40x.

Cuando comparamos los niveles de mRNA hepático de Svct1 y Svct2 entre las ratas “lean” y las ratas Zucker (figura 18) encontramos una tendencia a disminuir la expresión de ambos en las ratas Zucker, que no llegó a ser significativa. Sin embargo, hay que destacar que encontramos diferencias importantes en la expresión de ambas isoformas de Svct en el hígado de las ratas “lean” comparada con el de las ratas Wistar control, que utilizamos como calibrador (datos no mostrados). Así, la expresión de Svct1 en las ratas “lean” fue un 50% de las control ($p < 0.01$), mientras que la de Svct2 fue 3 veces superior en las “lean” que en las control ($p < 0.01$).

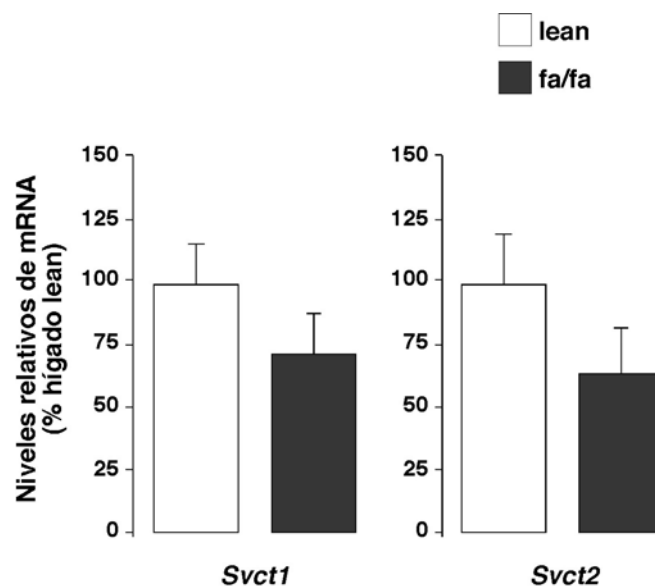


Figura 18. Efecto de la obesidad en las ratas Zucker (*fa/fa*), genéticamente deficientes en el receptor de la leptina, en la expresión hepática del mRNA de Svct1 y Svct2 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 7 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas lean y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas lean por el test de *t* de Student.

La expresión hepática de las tres Oatps también fue menor en las ratas “lean” que en las Wistar control (datos no mostrados); 5 veces más baja para Oatp1 y alrededor de 2 veces menor para Oatp2 y Oatp4 ($p < 0.01$, para todas ellas). Además, como se muestra en la figura 19, en las ratas Zucker los niveles de mRNA de las tres Oatps fueron significativamente menores que los encontrados en las ratas “lean”.

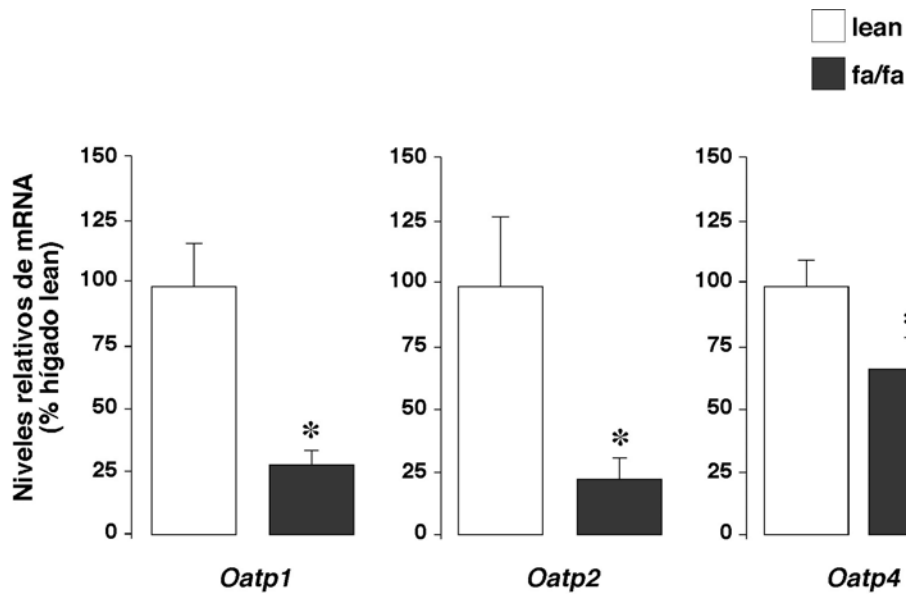


Figura 19. Efecto de la obesidad en las ratas Zucker (*fa/fa*), genéticamente deficientes en el receptor de la leptina, en la expresión hepática del mRNA de Oatp1, Oatp2 y Oatp4 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 7 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas lean y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas lean por el test de *t* de Student.

Como hemos comentado anteriormente, las ratas obesas Zucker presentan una elevada susceptibilidad frente a agresiones hepáticas, que se ha asociado en parte a que la función secretora biliar está dañada porque los niveles de la proteína canalicular Mrp2, responsable de la secreción a bilis de diversas sustancias endógenas y exógenas, está disminuida (Pizarro *et al.*, 2004).

La menor expresión hepática de las proteínas transportadoras de aniones orgánicos Oatps que hemos encontrado en las ratas Zucker podría contribuir a explicar la menor capacidad secretora biliar que se ha descrito en estos animales (Pizarro *et al.*, 2004) al estar probablemente disminuida la captación hepática de aquellos compuestos que son sustratos de Oatps.

Por otra parte, el hecho de que la concentración de ácidos biliares en suero de estos animales sea normal podría justificarse porque los niveles de expresión en las ratas “lean” y obesas de la proteína Ntcp, responsable de la captación de estas moléculas desde la sangre sinusoidal, son similares a los de las ratas control, como se ha puesto de manifiesto en un trabajo reciente llevado a cabo en colaboración entre nuestro grupo de investigación y el que dirige la Dra. Ochoa en la Universidad del País Vasco (Aspichueta *et al.*, 2008).

Una evidencia de que existen diferencias importantes en la regulación de la expresión de los transportadores de AA, Svcts, y la de otros transportadores de aniones orgánicos como las Oatps, es el hecho de que los niveles de mRNA de Svct1 y Svct2 sólo estaban moderadamente disminuidos en las ratas obesas comparadas con las “lean”.

Como conclusión funcional podemos sugerir que el hígado de las ratas obesas no cuenta con una menor capacidad de captar vitamina C. Tampoco este mecanismo de defensa está aumentado. Por todo ello, el papel de esta vitamina en la defensa frente a la agresión oxidativa que se asocia al trastorno metabólico propio de la esteatosis probablemente depende de los niveles de aporte endógeno (síntesis en el caso de la rata) y exógeno (ingesta con el alimento) de vitamina C y no de la capacidad de las células hepáticas de captarla de la sangre.

4.3.2. EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATAS DIABÉTICAS

El modelo de diabetes inducida por administración de estreptozotocina en ratas ha sido utilizado en numerosos trabajos por ser un método sencillo y reproducible. Un estudio llevado a cabo en nuestro grupo de investigación hace varios años demostró que la diabetes induce colestasis y que la menor formación de bilis no está relacionada con un daño hepático general, sino que la hiperglucemia y la insulinemia actúan como factores colestáticos disminuyendo la fracción independiente de ácidos biliares del flujo de bilis (García-Marin *et al.*, 1988).

Un estudio más reciente ha confirmado esos resultados y ha descrito que la diabetes no induce cambios en las proteínas responsables del transporte de aniones orgánicos colefilicos en los hepatocitos, ni en los localizados en la membrana basolateral, ni en los que se encuentran en la membrana apical (Nowicki *et al.*, 2008).

En el modelo de diabetes por administración de estreptozotocina se ha demostrado que el metabolismo del AA está alterado y que los niveles de AA en plasma, en el hígado y en el riñón están disminuidos debido a varios factores, como son: una mayor excreción urinaria de AA, una menor capacidad de regeneración de AA a partir de DHA y una menor biosíntesis *de novo* de esta vitamina (Kashiba *et al.*, 2002). También en pacientes diabéticos se ha demostrado que la excreción urinaria de AA está alterada (Yue *et al.*, 1989; Seghieri *et al.*, 1994).

En nuestro estudio, la inyección por vía intraperitoneal de estreptozotocina (0.6 mg/Kg p.c.) a ratas (machos adultos de 3 meses de edad) no produjo cambios significativos ni en el peso corporal ni hepático a los 6 días de la administración del tóxico comparado con animales control (datos no mostrados).

El desarrollo de la diabetes se diagnosticó a los 3 días de la administración de la estreptozotocina por determinación de los niveles de glucosa en una gota de sangre obtenida por punción en la vena de la cola y posteriormente se confirmó en la analítica realizada en una muestra de sangre obtenida de la vena cava en los animales anestesiados a los 6 días. Se utilizaron los animales con valores de glucemia mayores de 200 mg/dl a los 3 y 6 días. Un 20% de los animales no superó estos criterios tras la administración del compuesto y no se incluyeron en el estudio.

La tabla 6 muestra los valores de glucemia obtenidos en los animales a los 6 días de la administración de la estreptozotocina junto con la batería de parámetros marcadores de funcionalidad hepática y renal que se analizaron en suero.

La concentración de glucosa en suero en los animales que recibieron estreptozotocina fue 4 veces mayor que en las ratas control, y no se encontraron cambios significativos en el resto de marcadores de funcionalidad hepática, ni tampoco en los de funcionalidad renal (tabla 6). No se observaron signos de marcada colestasis en las ratas diabéticas, ya que, aunque los niveles séricos de ácidos biliares y la fosfatasa alcalina mostraban una tendencia al alza que era coherente con una moderada colestasis (Garcia-Marin *et al.*, 1988), permanecían dentro de los límites normales.

Tabla 6. Marcadores séricos de funcionalidad hepática y renal determinados en ratas control y diabéticas. Los valores son media \pm EEM de 5 animales en cada grupo. ^a, $p < 0.05$ comparando las ratas diabéticas con las control por el test de *t* de Student.

Parámetros bioquímicos	Control	Diabetes
Glucosa (mg/dl)	75 \pm 10	307 \pm 72 ^a
AST (U/l)	93.2 \pm 12.1	75.3 \pm 9.4
ALT (U/l)	46.7 \pm 1.5	45.3 \pm 6.4
GGT (U/l)	5.0 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0
AP (U/l)	190 \pm 29	231 \pm 37
Bilirrubina total (mg/dl)	0.2 \pm 0.05	0.2 \pm 0.02
Ácidos biliares (μ M)	10.3 \pm 1.9	16.3 \pm 2.7
Urea (mg/dl)	32.2 \pm 1.7	47.3 \pm 4.9
Creatinina (mg/dl)	0.4 \pm 0.05	0.5 \pm 0.05

Para obtener información del daño hepático inducido por la estreptozotocina se realizó un estudio histológico en cortes de hígado de 5 μ m de espesor que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La figura 20 muestra imágenes representativas de cortes de hígado de rata control teñidos con hematoxilina-eosina en las que se observa la distribución característica de las filas de hepatocitos desde una vena central (VC) hacia los espacios porta.

La figura 21 corresponde a cortes de hígado de rata con diabetes inducida por administración de estreptozotocina. Llama la atención la fuerte coloración con eosina de los cortes hígado de las ratas diabéticas comparadas con los de las control, sobretodo si tenemos en cuenta que las muestras de hígado de las ratas control y diabéticas se colocaban en los mismos portas y por lo tanto se procesaban a la vez.

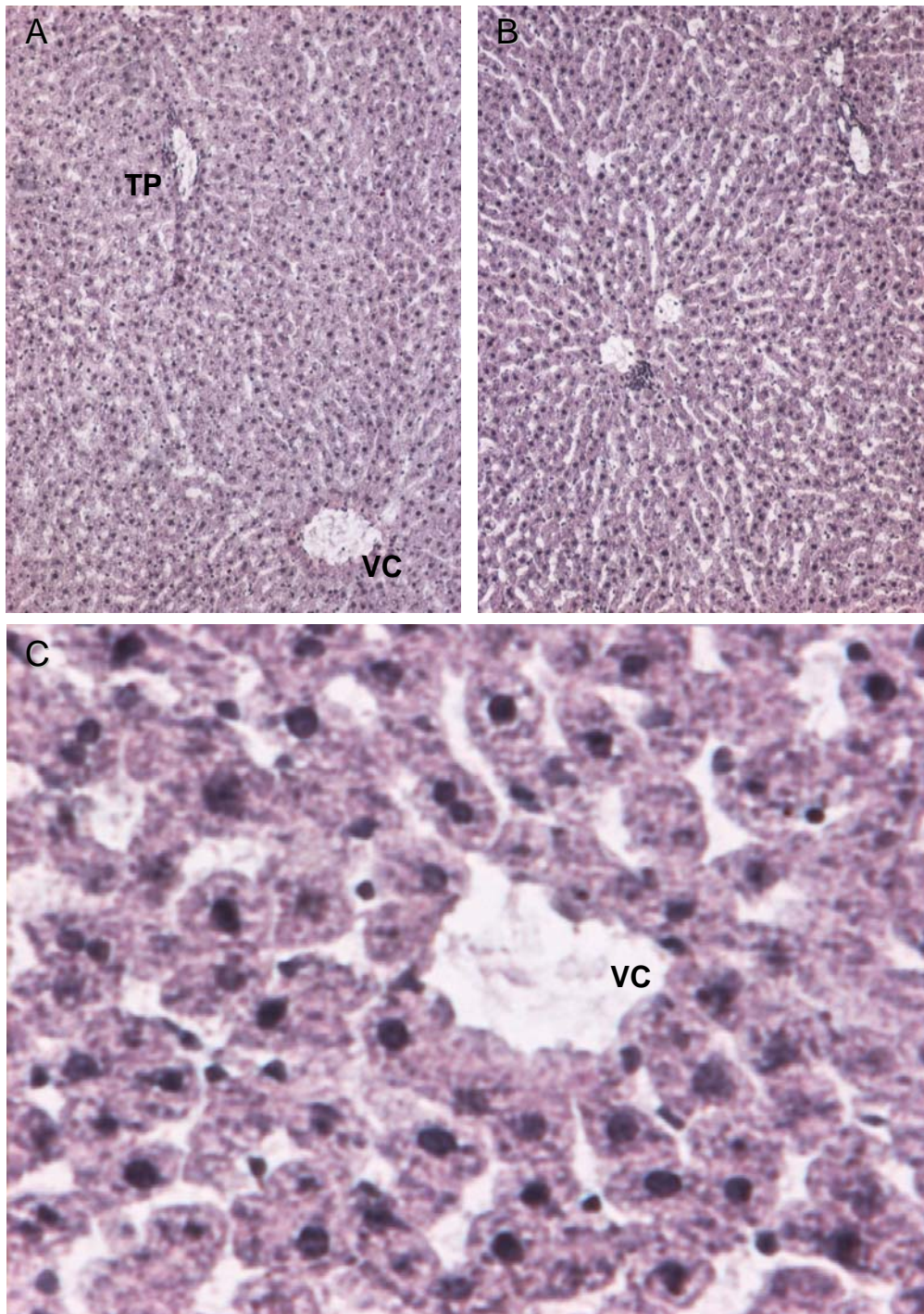


Figura 20. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata control teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina. VC: vena central; TP: tracto portal. Magnificación original en **A** y **B**: 10x; en **C**: 40x.

La persistencia de una glucemia elevada se ha relacionado con la inducción de cambios metabólicos que causan estrés oxidativo, con acumulación de grasa y glucógeno en el citoplasma de los hepatocitos. Se ha sugerido que la acumulación de estas sustancias produce cambios en el pH intracelular que probablemente son responsables

del cambio de coloración que hemos observado (Torbenso *et al.*, 2006). Además, en situaciones severas se ha descrito que hay un reclutamiento de neutrófilos y que aumenta la liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 e IL-1 β) (Geller y Petrovic *et al.*, 2003).

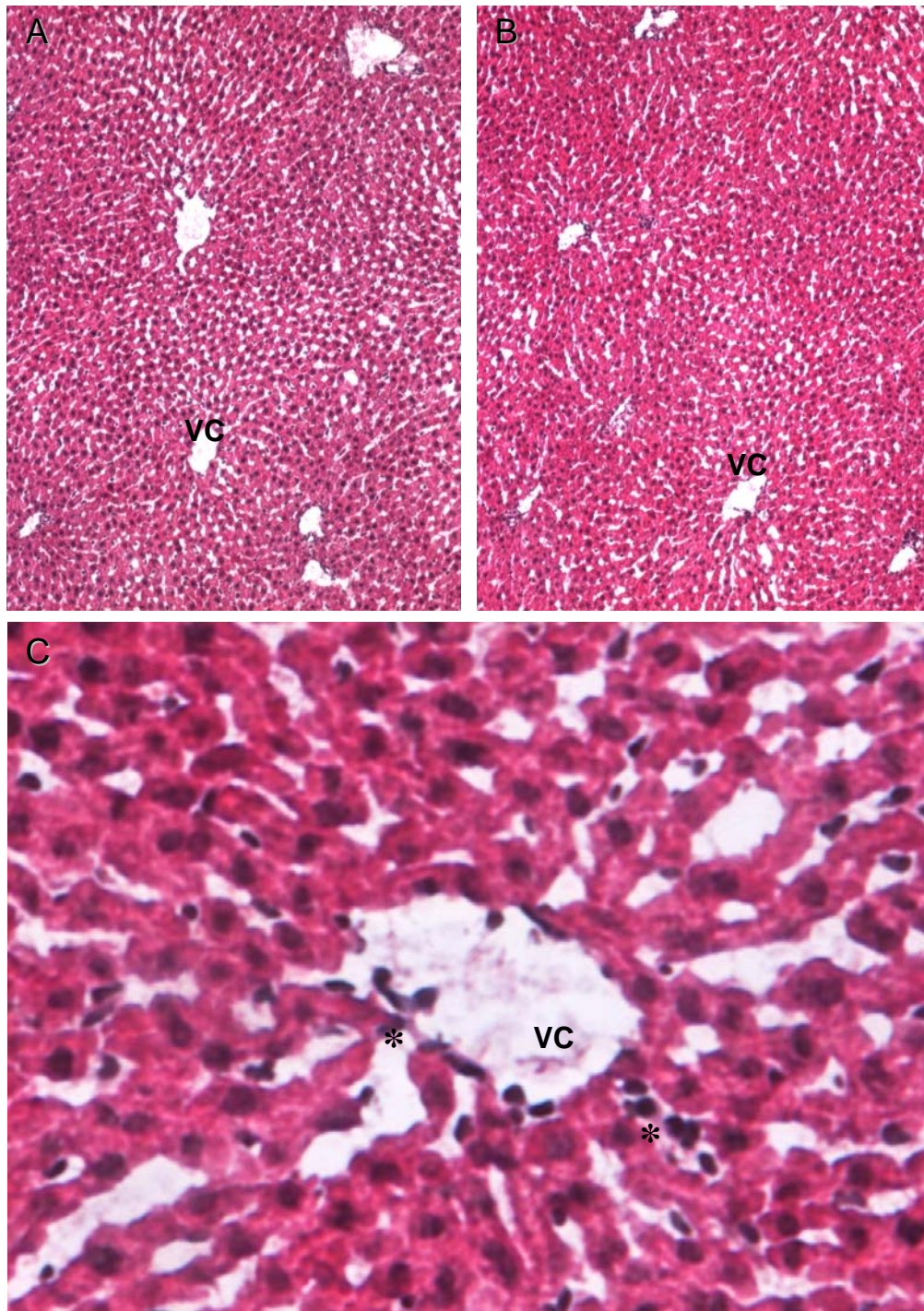


Figura 21. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata diabética por administración de estreptozotocina teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina. VC: vena central. Los asteriscos indican infiltración leucocitaria. Magnificación original en **A** y **B**: 10x; en **C**: 40x.

Nuestros resultados muestran una leve infiltración leucocitaria (asteriscos en figura 21C) indicativa de un proceso inflamatorio, cuya magnitud parece moderada, quizás debido a que la hiperglucemia se ha mantenido durante un periodo relativamente corto.

Cuando investigamos si la diabetes inducía cambios en la expresión hepática de las Svcts (figura 22) encontramos que los niveles de mRNA de Svct1 en las ratas diabéticas eran significativamente menores que en las ratas controles, mientras que no se detectaron cambios para Svct2.

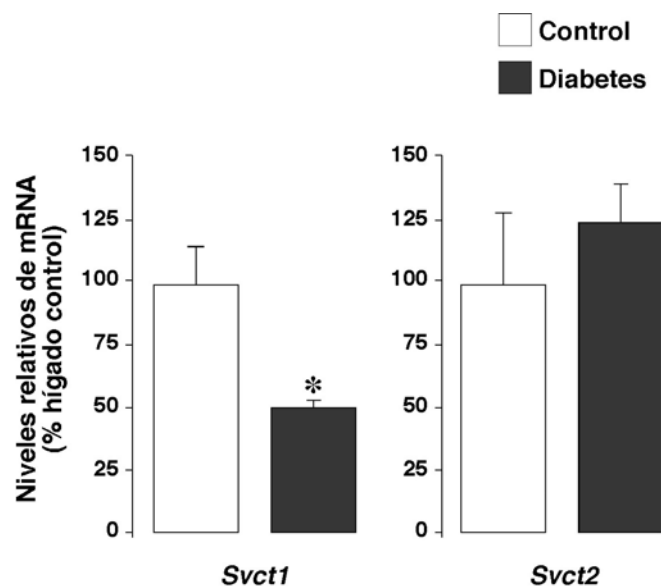


Figura 22. Efecto de la diabetes inducida por administración de estreptozotocina en la expresión hepática del mRNA de Svct1 y Svct2 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 5 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas control y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de t de Student.

Sin embargo, la abundancia relativa del mRNA de ninguna de las Oatps hepáticas se modificó significativamente en los animales diabéticos respecto a los controles (figura 23), aunque encontramos una tendencia a aumentar los niveles de expresión en las ratas diabéticas.

En estudios previos en ratas diabéticas utilizando el mismo modelo experimental se había descrito que estos animales tenían un menor contenido hepático de AA a los 3 días de la administración de estreptozotocina, pero no se encontraron cambios en la expresión hepática de las Svcts (Kashiba *et al.*, 2002). Tampoco se observaron cambios en la expresión de transportadores Svcts a nivel renal a pesar de que había una mayor pérdida

en orina de esta vitamina, lo que llevó a estos autores a sugerir que la excreción renal de AA aumentaba debido al mayor flujo urinario como resultado de la diuresis osmótica causada por la hiperglucemia.

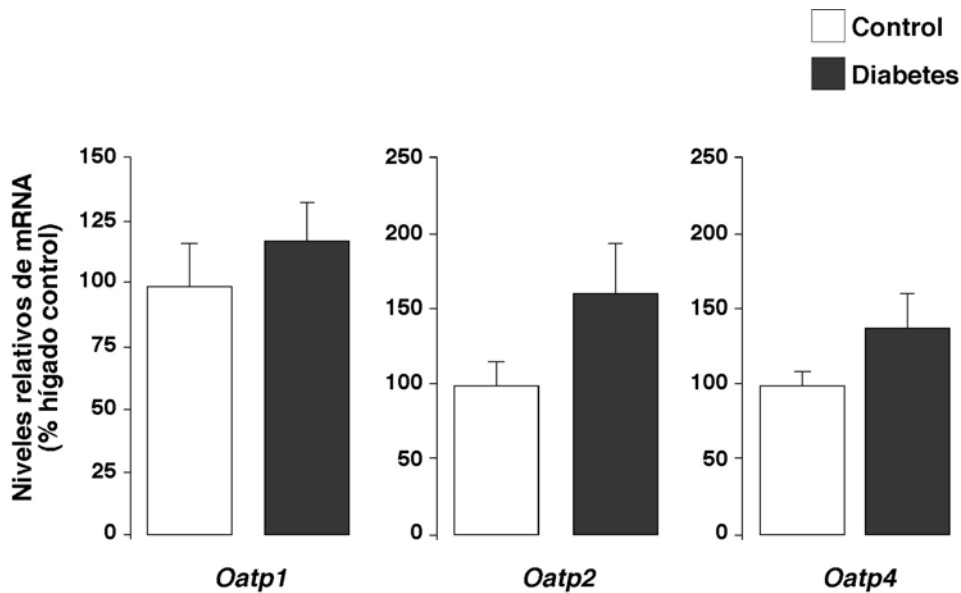


Figura 23. Efecto de la diabetes inducida por administración de estreptozotocina en la expresión hepática del mRNA de Oatp1, Oatp2 y Oatp4 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 5 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas control y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de t de Student.

En nuestro estudio hemos investigado la expresión hepática de proteínas transportadoras de AA a los 6 días de la administración de estreptozotocina, y hemos encontrado que los niveles de mRNA de Svct1 estaban reducidos, pero los de Svct2, al igual que los de las Oatps no se vieron afectados por la diabetes. La discrepancia entre nuestro estudio y el llevado a cabo por Kashiba *et al.* (2002) podría explicarse por el diferente tiempo en el que se llevó a cabo la determinación de la expresión de estos transportadores.

En este estudio, la Svct2 parece más establemente expresada que la Svct1, lo que quizás podría ser un reflejo de que no hay un daño importante en el hígado que aumente la infiltración hepática de células de Kupffer, que expresan abundantemente la isoforma Svct2.

Por otra parte, nuestros resultados apoyan que las alteraciones metabólicas en los hepatocitos debidas a la diabetes, que tienen como consecuencia una menor cantidad de

AA en el tejido hepático, podrían explicarse por la reducción de la expresión de la proteína mayoritaria en estas células, la Svct1.

Un detalle importante a tener en cuenta es que una pérdida urinaria excesiva de vitamina C puede tener mayor importancia en humanos, puesto que nuestra especie no tiene la capacidad de sintetizar AA. Esto significa que, en pacientes cuya diabetes que no esté bien controlada, los niveles de AA en el organismo podrían llegar a disminuir hasta niveles alejados de las condiciones óptimas para afrontar una situación de elevado estrés oxidativo, lo que podría agravar el daño causado por las alteraciones bioquímicas y endocrinas que caracterizan a la diabetes *mellitus*.

Además, hay que señalar, que puesto que ni la expresión de Svcts ni la de Oatps se modifican en el mismo sentido en los dos modelos estudiados (obesidad en Zucker y diabetes por estreptozotocina) que tienen en común la hiperglucemia, parece poco probable que éste sea el factor que esté implicado de forma directa en los cambios observados. Otros factores relacionados con el hígado graso en la rata Zucker deben ser responsables de la caída de los niveles de expresión de las Oatps.

4.3.3. EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATAS CON COLESTASIS OBSTRUCTIVA DURANTE 1 SEMANA

La colestasis extrahepática obstructiva se produce en distintas hepatopatías, como en la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante, la litiasis biliar, etc. En todos los casos, la retención de los componentes de la bilis desencadena cambios fisiopatológicos que producen un daño celular que evoluciona a fibrogénesis hepática. Generalmente, el daño se inicia en los hepatocitos, lo que induce el reclutamiento de células inflamatorias y plaquetas, la activación de las células de Kupffer con liberación de citocinas y factores de crecimiento (Kullak-Ublick y Meier, 2000). Las células estrelladas se activan, lo que lleva a un aumento de la síntesis de colágeno (Desmet *et al.*, 1995) y también se produce una proliferación de los colangiocitos (Desmet *et al.*, 1995; Strazzabosco *et al.*, 2005).

La colestasis obstructiva por ligadura del conducto biliar común en la rata induce un tipo de fibrosis que se asemeja en gran medida a la fibrosis biliar en humanos. El daño en los hepatocitos produce un aumento de la peroxidación lipídica, que tiene un efecto directo estimulando la producción de matriz extracelular por las células estrelladas activadas. Además, la ligadura del conducto biliar se asocia con daño oxidativo, fibrosis, cirrosis e hipertensión portal y con un descenso en las defensas antioxidantes y un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (Karaman *et al.*, 2006). Existe cierta controversia sobre si las especies reactivas de oxígeno inducen fibrogénesis de forma directa (Britton y Bacon, 1994) o si lo hacen de forma indirecta por aumentar la peroxidación lipídica (Parola *et al.*, 1996).

En estudios recientes realizados en nuestro grupo de investigación se demostró que el tejido hepático tanto materno como fetal y el tejido placentario sufren daño oxidativo durante la colestasis obstructiva gestacional en la rata (Perez *et al.*, 2006; 2007).

Para estudiar el efecto de la colestasis sobre la expresión hepática de Svcts utilizamos ratas machos de 3 meses de edad, a las que se les realizó una doble ligadura del conducto biliar común seguida de un corte entre las dos ligaduras (Monte *et al.*, 1996; Macias *et al.*, 2000).

La colestasis produjo un descenso del peso corporal de aproximadamente un 8% al cabo de una semana, mientras que las ratas control (a las que se manipuló el conducto biliar separándolo ligeramente del tejido circundante pero sin llevar a cabo la ligadura) durante ese tiempo ganaron alrededor de un 5% de peso.

La colestasis se confirmó por el aumento de la concentración sérica de ácidos biliares y bilirrubina (x45 y x20 veces más que en animales control, respectivamente) (tabla 7). El tejido hepático se vio profundamente afectado por la colestasis, como lo demuestra el aumento significativo de varios parámetros bioquímicos determinados en suero utilizados habitualmente en clínica como marcadores de funcionalidad hepática (tabla 7): la fosfatasa alcalina, la γ -glutamil transpeptidasa y las transaminasas. En este tiempo la funcionalidad renal no se vio alterada, ya que no se observaron cambios significativos en los niveles séricos de urea y creatinina.

Tabla 7. Marcadores séricos de funcionalidad hepática y renal determinados en ratas control y colestáticas. Los valores son media \pm EEM de 5 animales en cada grupo. ^a, $p < 0.05$ comparando las ratas colestáticas con las control por el test de t de Student.

Parámetros bioquímicos	Control	Colestasis
Glucosa (mg/dl)	60 \pm 10	95 \pm 8
AST (U/l)	111 \pm 18	368 \pm 52 ^a
ALT (U/l)	48.8 \pm 1.5	69.8 \pm 19 ^a
GGT (U/l)	5.0 \pm 0.1	38 \pm 2.8 ^a
AP (U/l)	156 \pm 40	383 \pm 28 ^a
Bilirrubina total (mg/dl)	0.2 \pm 0.1	3.8 \pm 0.6 ^a
Ácidos biliares (μ M)	7.2 \pm 2.4	325 \pm 46 ^a
Urea (mg/dl)	24.8 \pm 0.8	37.5 \pm 3.6
Creatinina (mg/dl)	0.4 \pm 0.05	0.6 \pm 0.05

El aspecto macroscópico de la mayoría de los hígados era normal en los animales con colestasis durante 1 semana, aunque en algunos casos se observó una apariencia cirrótica. Sin embargo, en el estudio histopatológico se encontraron cambios importantes en el tejido hepático respecto al grupo control (figura 20), aunque como se observa en las figuras 24 y 25, que corresponden a imágenes obtenidas de distintos animales con colestasis, el daño no evolucionaba igual en todos los animales.

En algunos casos se observaba necrosis e infiltración leucocitaria, especialmente en los espacios porta (flechas en figura 24), y esteatosis microvesicular y macrovesicular (puntas de flecha en figura 24), mientras que en otros animales era más llamativa la

destrucción de ductos biliares (asteriscos en figura 25) junto a grandes áreas de proliferación ductular (flechas en figura 25).

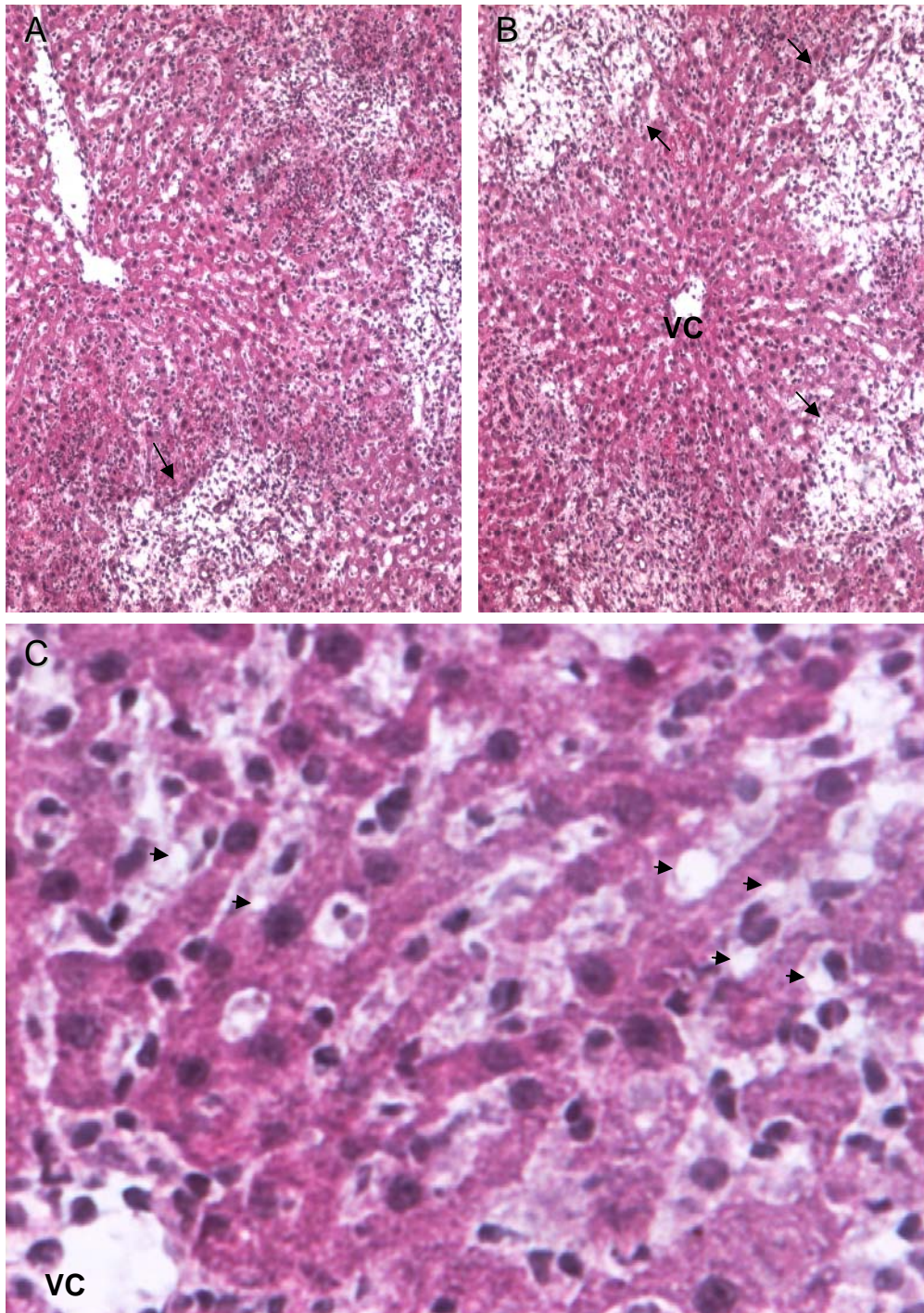


Figura 24. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata con colestasis obstructiva mantenida durante 1 semana teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina. VC: vena central. Las flechas muestran zonas de necrosis e infiltración leucocitaria en los espacios porta. Las puntas de flecha señalan esteatosis micro- y macrovesicular. Magnificación original en **A** y **B**: 10x; en **C**: 40x.

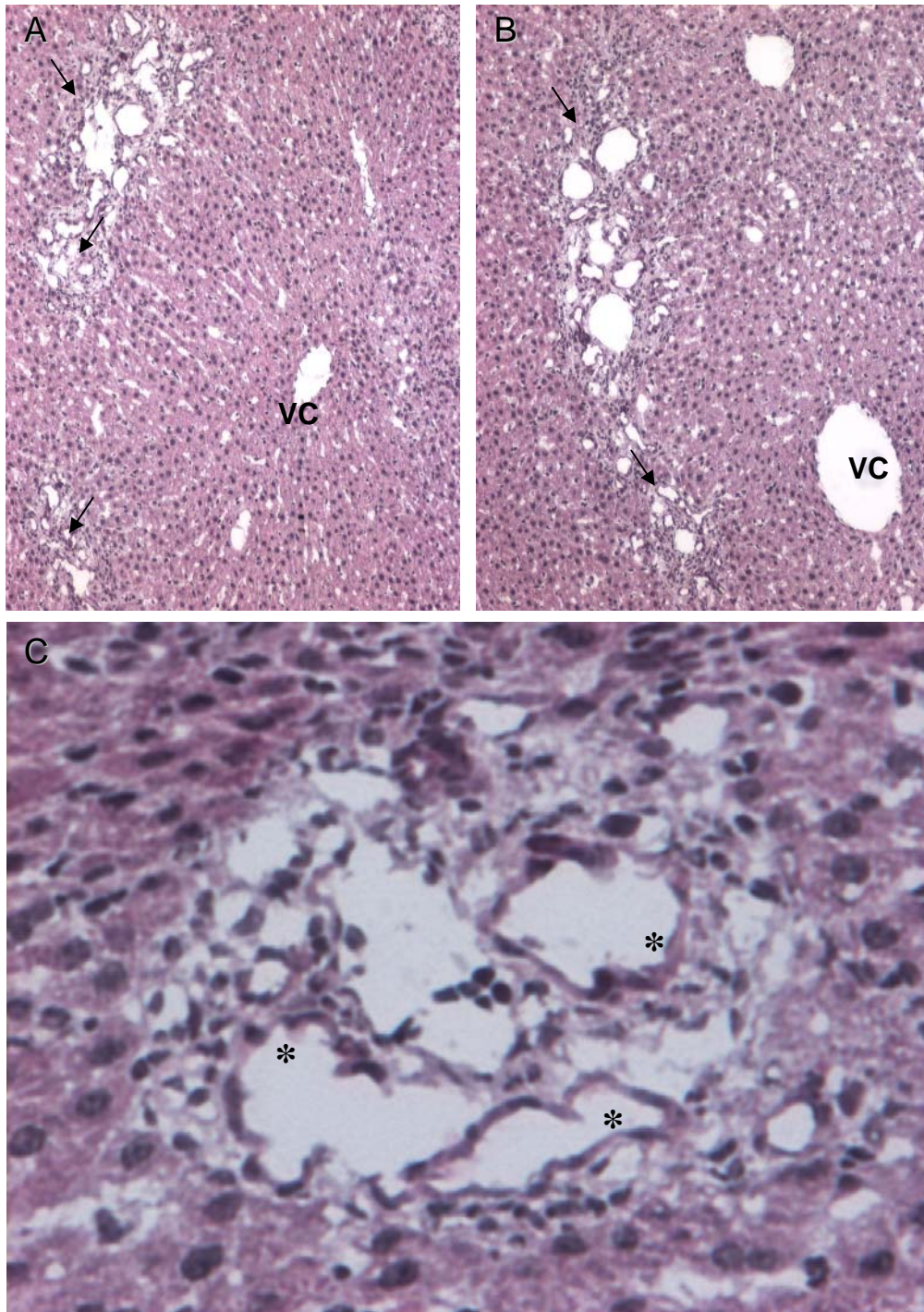


Figura 25. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata con colestasis obstructiva mantenida durante 1 semana teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina. VC: vena central. Las flechas muestran zonas de proliferación ductular. Las asteriscos señalan áreas de destrucción de ductulos biliares. Magnificación original en **A** y **B**: 10x; en **C**: 40x.

En lo que se refiere a la expresión de Svcts (figura 26), no aparecieron cambios en los niveles de Svct1 debidos a la acumulación de sustancias colefílicas en el tejido hepático, y sí un aumento importante y significativo de la expresión del mRNA de Svct2.

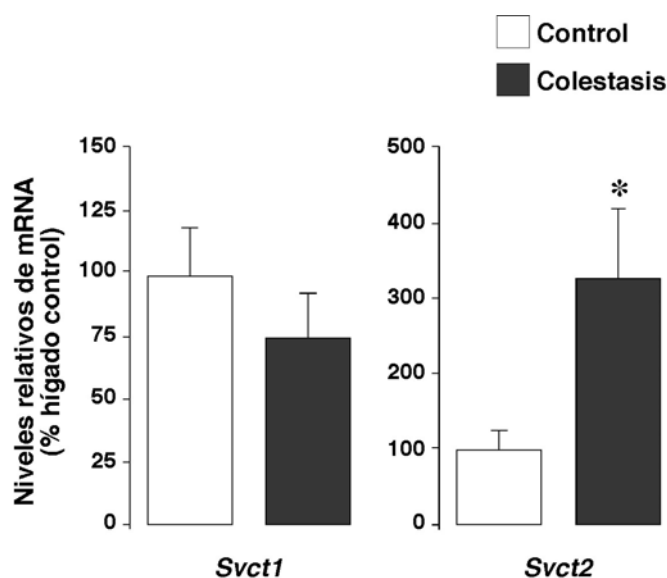


Figura 26. Efecto de la colestasis obstructiva durante 1 semana inducida por ligadura del conducto biliar en la expresión hepática del mRNA de Svct1 y Svct2 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 5 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas control y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de t de Student.

Estos resultados confirman los obtenidos en estudios previos de nuestro grupo en ratas gestantes con colestasis durante la tercera y última semana de gestación, en los que la acumulación de compuestos colefílicos inducía una compleja respuesta de defensa frente al estrés oxidativo en el hígado materno y fetal y en el tejido placentario, que incluía cambios en la expresión de las proteínas transportadoras de AA de la familia Svct (Perez *et al.*, 2007).

El aumento de la expresión de la Svct2 podría estar relacionado con un reclutamiento de células de Kupffer, ya que por inmunohistoquímica y utilizando el marcador de macrófagos tisulares comprobamos que en los tractos portales había una gran acumulación de estas células, y como hemos comentado en el apartado 4.1. de esta Tesis Doctoral, estos macrófagos presentan una elevada expresión de la isoforma Svct2 (figura 9).

No se puede descartar que la expresión de Svct1 esté también disminuida en los hepatocitos, lo que podría estar enmascarado por la proliferación de colangiocitos que se observa en el modelo y en los que hemos confirmado que tienen una marcada expresión de Svct1 (figura 7).

Respecto a las Oatps (figura 27), la colestasis durante una semana produjo una reducción de la expresión de todas las isoformas entre 4 y 5 veces comparado con los animales control.

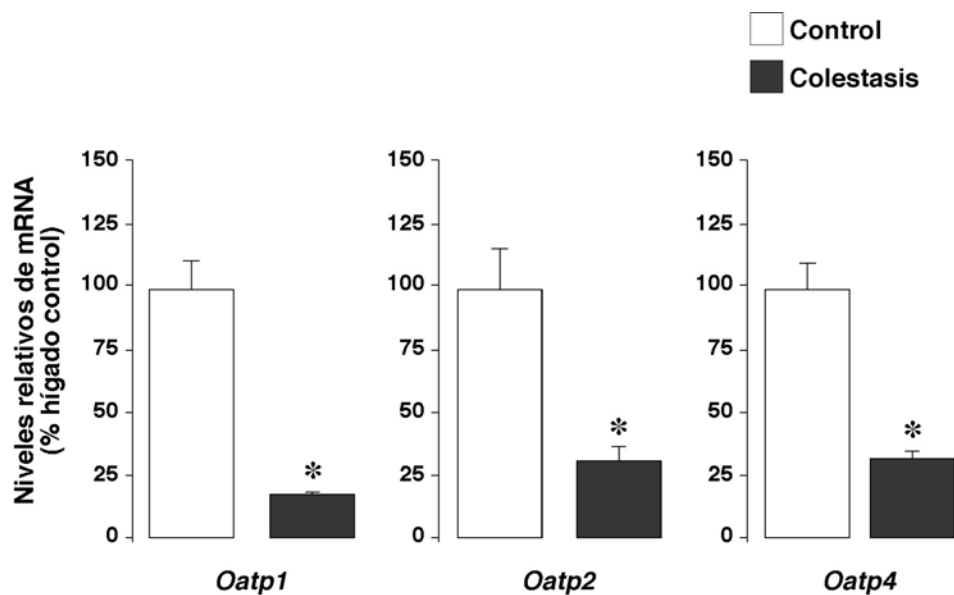


Figura 27. Efecto de la colestasis obstructiva durante 1 semana inducida por ligadura del conducto biliar en la expresión hepática del mRNA de Oatp1, Oatp2 y Oatp4 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 5 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas control y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de t de Student.

Sobre este punto existía cierta controversia, ya que en estudios llevados a cabo por Donner *et al.* (2007) se encontró que la colestasis por ligadura del conducto biliar mantenida durante 3 días disminuye los niveles de las tres Oatps, y que los valores se restablecen a los 7 días, mientras que otros estudios (Geier *et al.*, 2007) habían encontrado que la obstrucción biliar durante 1 semana induce una reducción de la expresión de las tres Oatps presentes en el tejido hepático, lo que concuerda con nuestros resultados.

Se ha sugerido que la reducción en la expresión hepática de los transportadores de aniones orgánicos representa una respuesta adaptativa al daño hepatocelular inducido

por la colestasis para evitar que se acumulen sustancias colefílicas que no pueden ser eliminadas en bilis (Gartung y Matern, 1997), a la vez que se ponen en marcha otros mecanismos que favorecen la eliminación de estos compuestos por vía renal (Lee *et al.*, 2001).

4.3.4. EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO DE RATAS CON COLESTASIS OBSTRUCTIVA DURANTE 8 SEMANAS

Muchas hepatopatías relativamente frecuentes en humanos se acompañan de un cierto grado de colestasis que se mantiene de forma crónica. La exposición del tejido hepático a elevadas concentraciones de sustancias que en condiciones fisiológicas se eliminan por vía biliar, como los ácidos biliares y la bilirrubina, va a agravar la situación patológica por un efecto tóxico directo de estas moléculas y por desencadenar una respuesta inflamatoria (Desmet *et al.*, 1995). Para investigar qué efecto tiene esta situación en la expresión de proteínas transportadoras de AA, decidimos incluir en nuestro estudio un grupo de animales que se siguieron durante 8 semanas tras la ligadura del conducto biliar.

La mortalidad en estos animales fue de un 20% entre la quinta y la octava semana tras la obstrucción biliar. Tras la caída de peso corporal que ocurría durante la primera semana tras la ligadura del conducto biliar, las ratas con colestasis crónica aumentaron de peso progresivamente de forma paralela a las ratas control (figura 28), pero su peso corporal se mantuvo siempre en valores significativamente menores que el de las ratas control desde la operación.

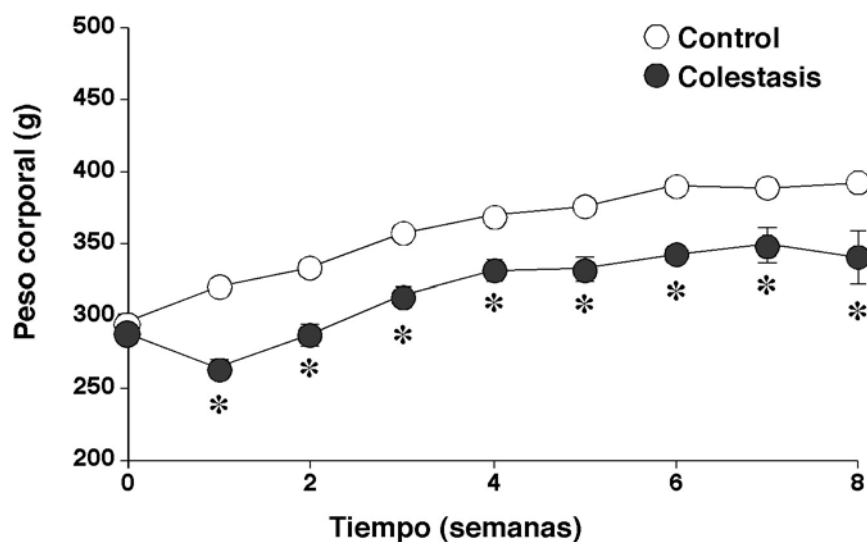


Figura 28. Efecto de la colestasis obstructiva inducida por ligadura del conducto biliar en la evolución del peso corporal durante 8 semanas. Los valores son media \pm EEM de 5 animales en cada grupo experimental. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de *t* de Student.

Un hecho llamativo en las ratas con colestasis crónica fue la marcada hepatomegalia que encontramos, ya que el peso hepático de estos animales fue 3 veces mayor que el

de las ratas control de la misma edad (10.5 ± 0.5 g). Esto hizo que al calcular la relación hepatosomática ésta fuera muy alta (8.2 ± 0.2), de hecho, casi el doble de la determinada en ratas control de la misma edad (tabla 1).

La tabla 8 muestra los resultados de las analíticas realizadas en el suero de estos animales. Al igual que lo que habíamos comentado en los animales que se sacrificaron tras 1 semana de colestasis, a las 8 semanas estaban aumentados significativamente los niveles séricos de bilirrubina, fosfatasa alcalina, γ -glutamil transpeptidasa y transaminasas. La colanemia fue 10 veces mayor que en los animales control, sin embargo, los niveles fueron menores que los encontrados tras 1 semana de colestasis, probablemente porque están inducidos los mecanismos que facilitan la eliminación de ácidos biliares y otros compuestos colefílicos por el riñón, para reducir los efectos tóxicos debidos a la acumulación de estas moléculas (Lee *et al.*, 2001). También hay que considerar que la síntesis *de novo* de ácidos biliares estará inhibida por el feed-back negativo que ejercen los ácidos biliares sobre la actividad Cyp7a1, la enzima llave en la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol (Chiang, 2009).

Además, en este momento la funcionalidad renal también se vio afectada, como lo demuestra el aumento significativo de la concentración sérica de urea y el ligero incremento de la creatinina (tabla 8).

Tabla 8. Marcadores séricos de funcionalidad hepática y renal determinados en ratas control y con colestasis obstructiva durante 8 semanas. Los valores son media \pm EEM de 5 animales en cada grupo. ^a, $p < 0.05$ comparando las ratas colestáticas con las control de la misma edad.

Parámetros bioquímicos	Control	Colestasis 8 sem
Glucosa (mg/dl)	67 ± 7	83.7 ± 10.4
AST (U/l)	93 ± 14	233 ± 22^a
ALT (U/l)	55 ± 8.5	54.0 ± 5
GGT (U/l)	5.0 ± 0.5	41.0 ± 7.0^a
AP (U/l)	104 ± 9	299 ± 55^a
Bilirrubina total (mg/dl)	0.2 ± 0.1	5.4 ± 0.2^a
Ácidos biliares (μ M)	10.7 ± 2.7	94.0 ± 20.9^a
Urea (mg/dl)	38.3 ± 2.5	103 ± 33^a
Creatinina (mg/dl)	0.5 ± 0.05	0.8 ± 0.2

A nivel macroscópico, además del aumento de tamaño, se apreciaba claramente que los hígados presentaban un aspecto cirrótico. La figura 29 muestra imágenes obtenidas en animales control de la misma edad, en las que se puede observar la característica distribución de las filas de hepatocitos desde una vena central y la normal disposición de las triadas portales.

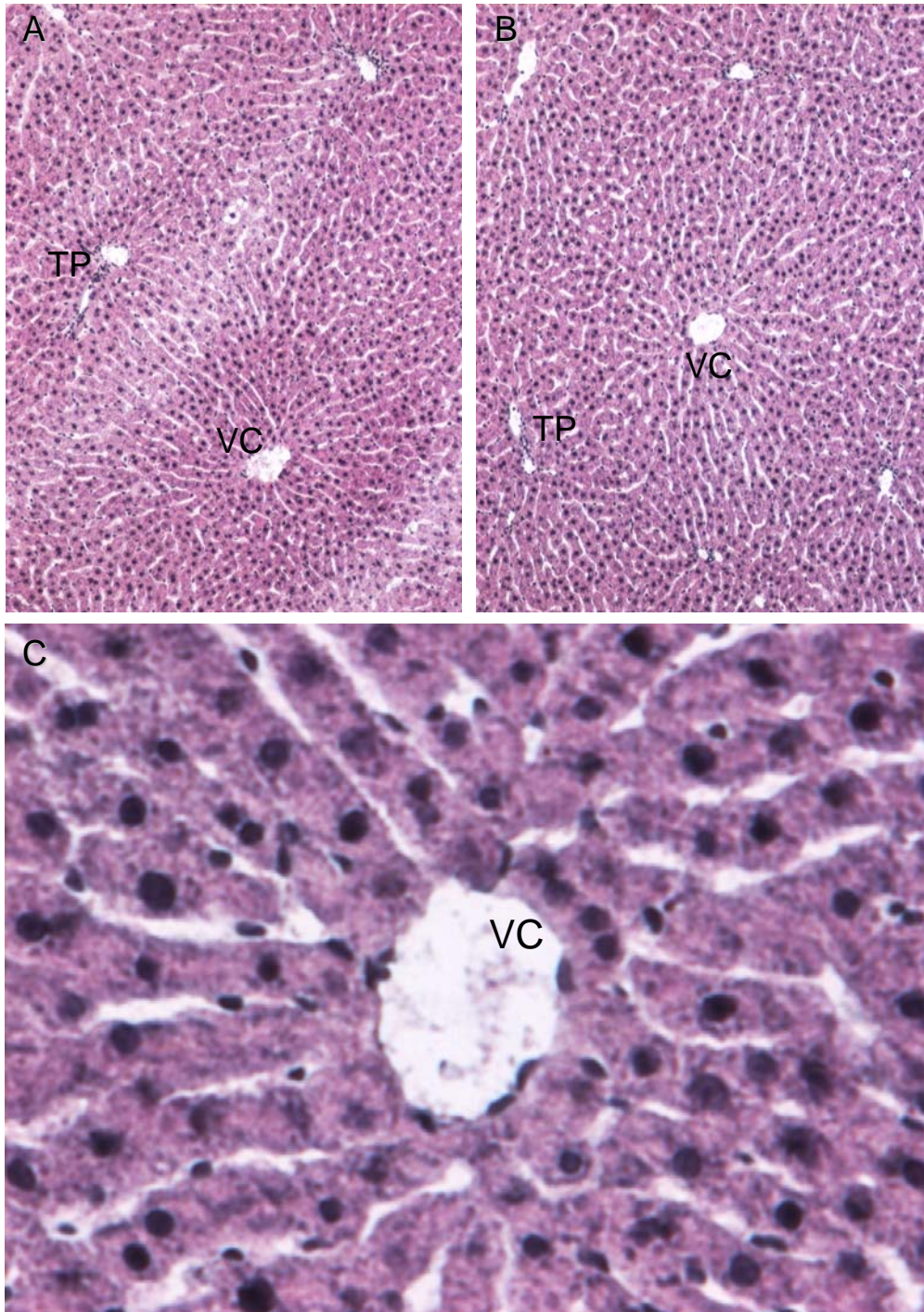


Figura 29. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata control, teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina, observadas al microscopio óptico. VC: vena central. TP: tracto portal. **A,B:** objetivo 10x; **C:** objetivo 40x.

El estudio histológico puso de manifiesto que la colestasis crónica producía una profunda desorganización de la arquitectura hepática, aunque existían diferencias entre los distintos animales, como se puede observar en las figuras 30-32, que corresponden a cortes de tejidos obtenidos de 3 ratas distintas teñidos con hematoxilina-eosina.

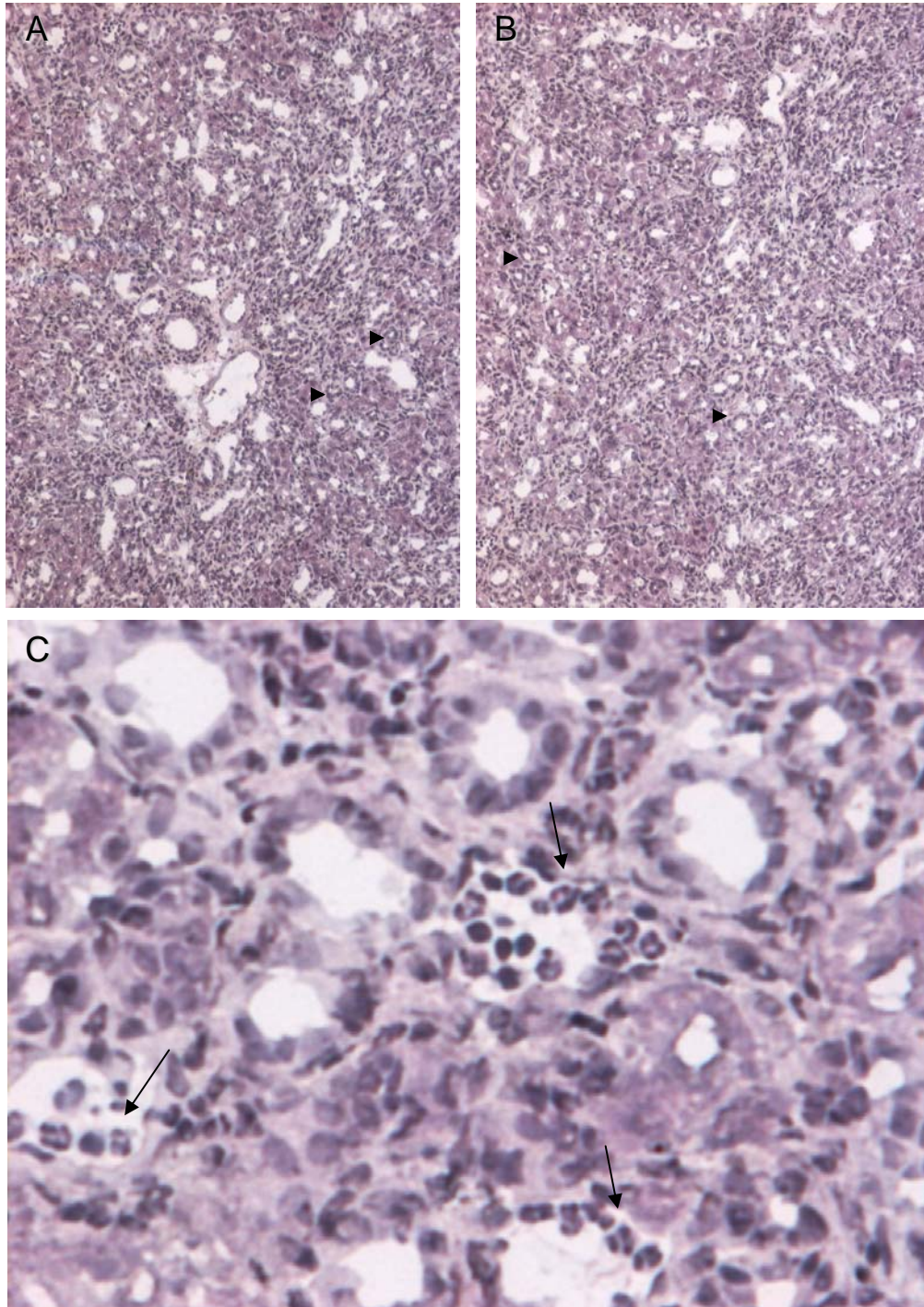


Figura 30. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas, teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina, observadas al microscopio óptico. Las puntas de flecha muestran zonas de proliferación ductular y las flechas infiltración de neutrófilos. **A,B:** objetivo 10x; **C:** objetivo 40x.

En todos los casos en las muestras analizadas procedentes de animales con colestasis crónica se observaban áreas de proliferación ductular (puntas de flecha en figuras 30 y 31), infiltración leucocitaria (flechas en figuras 30 y 32) y fibrosis (asteriscos en figura 31).

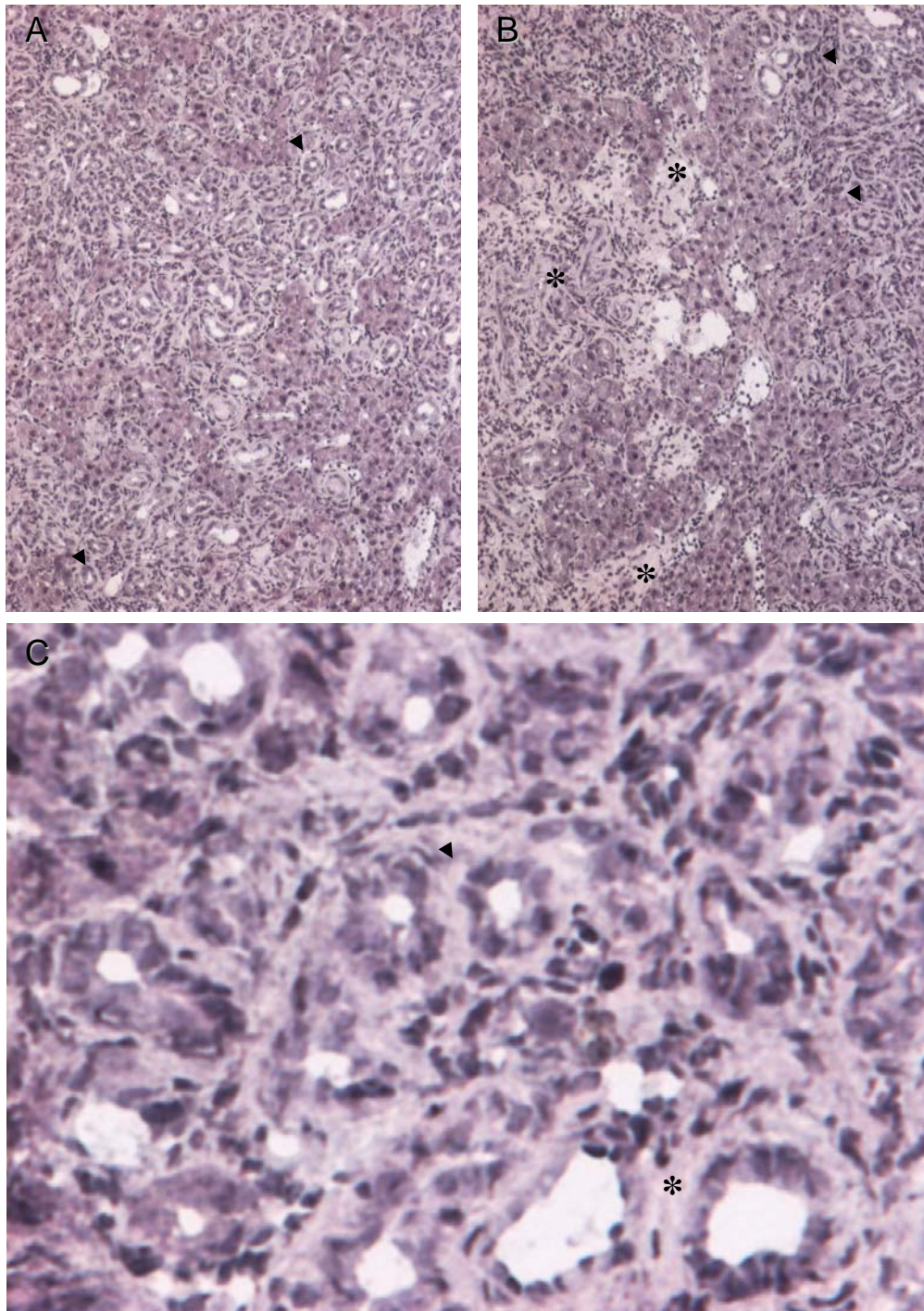


Figura 31. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas, teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina, observadas al microscopio óptico. Las puntas de flecha muestran zonas de proliferación ductular, y los asteriscos depósitos de colágeno y fibrosis. **A,B:** objetivo 10x; **C:** objetivo 40x.

Además, en algunas zonas se observaban hepatocitos binucleados (flechas en figura 32), lo que es indicativo de regeneración hepática.

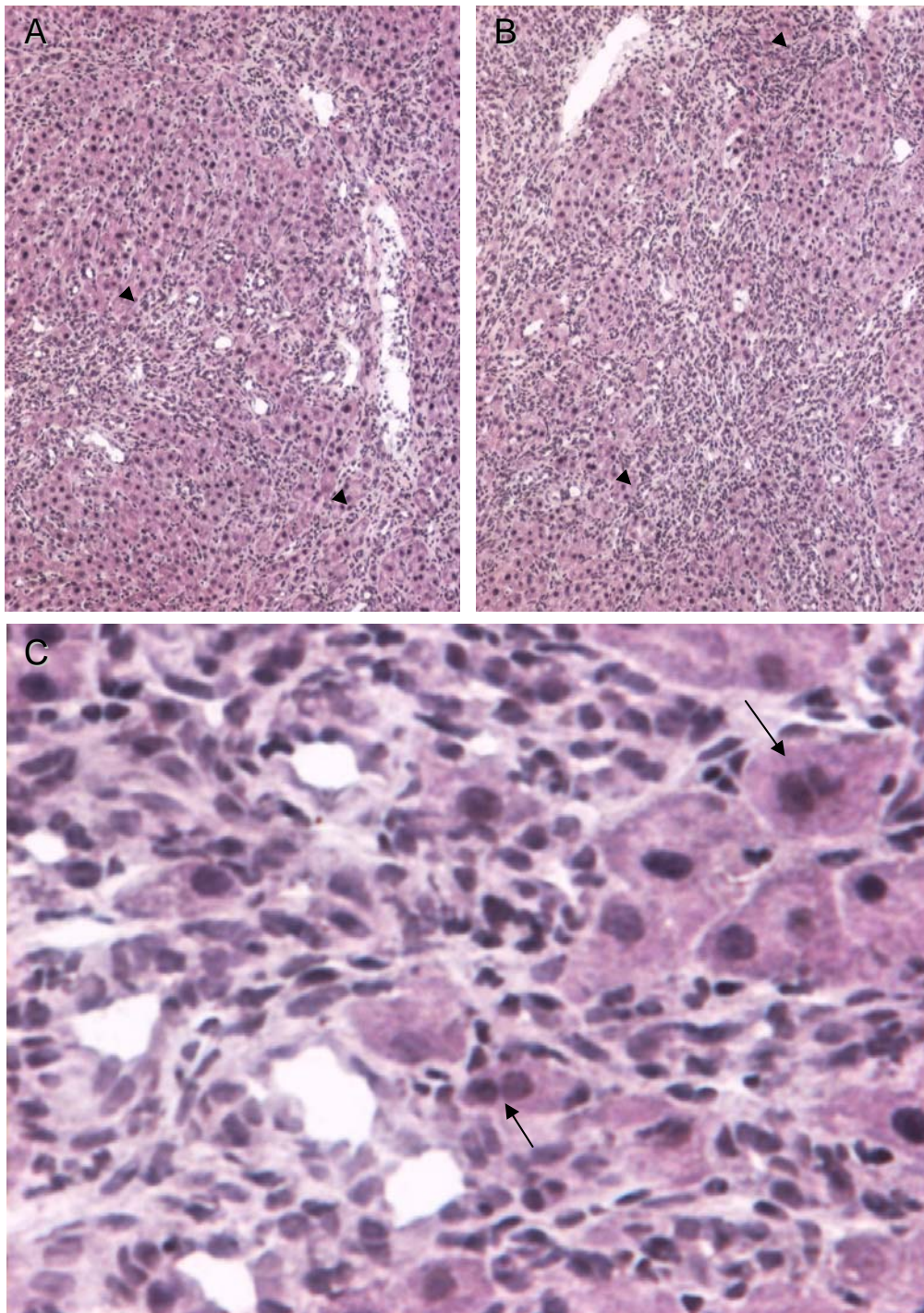


Figura 32. Imágenes representativas de cortes histológicos de hígado de rata con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas, teñidos por el clásico método de hematoxilina-eosina, observadas al microscopio óptico. Las puntas de flecha muestran zonas de infiltración de leucocitaria, y las flechas hepatocitos con dos núcleos. **A,B:** objetivo 10x; **C:** objetivo 40x.

Cuando determinamos la expresión del mRNA de las Svcts en el tejido hepático de estos animales (figura 33) encontramos que los niveles de Svct1 estaban reducidos casi 10 veces si se comparaban con los de las ratas control de la misma edad, mientras que la expresión de Svct2 era un 50% mayor que en los animales control.

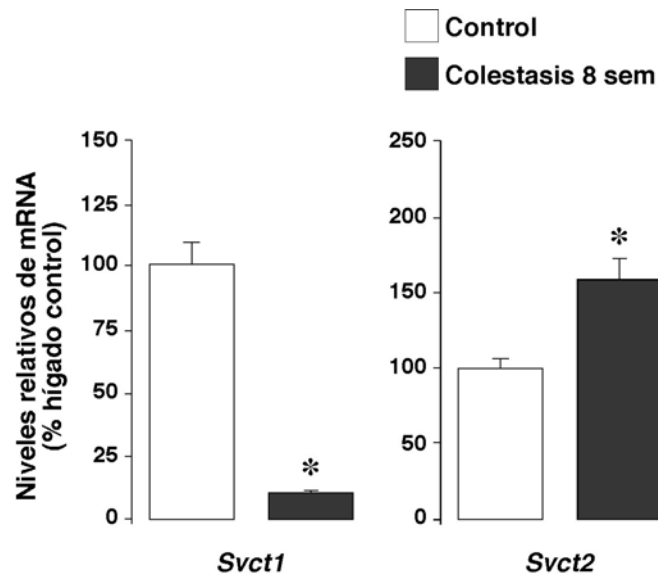


Figura 33. Efecto de la colestasis obstructiva durante 8 semanas inducida por ligadura del conducto biliar en la expresión hepática del mRNA de Svct1 y Svct2 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 5 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas control y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de t de Student.

Estos cambios de expresión son probablemente un reflejo de lo que ha ocurrido en el tejido hepático; necrosis de hepatocitos que son remplazados en amplias zonas por tejido fibrótico, proliferación de células ductulares, e infiltración masiva de células leucocitarias.

Cuando estudiamos lo que ocurría con la expresión de las Oatps en los hígados de ratas colestáticas durante 8 semanas (figura 34), encontramos que los niveles de expresión del mRNA de las tres proteínas que se expresan en los hepatocitos en el tejido sano eran muy bajos (en todos los casos menor del 20%), lo que apoya que el descenso en la expresión de Svct1, que se expresa fundamentalmente en los hepatocitos, probablemente es debido a una destrucción importante de células parenquimales, junto con una reducción en los niveles de expresión. Esto puede ser parte de una respuesta adaptativa que evita que se acumulen en las células aniones orgánicos que no van a poder eliminarse posteriormente en bilis.

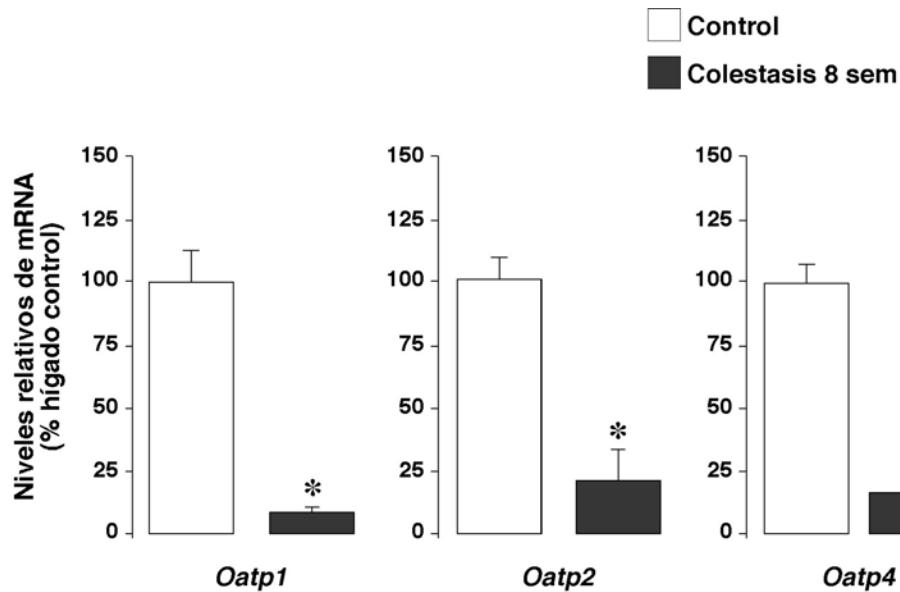


Figura 34. Efecto de la colestasis obstructiva durante 8 semanas inducida por ligadura del conducto biliar en la expresión hepática del mRNA de Oatp1, Oatp2 y Oatp4 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 5 muestras analizadas por triplicado en cada grupo experimental, expresados como abundancia relativa respecto a las ratas control y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ comparado con las ratas control por el test de t de Student.

Puesto que en este modelo experimental encontramos diferencias tan importantes en la expresión del mRNA, decidimos estudiar en profundidad que ocurría con la expresión de las Svcts a nivel de la proteína, por Western blot y por inmunofluorescencia.

La figura 35 muestra Western blots representativos para Svct1 y Svct2 realizados con lisados de hígado de rata control y de ratas con colestasis durante 8 semanas. Como normalizador de la carga de proteínas se utilizó un anticuerpo frente a la GAPDH.

Los resultados encontrados a nivel de proteínas fueron concordantes con los obtenidos a nivel de mRNA. En el hígado control la expresión de Svct1 fue mayor que la de Svct2, y de hecho en algunos hígados la banda de Svct2 era casi indetectable. La colestasis crónica produjo una reducción en la expresión hepática de la proteína Svct1, mientras que indujo sobre-expresión de la Svct2.

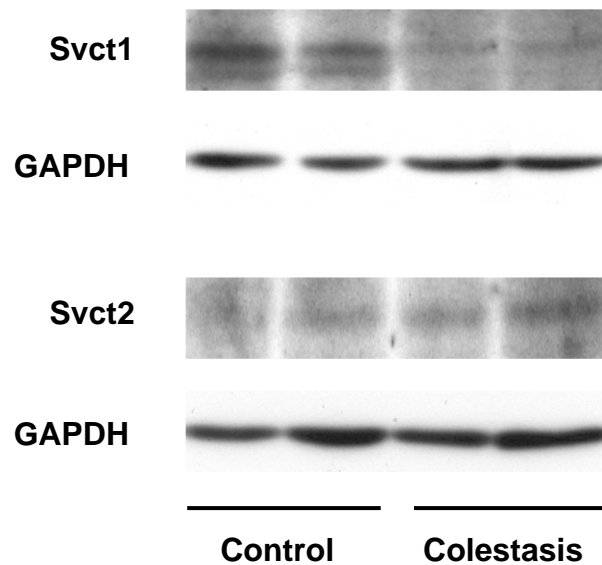


Figura 35. Análisis por Western blot del efecto de la colestasis obstructiva durante 8 semanas inducida por ligadura del conducto biliar en la rata en la expresión hepática de las proteínas Svct1 y Svct2. La proteína GAPDH se determinó en cada muestra para corregir la carga de la proteínas.

Para investigar los cambios de expresión de las Svcts debidos a la colestasis obstructiva crónica en los distintos tipos celulares hepáticos llevamos a cabo un estudio de inmunofluorescencia en cortes de tejido. Para facilitar la comparación de los resultados, recordaremos, al lado del marcaje en las muestras de hígado de ratas con colestasis, cómo era la localización de cada Svct en cada tipo de células en el hígado control, aunque esto suponga repetir las imágenes que habíamos comentado en el apartado 4.1. de este trabajo de Tesis Doctoral.

Así, en esta serie de imágenes se mostrará la tinción de cada Svct en el tejido sano (A-C) y en los cortes de hígado con colestasis crónica (D-E).

La figura 36 muestra la localización de Svct1 (en verde) en los hepatocitos positivos para Oatp4 (en color rojo), en el hígado control (figuras 36A-C) y tras la colestasis crónica (figuras 36D-F).

Como se observa en la figura 36E la tinción con el anticuerpo anti-Oatp4, específico para los hepatocitos, en el hígado de las ratas con colestasis muestra que hay zonas de tejido en las que no se observa marcaje, lo que concuerda con áreas de tejido sin células parenquimales como habíamos observado en el estudio histológico. Además, los hepatocitos parecen estar desorganizados y sin una clara polarización.

En lo que se refiere a la presencia de Svct1 en los hepatocitos, que en el hígado sano estaba localizado en la membrana basolateral (figuras 36A-C), la colestasis disminuye dramáticamente la expresión de esta isoforma en los hepatocitos, así en la imagen superpuesta (figura 36F) no aparece co-localización total de Svct1 y Oatp4 y sólo en algunos hepatocitos aparece un débil marcaje de Svct1 (puntas de flecha en la figura 36F).

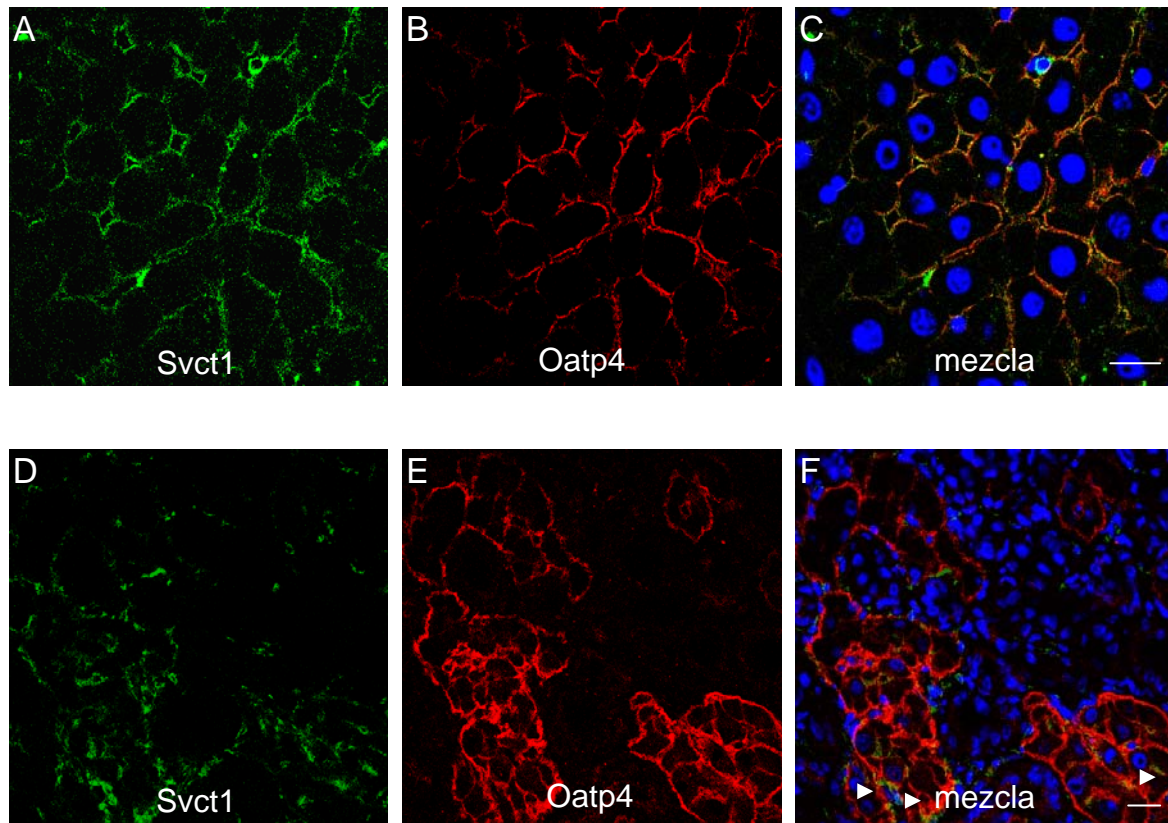


Figura 36. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct1 (A, D; en verde) y Oatp4 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Es decir, que la colestasis crónica no sólo disminuye el número de hepatocitos, sino que además en éstos disminuye la expresión de la proteína Svct1, lo que contribuiría a una menor expresión total en el tejido.

La proteína Svct2 era menos abundante que la Svct1 en el tejido hepático control, y apenas estaba expresada en los hepatocitos sanos (figuras 37A-C). En el hígado de ratas con colestasis crónica se observaba una señal más intensa que la observada en el hígado control en algunas zonas del parénquima entre grupos de hepatocitos aislados (figuras 37D-F), y en algunos casos era posible observar co-localización de Svct2 y Oatp4 (punta de flecha en figura 37F), lo que sugiere que los hepatocitos sobre-expresan Svct2 en la membrana basolateral.

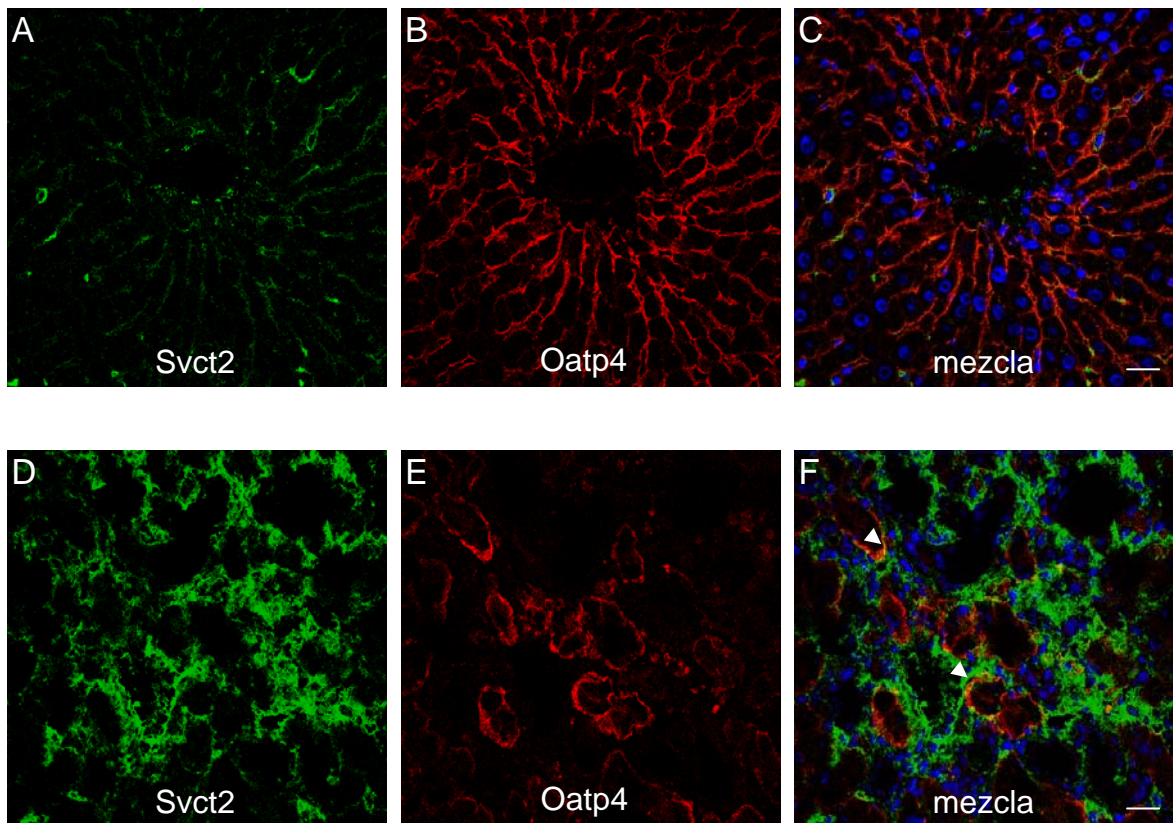


Figura 37. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct2 (A, D; en verde) y Oatp4 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Las puntas de flecha señalan co-localización de Svct2 y Oatp4. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 µm.

Estos resultados parecen indicar que en situaciones de daño celular, cuando disminuye la expresión que la isoforma 1 en los hepatocitos sanos, la Svct2 parece cobrar más relevancia.

En el tejido hepático sano habíamos detectado la presencia de la isoforma Svct1 en las células ductulares, con una intensa señal en los ductulos de mayor tamaño, marcados en rojo con CK-7 (figuras 38A-C).

Como habíamos comentado anteriormente, tras el estudio histológico, la colestasis obstructiva crónica inducía proliferación de colangiocitos en amplias zonas del parénquima próximas a los tractos portales, en las que se observaba además necrosis de hepatocitos. En estas zonas de proliferación ductular encontramos una señal positiva de Svct1 que co-localizaba con la CK-7 (figuras 38D-F), aunque la señal era más débil que la detectada en los colangiocitos sanos.

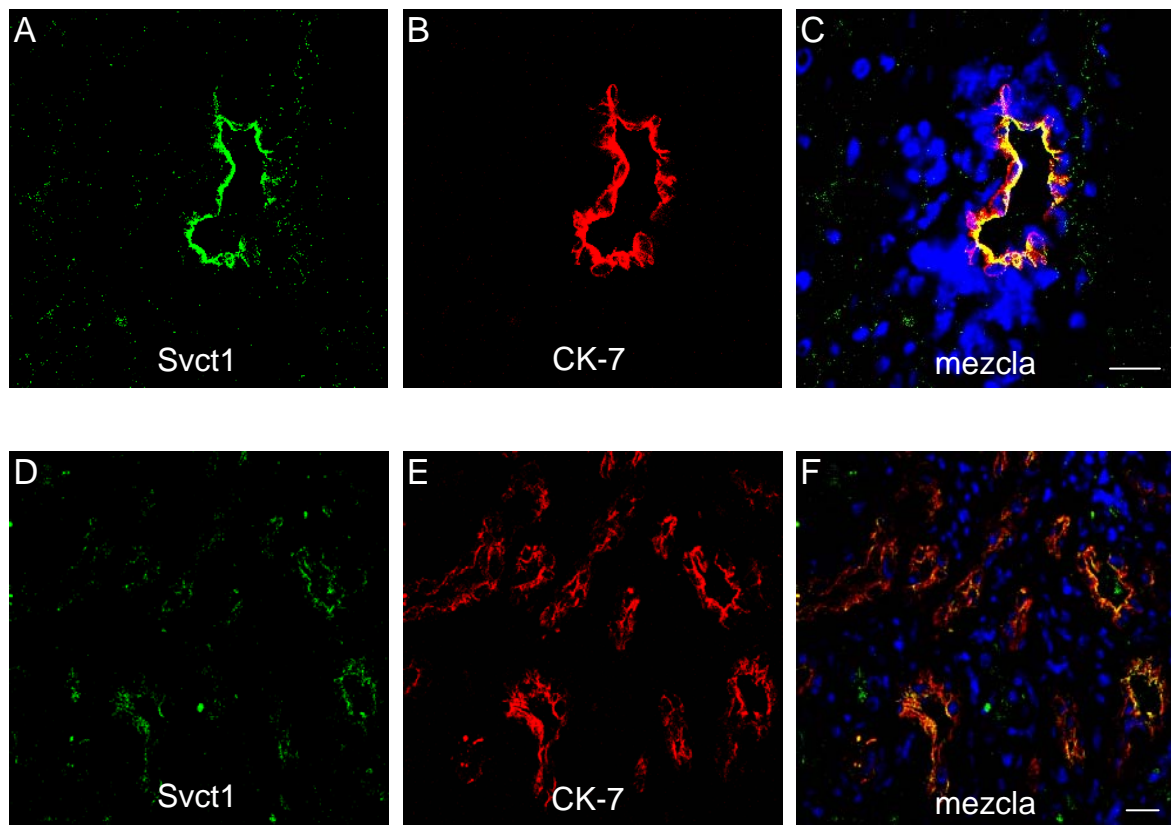


Figura 38. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct1 (A, D; en verde) y CK-7 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

En los colangiocitos del tejido sano no era posible detectar la isoforma Svct2 (figuras 39A-C). La obstrucción biliar crónica indujo una ligera sobre-expresión de Svct2 en las células ductulares (figuras 39D-F), al menos se pudo visualizar una débil señal en algunos de los focos de proliferación ductular.

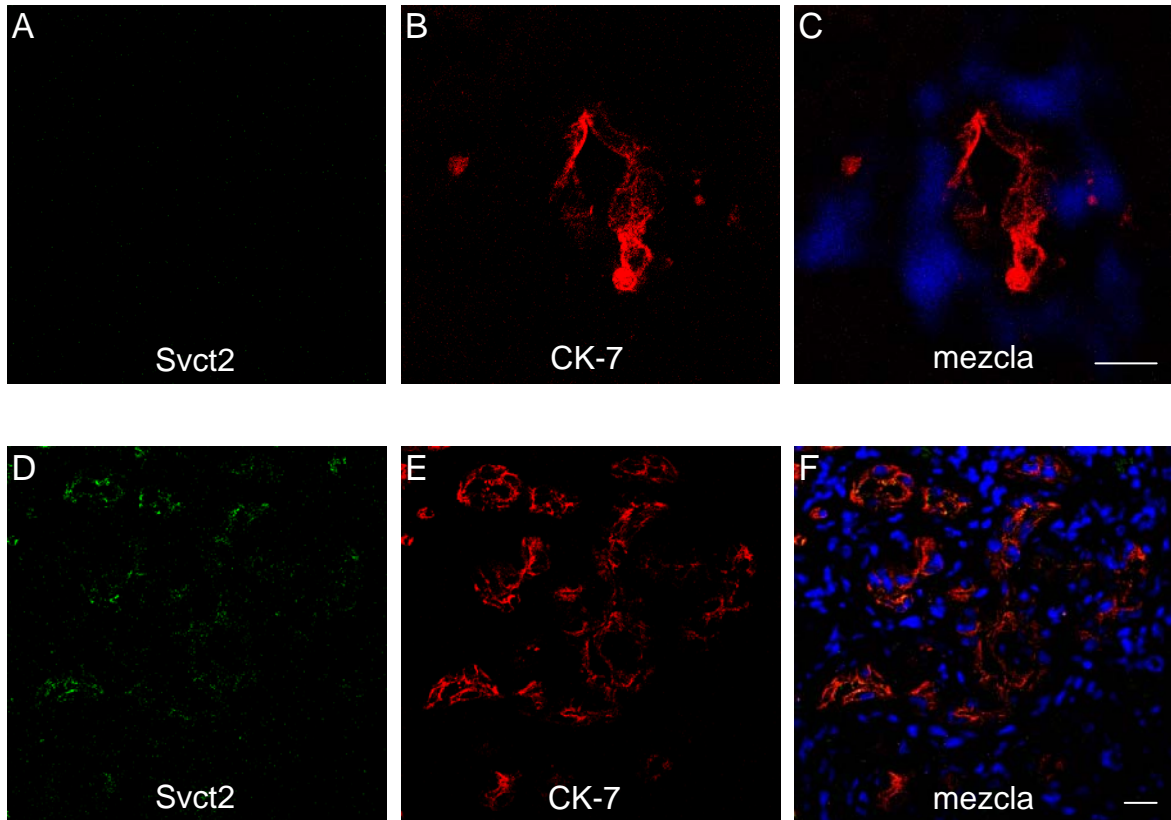


Figura 39. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct2 (A, D; en verde) y CK-7 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

De igual forma a lo que hemos comentado para los hepatocitos, en situaciones de colestasis crónica se pierde la expresión de Svct1 y se aprecia cierta expresión de la isoforma Svct2, que no se detectaba en condiciones fisiológicas.

Respecto a las células endoteliales, en el hígado sano habíamos identificado la presencia de las dos isoformas de Svct en ellas. La Svct1 daba una señal intensa en las células positivas para Reca1 (figuras 40A-C), tanto en las células endoteliales de las venas centrales como las de los espacios porta.

En el hígado de ratas con colestasis crónica el marcaje de Svct1 en las células endoteliales (figuras 40D-F) fue más débil que el detectado en el hígado control, aunque también la señal del marcador de estas células (Reca1) fue más tenue.

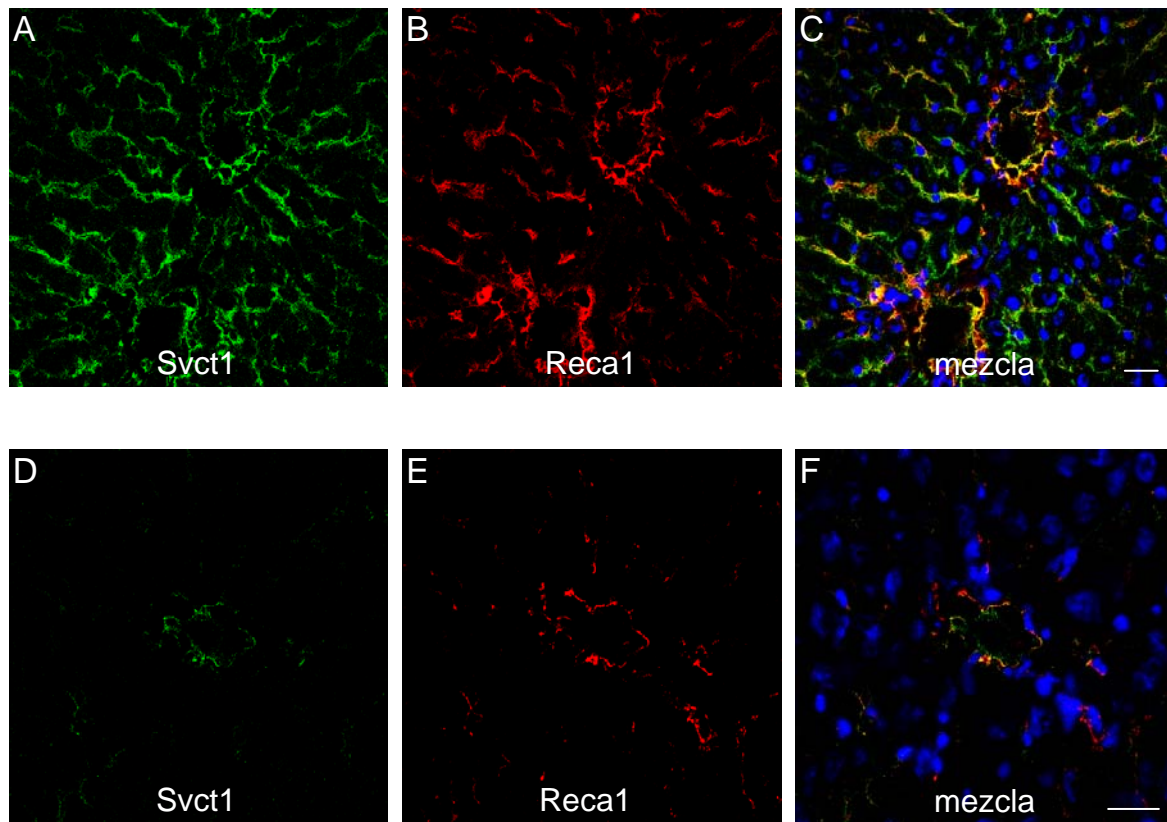


Figura 40. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct1 (A, D; en verde) y Reca1 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

La señal de Svct2 que encontramos en las células endoteliales del hígado control (figuras 41A-C) era débil, y la colestasis crónica indujo una reducción de la expresión de esta isoforma (figuras 41D-F), aunque era posible detectar esta proteína por inmunofluorescencia.

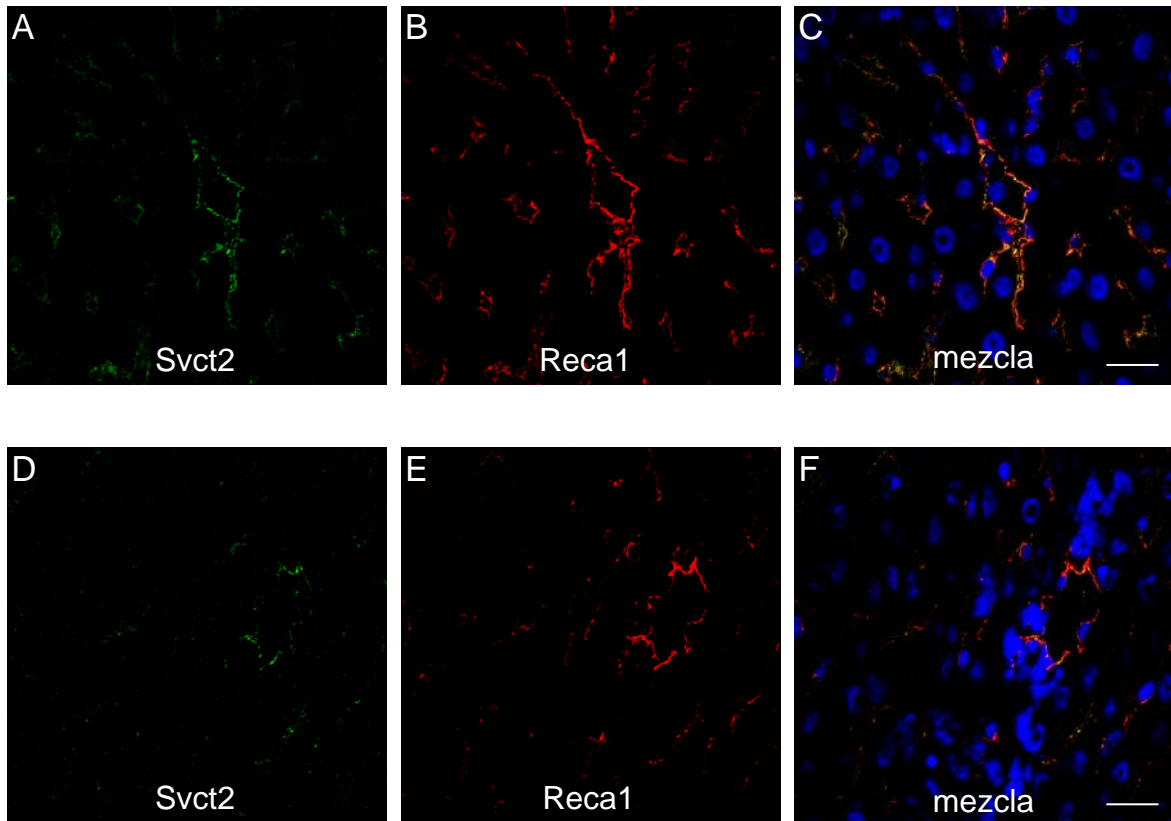


Figura 41. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct2 (A, D; en verde) y Reca1 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Es decir, que en las células endoteliales la colestasis obstructiva crónica disminuyó la expresión de ambas Svcts. Esto parece indicar que en esta situación de elevado estrés oxidativo estas células tendrían menor capacidad de captar AA. Sin embargo, como hemos comentado con anterioridad, en condiciones fisiológicas acumulan grandes cantidades de esta vitamina. La disminución de la expresión de las Svcts podría favorecer que las células vecinas capten mayor cantidad de AA para protegerse del daño oxidativo, mientras que las células endoteliales podrían utilizar la reserva de vitamina C que tienen almacenada. En este sentido, es interesante considerar que se ha descrito que las células endoteliales liberan el AA almacenado para su utilización por otras células (Best *et al.*, 2005).

Las células de Kupffer, positivas para CD163, eran las células hepáticas que en el tejido sano presentaban una mayor inmunoreactividad para Svct1 (figuras 42A-C) y Svct2 (figuras 43A-C)

Como hemos comentado anteriormente, la colestasis crónica produjo infiltración de células leucocitarias en el tejido hepático, especialmente en algunas zonas próximas a los espacios portales. En estos macrófagos hepáticos el inmunomarcaje de Svct1 fue más intenso (figuras 42D-F) que el detectado en el tejido control, y las células observadas eran de mayor tamaño, lo que es indicativo de que están activadas.

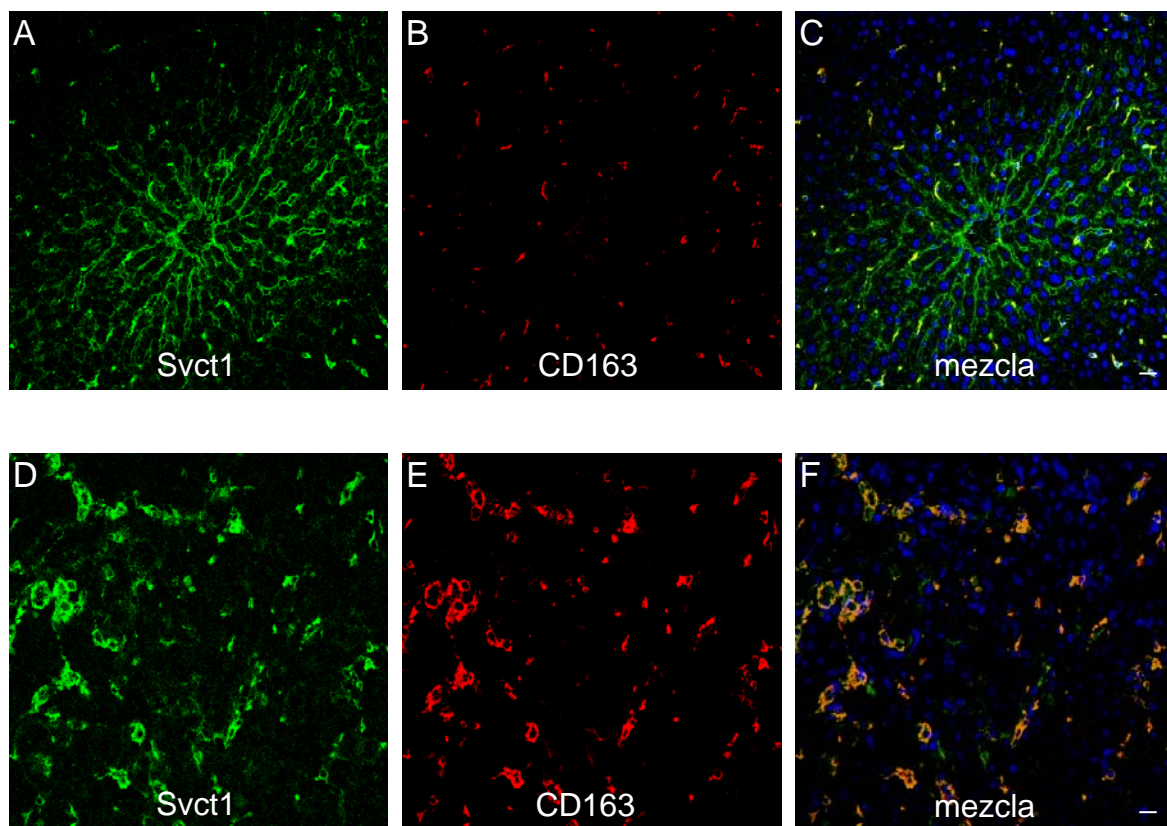


Figura 42. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct1 (A, D; en verde) y CD163 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Respecto a Svct2, en las zonas de reclutamiento de macrófagos (puntas de flecha en figuras 43D-F) se observa una fuerte fluorescencia de esta isoforma. En la figura 43F se aprecia claramente la co-localización de Svct2 y CD163 y también que otras células dan una fuerte señal de Svct2, mientras que hay zonas de tejido en las que apenas se detecta esta isoforma.

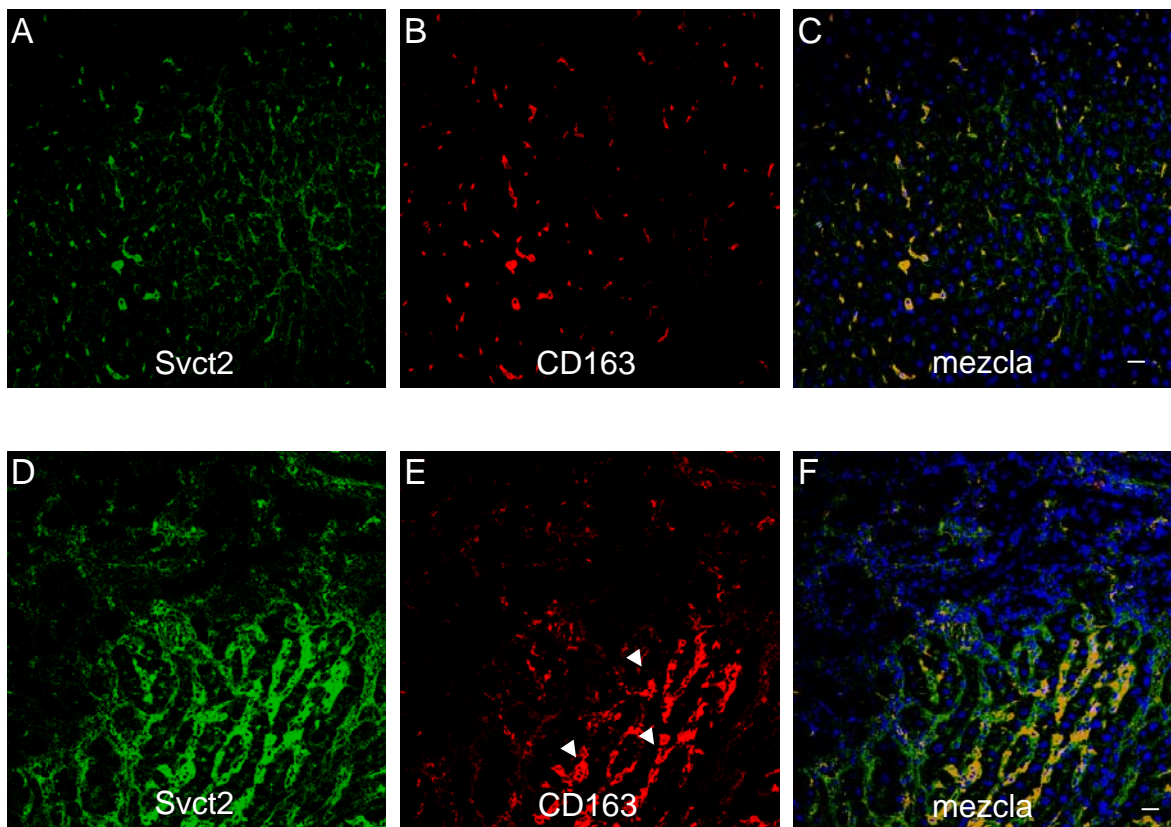


Figura 43. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct2 (A, D; en verde) y CD163 (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Las puntas de flecha indican zonas de reclutamiento de macrófagos. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Estos resultados indican que las células de Kupffer ante el daño producido por la colestasis crónica sobre-expresan Svct1 y en menor medida Svct2 comparado con la situación control, lo que podría favorecer la acumulación intracelular de más AA, por lo que estarían en mejor disposición para hacer frente a una situación de estrés oxidativo.

En condiciones fisiológicas, las células estrelladas hepáticas (marcadas con el anticuerpo anti- α SMA, en rojo) mostraron una señal positiva para Svct1 (figuras 44A-C).

La colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas produjo la activación y proliferación de células estrelladas, como lo demuestra el hecho de que se observaban zonas de tejido con mayor número de células positivas para α SMA. En estas células, la señal de α SMA fue más intensa (figura 44E) y el marcaje de Svct1 también fue mayor (figuras 44D-F).

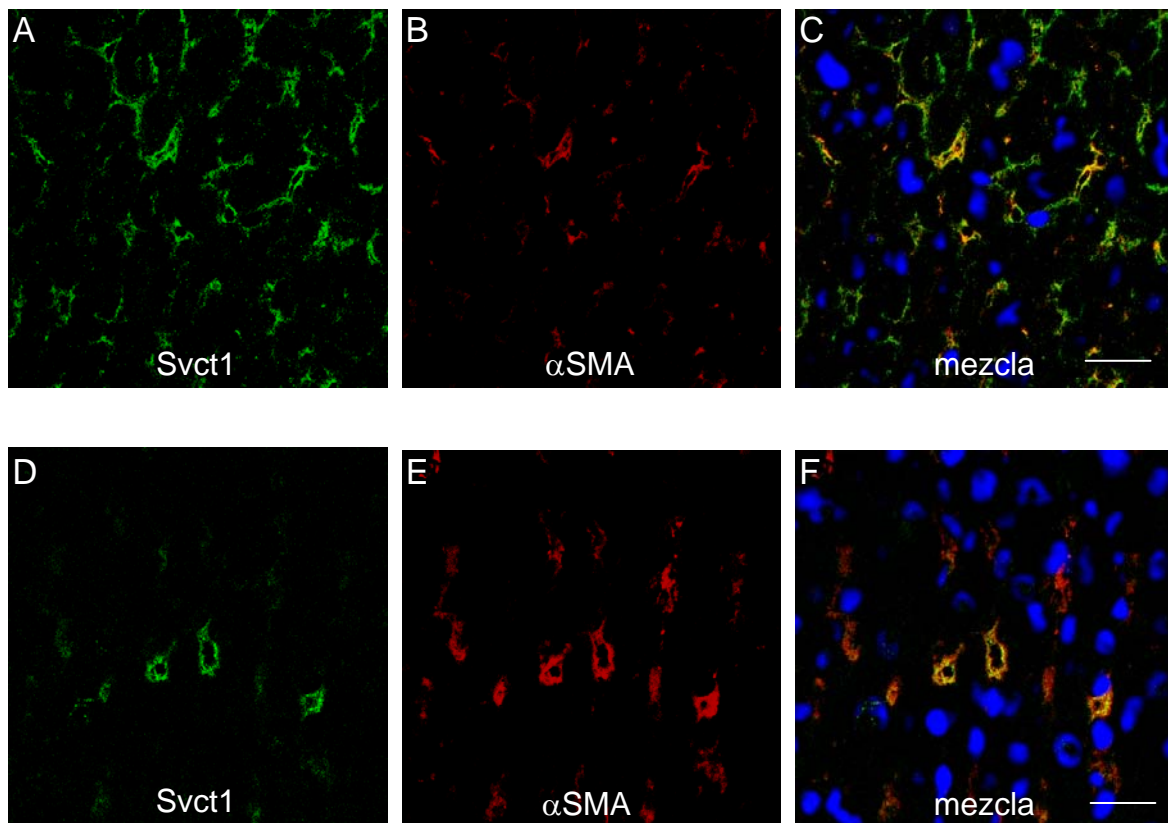


Figura 44. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct1 (A, D; en verde) y α SMA (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Un resultado similar encontramos para Svct2 en las células estrelladas. En el hígado control la señal de Svct2 fue muy débil en estas células en estado quiescente (figuras 45A-C), mientras que la activación de las células estrelladas debida a la colestasis crónica también produjo sobre-expresión de Svct2 (figuras 45D-F).

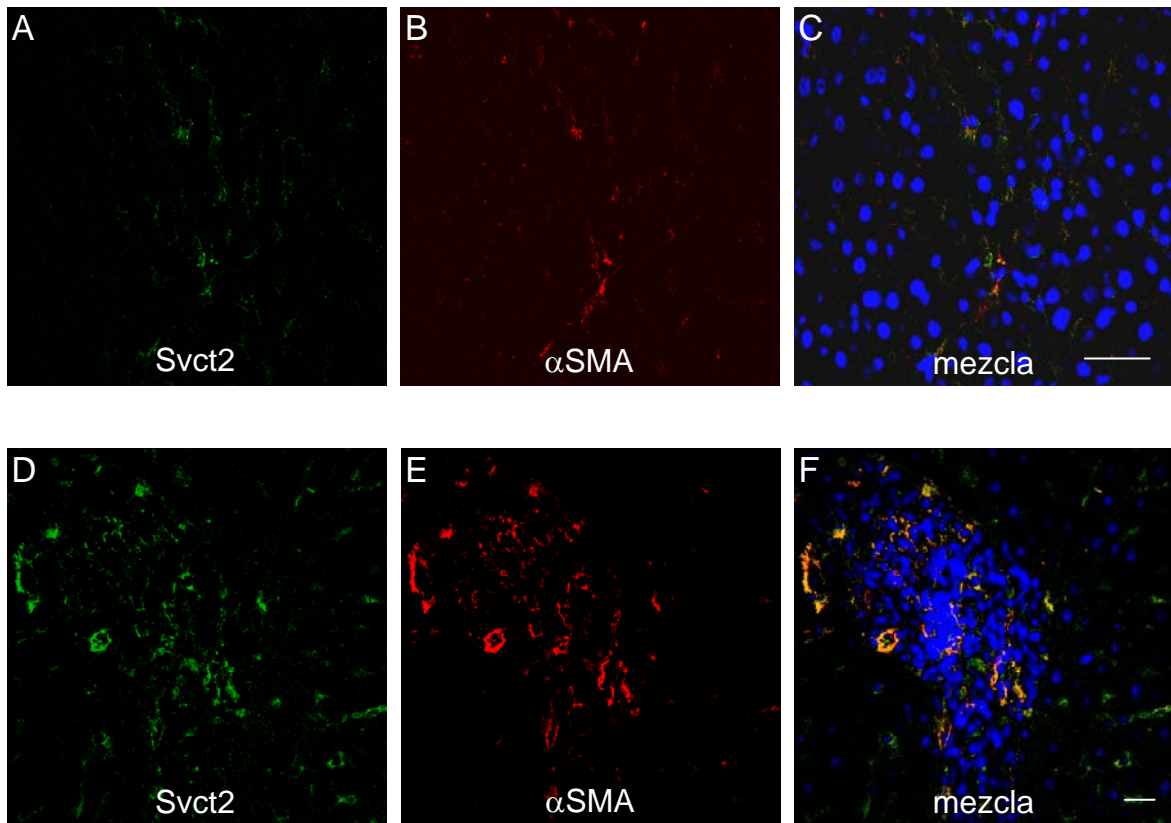


Figura 45. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct2 (A, D; en verde) y α SMA (B, E; en rojo) en cortes de hígado de rata control (A-C) o con colestasis obstructiva mantenida durante 8 semanas (D-F). La imágenes C y F corresponden a la mezcla de A y B, y D y E, respectivamente. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

En conjunto, todos estos resultados parecen indicar que en situaciones de estrés oxidativo la isoforma Svct2 es la que se ve más inducida en todas las poblaciones de células hepáticas, incluso en aquellas en las que apenas se detectaba en situaciones fisiológicas, sin embargo, la Svct1 sólo mantiene una elevada expresión en las células de Kupffer y en las células estrelladas.

4.3.5. EFECTO DE LOS ÁCIDOS BILIARES SOBRE LA EXPRESIÓN DE SVCTS EN CÉLULAS HEPÁTICAS EN CULTIVO

Como hemos comentado anteriormente, la colestasis se caracteriza por la acumulación de sustancias colefilicas en la sangre, entre las que se encuentran los ácidos biliares. En condiciones fisiológicas la concentración sérica de estas moléculas es muy baja, del orden de 10 μM , y se producen aumentos moderados de esta concentración en los periodos post-pandriales (Gälman *et al.*, 2005).

En los modelos experimentales *in vivo* que hemos investigado en este trabajo de Tesis Doctoral hemos encontrado cambios importantes en la expresión de las proteínas transportadoras de AA en las situaciones en las que había colestasis. Sin embargo, en estos modelos *in vivo* no es posible determinar si los cambios en la expresión de las Svcts son debidos a la hipercolanemia o a la acumulación en sangre de otras sustancias que no pueden ser eliminadas en bilis, o que se producen en grandes cantidades en respuesta al daño hepático, como la bilirrubina, o distintas citokinas, respectivamente.

En un estudio reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio utilizando la línea celular derivada de coriocarcinoma humano JAr se ha demostrado que algunos ácidos biliares tienen un efecto estimulador de la expresión de las proteínas SVCT1 y SVCT2 (Perez *et al.*, 2008).

Por esta razón decidimos utilizar un modelo *in vitro* para investigar si también la expresión de las Svcts en los hepatocitos se ve afectada por la exposición a ácidos biliares.

Para llevar a cabo este tipo de estudio existen pocos modelos *in vitro* disponibles. Hay que tener en cuenta que para que estos modelos sean válidos es necesario que las células en cultivo presenten niveles de proteínas transportadoras de ácidos biliares similares a los de los hepatocitos *in vivo*, que estos transportadores estén localizados en el dominio de membrana (basal o apical) similar al que presentan los hepatocitos diferenciados en el parénquima hepático, que sean funcionales y que su expresión esté regulada de forma similar a como sucede *in vivo*.

La utilización de hepatocitos de rata aislados en cultivo no se considera la opción óptima para estudios a medio plazo, ya que a las pocas horas tras su aislamiento comienzan a desdiferenciarse, pierden su polaridad y muchas proteínas de membrana se internalizan, o cambian sus niveles de expresión (Liang *et al.*, 1993).

Existen varios estudios que han utilizado la línea celular derivada de hepatoma humano HepG2 (Knowles *et al.*, 1980; Cantz *et al.*, 2000; Kubitz *et al.*, 2004). Las células

HepG2 expresan varias proteínas transportadoras de aniones orgánicos, como la MRP2, la MRP3 y la BSEP (Cantz *et al.*, 2000; Kubitz *et al.*, 2004) aunque apenas expresan la OATP-C (Nakai *et al.*, 2001; Le Vee *et al.*, 2006) y además presentan el inconveniente de su pobre polarización, ya que sólo un 10-30% de las células forman canalículos (Kubitz *et al.*, 2004). Otras líneas celulares hepáticas humanas, como la Huh7, Hep3B o PLC/PRF/5, presentan el mismo problema, una pobre polarización.

La línea celular derivada de hepatoma de rata Can-10, que debe su nombre a su capacidad para formar canalículos, ha sido obtenida recientemente por la Dra. Doris Cassio a partir de subcultivos de células Fao crecidas formando esferoides (Peng *et al.*, 2006; Cassio *et al.*, 2007). Estas células se han propuesto como un buen modelo para el estudio de aspectos relacionados con la fisiología y farmacología del transporte de compuestos colefílicos (Cassio *et al.*, 2007) después de comprobar, en un trabajo llevado a cabo en el marco de un proyecto de colaboración entre nuestro grupo de investigación y el que dirige la Dra. Cassio en la Universidad de París, que expresan la mayoría de las proteínas implicadas en el transporte de aniones orgánicos (Cassio *et al.*, 2007) y que éstas se localizan de forma similar a la fisiológica en estas células.

La figura 46A muestra una imagen de células Can-10 a los 6 días de cultivo visualizada en contraste de fase y la figura 46B corresponde a la fluorescencia de la proteína asociada a "tight junctions" ZO-1 en el mismo campo de cultivo. Se observa la presencia de canalículos delimitados por el marcaje de ZO-1.

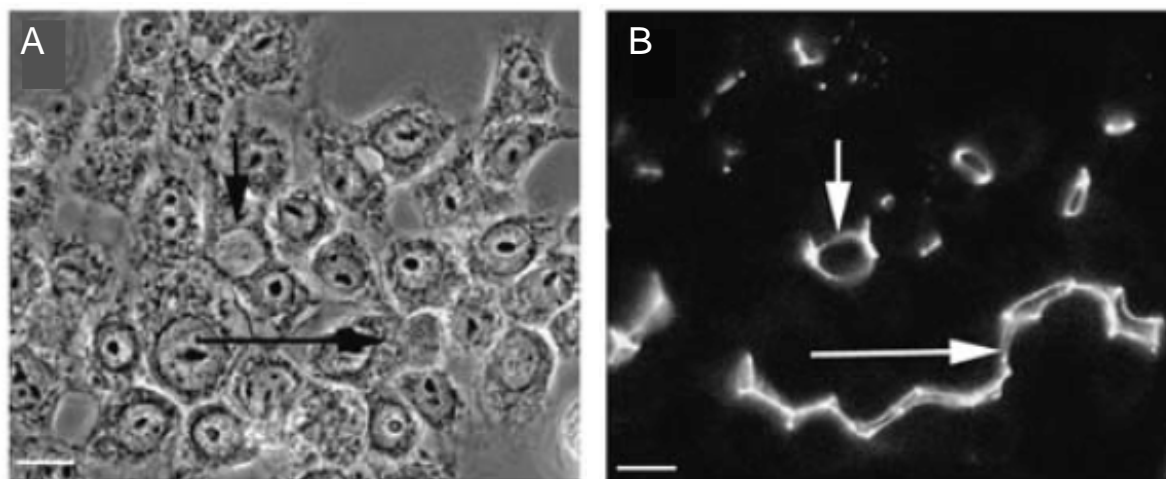


Figura 46. Inmunolocalización del marcador de "tight junctions" ZO-1 por fluorescencia (B) en células Can-10 en cultivo a sub-confluencia e imagen visualizada en contraste de fase (A) del mismo campo del cultivo. Los canalículos simples (formados entre dos células) están marcados por flechas cortas y los canalículos más complejos por flechas largas. Barras de escala = 10 μ m.

Estas células no sólo forman canalículos simples (entre dos células, flechas cortas en figuras 46A y B), sino que aparecen estructuras más complejas similares a conductillos biliares (entre varias células, flechas largas en figuras 46A y B).

Después de sopesar las posibilidades; hepatocitos aislados, otras líneas celulares hepáticas no polarizadas, y las células Can-10, elegimos estas últimas para estudiar el efecto de los ácidos biliares sobre la expresión de las proteínas transportadoras de AA.

En primer lugar, decidimos estudiar los niveles de expresión del mRNA de Svct1 y Svct2 en las células Can-10 (figura 47) y los comparamos con los de los hepatocitos de rata recién aislados siguiendo una modificación del método de Berry (1991) (Monte *et al.*, 1999). El aislamiento de hepatocitos de rata es una técnica habitual en nuestro laboratorio. La expresión de Svct1 en las células Can-10 fue 3 veces menor que en los hepatocitos, mientras que ocurría lo contrario para Svct2, los niveles en las células Can-10 fueron 3 veces mayores que en los hepatocitos.

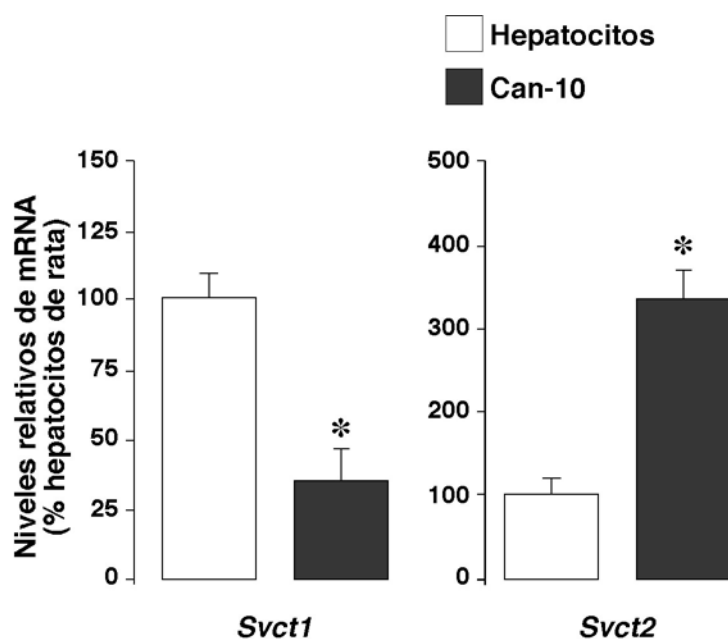


Figura 47. Niveles de expresión del mRNA de Svct1 y Svct2 determinados por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 3 cultivos analizados por triplicado, expresados como abundancia relativa respecto a los hepatocitos de rata recién aislados y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ por el test de t de Student.

Estos resultados no nos sorprendieron mucho, ya que como hemos comentado anteriormente la expresión de muchas proteínas transportadoras se modifica en las células tumorales.

A continuación, para investigar la localización de las proteínas Svct1 y Svct2 en las células Can-10 llevamos a cabo un estudio de inmunofluorescencia. La figura 48 muestra los resultados obtenidos cuando las células se marcaron simultáneamente con un anticuerpo anti-Mrp2, para delimitar la membrana canalicular y con los anticuerpos frente a la Svct1 (figuras 48A-C) o Svct2 (figuras 48D-F).

Los resultados fueron coherentes con los obtenidos a nivel del mRNA. Mediante inmunofluorescencia no fue posible detectar en esta línea celular la isoforma Svct1, la más abundante en la membrana basolateral de los hepatocitos, mientras que las células Can-10 expresaban la isoforma Svct2 en la membrana basal y en la región próxima a esta membrana, pero no en la membrana canalicular, como se demostró por la ausencia de co-localización con la proteína Mrp2 (figura 48F).

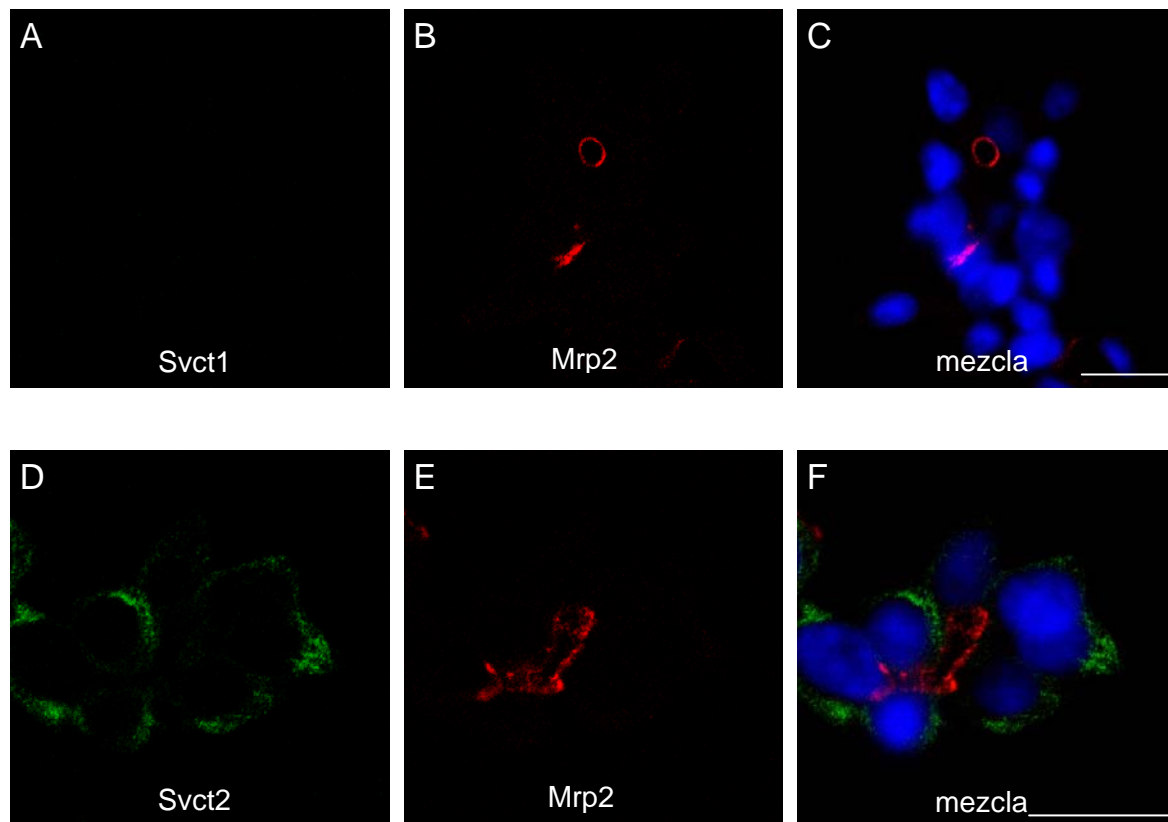


Figura 48. Doble marcaje por inmunofluorescencia en células Can-10 en cultivo durante tres días, de Svct1 (A) o Svct2 (B) y Mrp2 (B, E), como marcador de canalículos. C muestra la imagen superpuesta de A y B. F corresponde a la superposición de D y E. Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Los niveles de expresión de las proteínas de la familia Oatp en las células Can-10 son menores que en los hepatocitos recién aislados (Cassio *et al.*, 2007), sin embargo, la

expresión de la principal proteína responsable de la captación de ácidos biliares por los hepatocitos, la Ntcp, presenta niveles similares en las células Can-10 y en los hepatocitos (Cassio *et al.*, 2007), lo que permitiría que estas células captaran ácidos biliares.

Para investigar el efecto de los ácidos biliares sobre la expresión de las proteínas transportadoras de AA en cultivo, las células se cultivaron durante 48 horas con ácido taurocólico (TCA), ácido tauroquenodesoxicólico (TQDCA) o ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA).

El TCA se eligió porque es el ácido biliar más abundante en la bilis de rata (Monte *et al.*, 1997), el TQDCA, que también es muy abundante en la rata, se incluyó en el estudio porque es un potente ligando natural del receptor nuclear para ácidos biliares FXR (Lew *et al.*, 2004; Makishima *et al.*, 1999), y el TUDCA para comparar porque es un pobre ligando del receptor FXR (Lew *et al.*, 2004; Makishima *et al.*, 1999), aunque este ácido biliar tiene propiedades interesantes como su capacidad de estimular el flujo de bilis y se utiliza como agente terapéutico en distintas hepatopatías que cursan con colestasis (Scharschmidt y Lake 1989).

La concentración de 50 μM que utilizamos se seleccionó porque es del orden de la concentración de ácidos biliares que llegan al hígado en situaciones de colestasis moderada o en los periodos post-pandriales. Además, esta concentración es lo suficientemente baja como para asegurarnos de que no se producirían los efectos tóxicos que se han descrito a concentraciones superiores a 200 μM aproximadamente (Larena *et al.*, 2001). De hecho, la presencia de los ácidos biliares no causó cambios en la viabilidad del cultivo, (datos no mostrados) y está bastante por debajo de la concentración micelar crítica de la mayoría de las especies moleculares de ácidos biliares.

La figura 49 muestra el efecto de la exposición de las células Can-10 a los ácidos biliares indicados durante 2 días sobre los niveles de expresión del mRNA de Svct1 y Svct2, comparados con las células control, no tratadas. Aunque existía una cierta tendencia a aumentar la expresión de Svct1 en presencia de los ácidos biliares, el incremento no llegó a ser significativo con ninguno de ellos.

Sin embargo, los tres ácidos biliares ensayados indujeron una sobre-expresión significativa del mRNA de Svct2 en las células Can-10, siendo el aumento de expresión inducido por el TCA y el TQDCA ligeramente mayor que el producido por el TUDCA.

Estos datos concuerdan con los que hemos obtenido hasta ahora en los distintos modelos experimentales en la rata, en los que la inducción de la expresión de Svct2 era mayor que para Svct1.

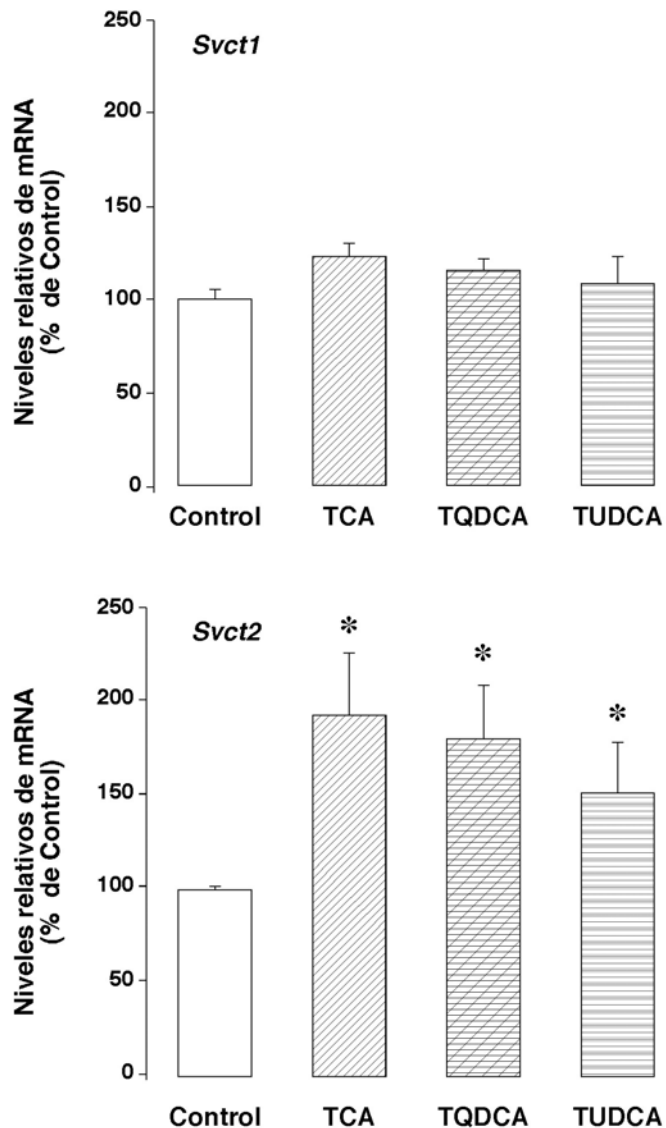


Figura 49. Efecto de la exposición de las células Can-10 durante 2 días a 50 μ M de ácido taurocólico (TCA), ácido tauroquenosodioxico (TQDCA) o ácido taurosodioxico (TUDCA) sobre la expresión del mRNA de Svct1 y Svct2 determinada por PCR cuantitativa a tiempo real. Los valores son media \pm EEM de 3 cultivos analizados por triplicado, expresados como abundancia relativa respecto a las células cultivadas en ausencia de ácidos biliares y normalizados por los valores de mRNA de β -actina. *, $p < 0.05$ por el test de t de Student.

Para investigar si los cambios observados en la expresión de Svcts en presencia de los ácidos biliares a nivel del mRNA también se detectaban a nivel de la proteína las células se cultivaron en labtecks en presencia de 50 μ M de TCA, TQDCA o TUDCA durante 2 días.

Al igual que en las células control, tampoco encontramos señal de Svct1 tras la exposición durante 48 horas a ninguno de los ácidos biliares ensayados (datos no mostrados). Sin embargo, como se observa en la figura 50, la intensidad de la señal correspondiente a Svct2, era más intensa en presencia de TCA o TQDCA que en las células no expuestas a ácidos biliares o expuestas a TUDCA.

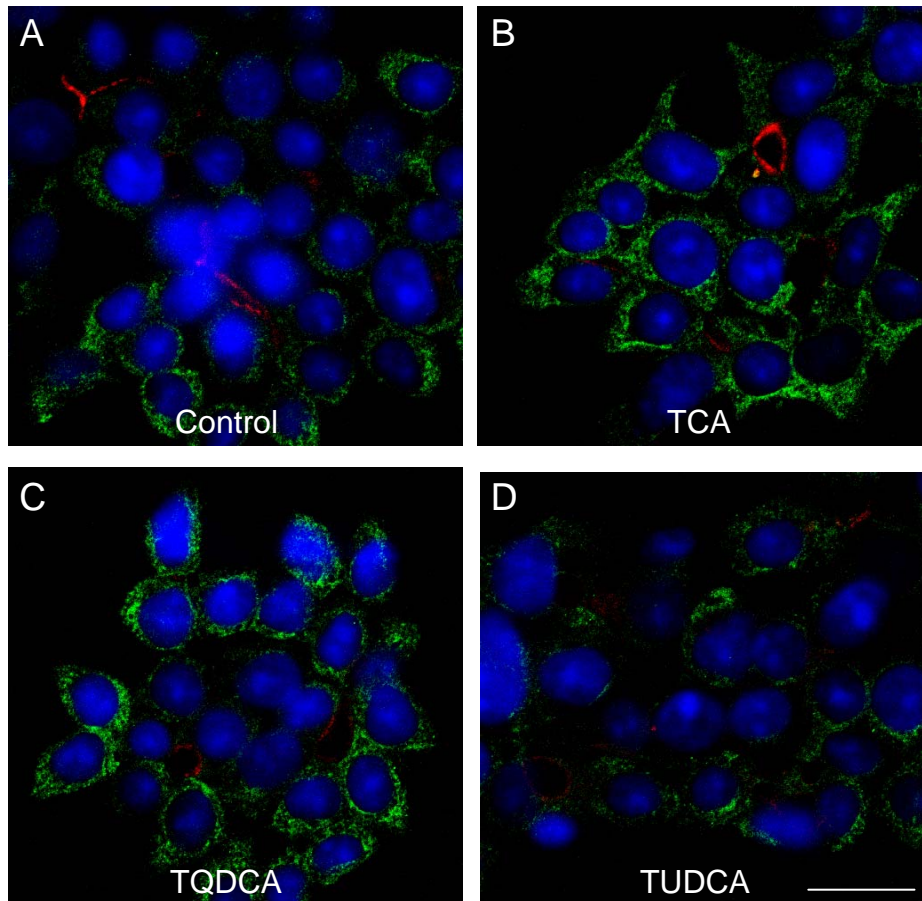


Figura 50. Doble marcaje por inmunofluorescencia de Svct2 (en verde) y Mrp2 (en rojo), como marcador de canalículos, en células Can-10 en cultivo control (A) o expuestas durante 48 horas a 50 μ M de TCA (B), TQDCA (C) o TUDCA (D). Los núcleos se tiñeron con Dapi. Barras de escala = 20 μ m.

Estos resultados demuestran que los ácidos biliares son capaces de inducir de forma directa la expresión génica de sistemas implicados en la respuesta frente al estrés oxidativo, por lo que podrían ser responsables de los cambios de expresión que hemos observado en los modelos animales con colestasis, aunque no podemos descartar que otras sustancias como la bilirrubina también puedan inducir la expresión de las proteínas Svcts.

4.4. CAMBIOS DE EXPRESIÓN DE SVCTS EN EL HÍGADO HUMANO EN HEPATOPATÍAS ASOCIADAS CON ESTRÉS OXIDATIVO

Como último objetivo de esta Tesis Doctoral decidimos investigar si los niveles de expresión de SVCTs en el tejido hepático humano se modificaban en distintas patologías hepáticas asociadas a colestasis.

Para ello, se obtuvieron muestras remanentes de biopsias hepáticas que se realizaban en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario de Salamanca con fines diagnósticos. Dado el pequeño tamaño de las muestras únicamente llevamos a cabo un estudio de determinación de los niveles de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real.

Se utilizaron muestras de pacientes que fueron clasificados en los siguientes grupos una vez que fueron diagnosticados en base a criterios bioquímicos, y a la anatomía patológica:

- ✓ Cirrosis biliar primaria grado I-II (n = 5)
- ✓ Esteatohepatitis no alcohólica (n = 4)
- ✓ Hemocromatosis (n = 4)
- ✓ Colestasis hepatocelular (n = 6)

Además, se incluyeron muestras control después de confirmar la ausencia de enfermedad hepática (n = 4). Éstas se obtuvieron a partir de fragmentos de tejido hepático sano que rodeaba a piezas quirúrgicas o que quedaba adherido a la cápsula de Glisson en extirpaciones de la vesícula biliar.

La tabla 9 muestra las secuencias de los *primers* diseñados para su utilización en PCR cuantitativa a tiempo real, junto con el número de acceso registrado en el GeneBank.

Tabla 9. Secuencias de los *primers* utilizados en el análisis por RCR cuantitativa a tiempo real de la expresión génica de SVCT1 (*SLC23A1*) y SVCT2 (*SLC23A2*), OATP-A (*SLC21A3*), OATP-C (*SLCO1B1*), y OATP-8 (*SLCO1B3*) humanos.

Gen	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Posición	Número de acceso
SVCT1	GGATACGGGAGGTCCAGGGT	CTCGGTGCCAGCAGCTT	514-690	NM_005847
SVCT2	AACAGCAGAGCTGTTGCACACA	GCATGGCAATGCCCCAGT	966-1198	NM_005116
OATP-A	AAGACCAACGCAGGATCCAT	GAGTTTCACCCATTCCAGGTACA	1141-1241	NM_124431
OATP-C	GAATGCCCAAGAGATGATGCTT	AACCCAGTGCAAGTGATTTCAAT	1701-1854	NM_006446
OATP-8	GTCCAGTCATTGGCTTTGCA	CAACCCAACGAGAGTCCTTAGG	700-810	NM_019844

De nuevo para cada pareja de *primers* se confirmó que se amplificaba un único producto del tamaño esperado, se realizó una recta patrón con distintas diluciones de cDNA de hígado humano control y se calculó la eficacia de las reacciones (tabla 10), que en todos los casos fue superior al 90%. En la tabla 10 también aparece el tamaño aproximado del producto amplificado visualizado tras la realización de un gel de agarosa al 2.5%

Tabla 10. Datos obtenidos para cada una de las parejas de *primers* tras las reacciones de PCR-cuantitativa a tiempo real: tamaño del producto amplificado, ecuaciones de las rectas patrón y eficacia de las reacciones. *: tamaño esperado del amplicón y confirmado por electroforesis en gel de agarosa.

Gen	Amplicón (pb)*	Recta patrón	R ²	Eficacia
SVCT1	175	$y = 20.35 - 3.49 \log (x)$	0.989	93.4
SVCT2	233	$y = 24.17 - 3.57 \log (x)$	0.988	90.6
OATP-A	101	$y = 37.82 - 3.52 \log (x)$	0.999	92.3
OATP-C	150	$y = 37.42 - 3.49 \log (x)$	0.999	93.4
OATP-8	111	$y = 36.25 - 3.34 \log (x)$	0.999	99.2

De nuevo hicimos un estudio para ver cuál era el gen más adecuado para utilizar como normalizador, y en este caso y después de probar la estabilidad de varios en las muestras de los distintos pacientes; la β -actina, la HPRT y el rRNA 18S, elegimos este último para normalizar nuestros resultados.

En el hígado humano control los niveles de mRNA de SVCT2 fueron mayores que los de SVCT1, ya que el valor de Ct para SVCT2 (= 24.9) fue dos ciclos menor que el obtenido para SVCT1 (= 26.8).

Estos resultados en el tejido hepático son opuestos a los encontrados por nosotros en este trabajo en el hígado de rata y coinciden con lo que se ha descrito anteriormente (Savini *et al.*, 2008). La distinta expresión entre especies se ha justificado por las diferencias en el manejo de AA entre humanos y roedores, ya que mientras que la rata es capaz de sintetizar AA, los humanos hemos perdido esta capacidad en el curso de la evolución y dependemos de la dieta para la obtención de AA.

Sin embargo, hay una característica que es compartida por todos los mamíferos, en todos los casos se requieren proteínas transportadoras para la captación de vitamina C por las células, para que puedan llevar a cabo funciones vitales.

En cuanto al efecto de la colestasis en la expresión de las SVCTs, en todas las hepatopatías estudiadas encontramos una marcada sobre-expresión del mRNA de SVCT1 (hemocromatosis > colestasis hepatocelular ≥ cirrosis biliar primaria ≥ esteatohepatitis no alcohólica) (figura 51). También la expresión de SVCT2 estaba elevada en todas las patologías hepáticas investigadas, aunque en menor medida (niveles hasta tres veces superiores a los del hígado sano). El orden de abundancia del mRNA en este caso fue cirrosis biliar primaria > hemocromatosis > colestasis hepatocelular ≥ esteatohepatitis no alcohólica (figura 51).

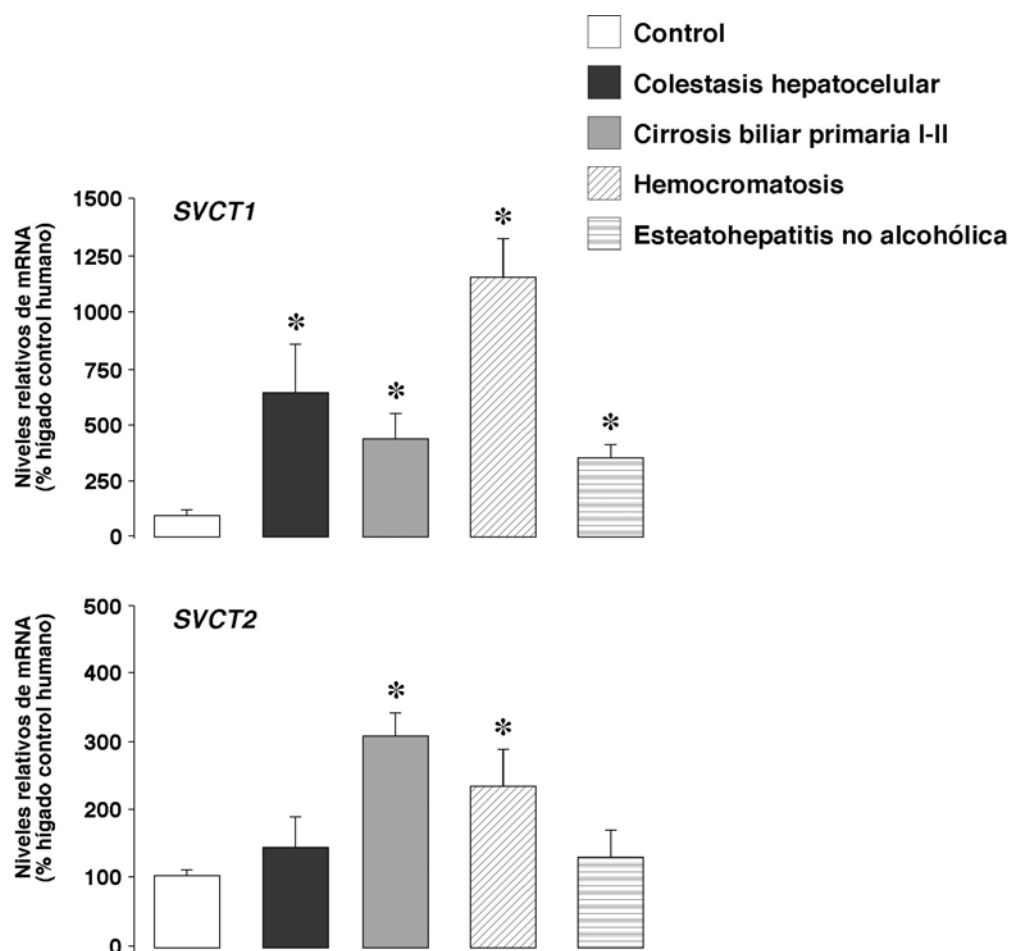


Figura 51. Niveles de expresión del mRNA de SVCT1 y SVCT2 determinados por PCR cuantitativa a tiempo real en muestras de hígado humano control (n = 4) y de pacientes con colestasis hepatocelular (n = 6), cirrosis biliar primaria I-II (n = 5), hemocromatosis (n = 4) y esteatohepatitis no alcohólica (n = 4). Los valores son media ± EEM de las muestras analizadas por triplicado expresados como abundancia relativa respecto a los individuos control y normalizados por los valores de mRNA 18S. *, p<0.05 comparado con el hígado control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

También en estas muestras quisimos comparar los resultados de SVCTs con lo que ocurría con la expresión de las proteínas transportadoras de aniones orgánicos de la familia OATP presentes en el tejido hepático.

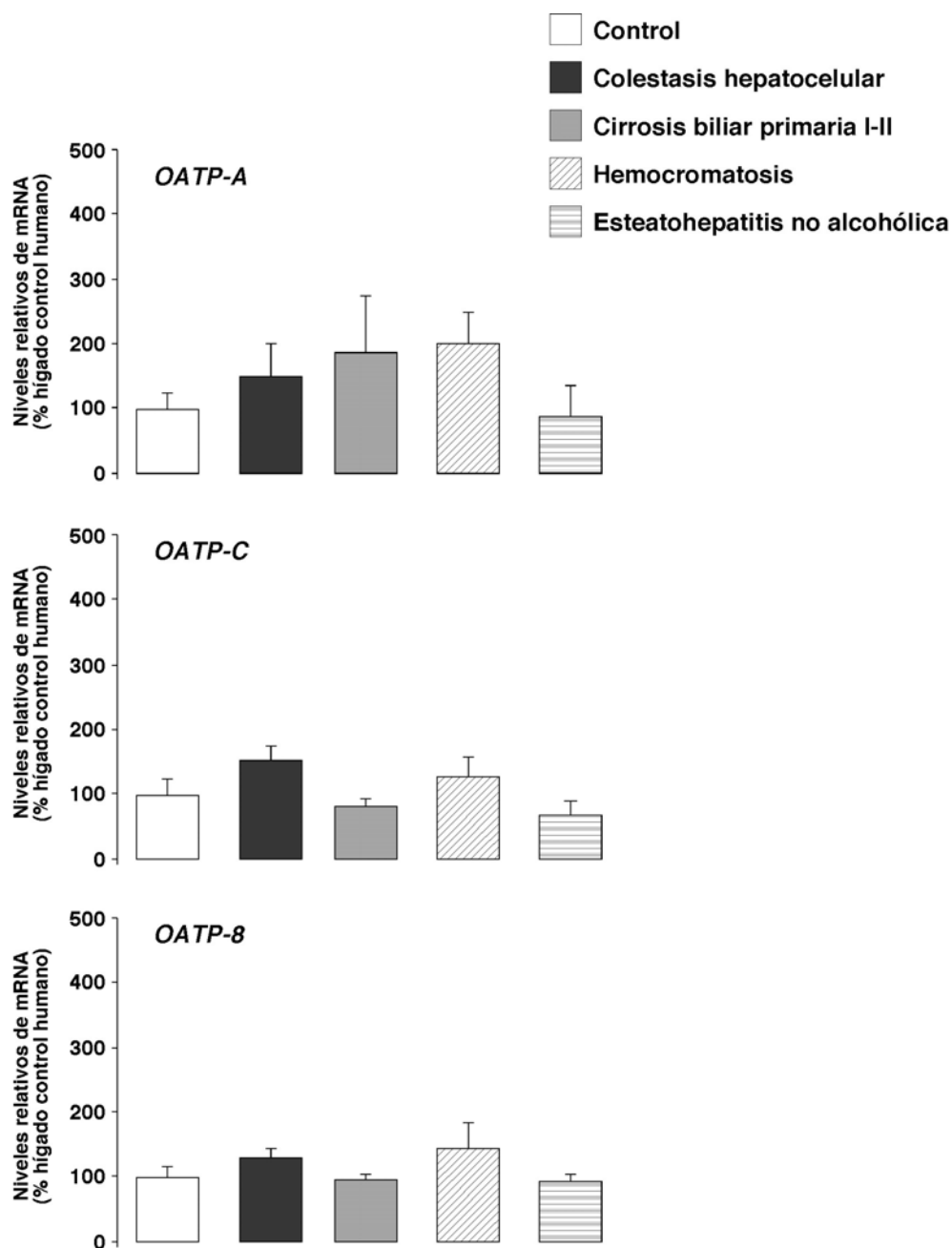


Figura 52. Niveles de expresión del mRNA de OATPA, OATPC y OATP8 determinados por PCR cuantitativa a tiempo real en muestras de hígado humano control (n = 4) y de pacientes con colestasis hepatocelular (n = 6), cirrosis biliar primaria I-II (n = 5), hemocromatosis (n = 4) y esteatohepatitis no alcohólica (n = 4). Los valores son media \pm EEM de las muestras analizadas por triplicado expresados como abundancia relativa respecto a los individuos control y normalizados por los valores de mRNA 18S. *, $p < 0.05$ comparado con el hígado control por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Como ya ha sido descrito (Briz *et al.*, 2003b), en condiciones fisiológicas, la abundancia de la OATP-A (Ct = 30.2) es mucho menor que la de la OATP-C (Ct = 21.5) y la OATP-8 (Ct = 22.8).

No encontramos cambios significativos en los niveles de expresión del mRNA de ninguna de las OATPs en las muestras analizadas de las distintas hepatopatías (figura 52), a pesar de que en algunos estudios se ha sugerido que en algunas patologías como la colangitis esclerosante primaria la reducción de la expresión de algunas OATPs podría disminuir la carga de aniones orgánicos en los hepatocitos colestáticos (Oswald *et al.*, 2001).

La regulación transcripcional de las SVCTs en situaciones de colestasis en el hígado humano fue diferente de la encontrada en la colestasis obstructiva en la rata. En el hígado humano la expresión de ambas isoformas estaba elevada (SVCT1 > SVCT2). Estos resultados coinciden con los que obtuvimos recientemente en la línea celular de adenoma hepatocelular humano HepG2 (Perez *et al.*, 2007). La incubación de estas células con ácidos biliares (TCA \geq TQDCA > TUDCA) inducía la expresión de SVCT2 en estas células.

Así pues, podemos concluir que el hígado humano, en ciertas condiciones patológicas, presenta un aumento de la expresión de los transportadores de vitamina C que puede ser parte de un mecanismo más complejo de defensa frente al estrés oxidativo que acompaña a muchas hepatopatías.

CONCLUSIÓN PRIMERA

Los estudios llevados a cabo en el hígado de rata demuestran que en esta especie, todos los tipos celulares del tejido hepático expresan al menos una isoforma del cotransportador de sodio y vitamina C, Svct.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

Existe una expresión diferencial de las isoformas de Svct en el parénquima hepático, de manera que las células encargadas de funciones típicamente hepáticas como son los hepatocitos, los colangiocitos y las células estrelladas expresan Svct1, mientras que las células que llevan a cabo funciones más generales como son las células endoteliales y las células de Kupffer expresan tanto Svct1 como Svct2.

CONCLUSIÓN TERCERA

El análisis de la evolución ontogénica de estos transportadores reveló que los niveles de expresión de Svct1 en el hígado de rata experimentan cambios importantes en las primeras semanas de vida y durante la senescencia, mientras que los de Svct2 se mantienen relativamente estables desde el periodo neonatal hasta la senescencia.

CONCLUSIÓN CUARTA

El análisis de biopsias hepáticas recogidas de pacientes con cirrosis biliar primaria, hemocromatosis, colestasis hepatocelular, o esteatohepatitis alcohólica reveló que tanto SVCT1 como SVCT2 se encuentran en el hígado humano y que sus niveles de expresión se ven aumentados, aunque con distinta magnitud, en todas las hepatopatías estudiadas. Estos cambios podrían formar parte de una respuesta adaptativa del tejido hepático al estrés oxidativo producido por las alteraciones metabólicas y al acúmulo de ácidos biliares debido a la colestasis que acompaña a la disfunción de este órgano.

CONCLUSIÓN QUINTA

En ratas con obesidad genéticamente heredada (Zucker *fa/fa*) o con diabetes inducida por estreptozotocina aparecen, en ausencia de marcada colestasis, alteraciones metabólicas que se acompañan de una elevada producción hepática de radicales libres. Sin embargo, los niveles de expresión de Svct1 y Svct2 no cambian de igual forma en ambos modelos experimentales, lo que sugiere que existen otros factores, además del estrés oxidativo, que afectan a la expresión hepática de ambas isoformas del transportador.

CONCLUSIÓN SEXTA

La colestasis obstructiva experimental en la rata produce una marcada acumulación de ácidos biliares junto a cambios significativos en la expresión de transportadores de vitamina C, que en esta especie se caracteriza por un descenso de los niveles de Svct1, y un aumento de los de Svct2. Esto sugiere un cambio en la capacidad de captar vitamina C que puede ser específico para cada tipo celular del tejido hepático.

CONCLUSIÓN SÉPTIMA

El cultivo de células de rata Can-10 de origen hepatocitario en presencia de ácidos biliares reveló la existencia de un efecto directo de estos compuestos sobre los mecanismos de control de la expresión de transportadores de vitamina C.

CONCLUSIÓN GLOBAL

En especies como la humana, incapaces de sintetizar ácido ascórbico, la disponibilidad de vitamina C por parte de las células hepáticas depende de los niveles de ingesta de esta vitamina y de la expresión de transportadores de membrana SVCT1 y SVCT2, responsables de su captación. Dicha expresión presenta variaciones ontogénicas y un patrón específico para las distintas células del tejido hepático, al menos en la rata. Además, esta expresión puede aumentar como parte de una respuesta adaptativa al estrés oxidativo producido por la acumulación de ácidos biliares propia de la colestasis asociada a diversas hepatopatías.

- Adjarov, D., Ivanov, E., Petrova, S., Savov, G., Mirkova, E. and Keremidchiev, D. (1979). Developmental studies on gamma-glutamyl transferase in rat intestinal mucosa. *Enzyme* **24**, 358-361.
- Aguirre, R. and May, J. M. (2008). Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacol Ther* **119**, 96-103.
- Agus, D. B., Gambhir, S. S., Pardridge, W. M., Spielholz, C., Baselga, J., Vera, J. C. and Golde, D. W. (1997). Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J Clin Invest* **100**, 2842-8.
- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H. and Sugiyama, Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* **1511**, 7-16.
- Alba, L. M. and Lindor, K. (2003). Review article: Non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* **17**, 977-86.
- Alison, M. R. (1986). Regulation of hepatic growth. *Physiol Rev.* **66**, 499-541.
- Alpini, G., Phillips, J. O., Vroman, B. and LaRusso, N. F. (1994). Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* **20**, 494-514.
- Arias, I. M. (1982). The liver : biology and pathobiology. New York: Raven P.
- Assem, M., Schuetz, E. G., Leggas, M., Sun, D., Yasuda, K., Reid, G., Zelcer, N., Adachi, M., Strom, S., Evans, R. M. et al. (2004). Interactions between hepatic Mrp4 and Sult2a as revealed by the constitutive androstane receptor and Mrp4 knockout mice. *J Biol Chem* **279**, 22250-7.
- Barbe, E., Damoiseaux, J. G., Dopp, E. A. and Dijkstra, C. D. (1990). Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiology* **182**, 88-99.
- Barbero, E. R., Herrera, M. C., Monte, M. J., Serrano, M. A. and Marin, J. J. (1995). Role of amidation in bile acid effect on DNA synthesis by regenerating mouse liver. *Am J Physiol* **268**, G1051-9.
- Barnes, M. J. (1975). Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **258**, 264-77.
- Basu, T. K., Schorah, C.J. (1982). Vitamin C in Health and Disease. London: Croom Helm Ltd.
- Berry, M. N., Edwards, A. M., Barritt, G. J. and Grivell, M. B. (1991). Isolated hepatocytes : preparation, properties and applications. Amsterdam [etc.]: Elsevier.
- Berry, M. N. and Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.* **43**, 506-520.
- Best, K. A., Holmes, M. E., Samson, S. E., Mwanjewe, J., Wilson, J. X., Dixon, S. J. and Grover, A. K. (2005). Ascorbate uptake in pig coronary artery endothelial cells. *Mol Cell Biochem* **271**, 43-9.
- Biondi, C., Pavan, B., Dalpiaz, A., Medici, S., Lunghi, L. and Vesce, F. (2007). Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *Mol Hum Reprod* **13**, 77-83.
- Bjorkhem, I., Nyberg, B. and Einarsson, K. (1992). 7 alpha-hydroxylation of 27-hydroxycholesterol in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* **1128**, 73-6.
- Blair, P. C., Popp, J. A., Bryant-Varela, B. J. and Thompson, M. B. (1991). Promotion of hepatocellular foci in female rats by chenodeoxycholic acid. *Carcinogenesis* **12**, 59-63.
- Blázquez, A. G., Briz, O., Romero, M., Rosales, R., Martínez-Becerra, P., Jiménez, F., Serrano, M.A., Marín J.J.G. (2008). Evidence for a role of canalicular BCRP/ABCG2 on sulphated bile acid secretion. *Journal of Hepatology* **48**, S56-S57.
- Blee, T. H., Cogbill, T. H. and Lambert, P. J. (2002). Hemorrhage associated with vitamin C deficiency in surgical patients. *Surgery* **131**, 408-12.

- Block, G.** (1991). Epidemiologic evidence regarding vitamin C and cancer. *Am J Clin Nutr* **54**, 1310S-1314S.
- Block, G.** (1992). The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutr Rev* **50**, 207-13.
- Bond, B. C., Virley, D. J., Cairns, N. J., Hunter, A. J., Moore, G. B., Moss, S. J., Mudge, A. W., Walsh, F. S., Jazin, E. and Preece, P.** (2002). The quantification of gene expression in an animal model of brain ischaemia using TaqMan real-time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* **106**, 101-16.
- Borrelli, E., Roux-Lombard, P., Grau, G. E., Girardin, E., Ricou, B., Dayer, J. and Suter, P. M.** (1996). Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* **24**, 392-7.
- Bouhuys, A.** (1974). Letter: Colds and antihistaminic effects of vitamin C. *N Engl J Med* **290**, 633.
- Boyer, J. C., Campbell, C. E., Sigurdson, W. J. and Kuo, S. M.** (2005). Polarized localization of vitamin C transporters, SVCT1 and SVCT2, in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 150-6.
- Braddock, R., Siman, C. M., Hamilton, K., Devlin, H., Garland, H. and Sibley, C. P.** (2002). gamma-Linoleic acid and ascorbic acid ameliorate the effects of experimental diabetes on electrolyte and bone homeostasis in pregnant rats. *J Endocrinol* **173**, 273-84.
- Britton, R. S. and Bacon, B. R.** (1994). Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* **41**, 343-8.
- Britton, R. S. and Brown, K. E.** (1995). Genetic hemochromatosis and Wilson's disease: role for oxidant stress? *Hepatology* **21**, 1195-7.
- Briz, O., Macias, R. I., Serrano, M. A., Gonzalez-Gallego, J., Bayon, J. E. and Marin, J. J.** (2003a). Excretion of foetal bilirubin by the rat placenta-maternal liver tandem. *Placenta* **24**, 462-72.
- Briz, O., Romero, M. R., Martinez-Becerra, P., Macias, R. I., Perez, M. J., Jimenez, F., San Martin, F. G. and Marin, J. J.** (2006). OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* **281**, 30326-35.
- Briz, O., Serrano, M. A., Maclas, R. I., Gonzalez-Gallego, J. and Marin, J. J.** (2003b). Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J* **371**, 897-905.
- Bron, A. J. and Brown, N. A.** (1987). Perinuclear lens retrodots: a role for ascorbate in cataractogenesis. *Br J Ophthalmol* **71**, 86-95.
- Brubacher, D., Moser, U. and Jordan, P.** (2000). Vitamin C concentrations in plasma as a function of intake: a meta-analysis. *Int J Vitam Nutr Res* **70**, 226-37.
- Cahill, C. J.** (1983). Prevention of postoperative renal failure in patients with obstructive jaundice--the role of bile salts. *Br J Surg* **70**, 590-5.
- Cantz, T., Nies, A. T., Brom, M., Hofmann, A. F. and Keppler, D.** (2000). MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G522-31.
- Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T. H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J. C., Gonzalez, F. J. et al.** (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem* **281**, 11039-49.
- Carpenter, L. R., Farruggella, T. J., Symes, A., Karow, M. L., Yancopoulos, G. D. and Stahl, N.** (1998). Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 6061-6066.
- Cassio, D., Macias, R. I., Grosse, B., Marin, J. J. and Monte, M. J.** (2007). Expression, localization, and inducibility by bile acids of hepatobiliary transporters in the new polarized rat hepatic cell lines, Can 3-1 and Can 10. *Cell Tissue Res* **330**, 447-60.
- Cattori, V., van Montfoort, J. E., Stieger, B., Landmann, L., Meijer, D. K., Winterhalter, K. H., Meier, P. J. and Hagenbuch, B.** (2001). Localization of organic anion transporting polypeptide 4

(Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch* **443**, 188-95.

Cepinskas, G., Rui, T. and Kvietys, P. R. (2002). Interaction between reactive oxygen metabolites and nitric oxide in oxidant tolerance. *Free Radic Biol Med* **33**, 433-40.

Clark, A. G., Rohrbaugh, A. L., Otterness, I. and Kraus, V. B. (2002). The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants. *Matrix Biol* **21**, 175-84.

Claude, P. and Goodenough, D. A. (1973). Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J. Cell Biol.* **58**, 390-400.

Coleman, R. (1987). Biochemistry of bile secretion. *Biochem J* **244**, 249-61.

Combettes, L., Berthon, B. and Claret, M. (1992). Taurolithocholate-induced Ca²⁺ release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem J* **287 (Pt 3)**, 891-6.

Cunningham, J. J., Ellis, S. L., McVeigh, K. L., Levine, R. E. and Calles-Escandon, J. (1991). Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. *Metabolism* **40**, 146-9.

Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Stricker-Krongrad, A. and Jeanrenaud, B. (1996). The weight-reducing effect of an intracerebroventricular bolus injection of leptin in genetically obese fa/fa rats. Reduced sensitivity compared with lean animals. *Diabetes* **45**, 1446-1450.

Chen, H. L. and Chang, M. H. (2004). Growth failure and metabolic bone disease in progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **39**, 328-30.

Chiang, J. Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.*

Daruwala, R., Song, J., Koh, W. S., Rumsey, S. C. and Levine, M. (1999). Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett* **460**, 480-4.

Daskalopoulos, R., Korcok, J., Tao, L. and Wilson, J. X. (2002). Accumulation of intracellular ascorbate from dehydroascorbic acid by astrocytes is decreased after oxidative stress and restored by propofol. *Glia* **39**, 124-32.

de Rijke, Y. B., Hessels, E. M. and van Berkel, T. J. (1992). Recognition sites on rat liver cells for oxidatively modified beta-very low density lipoproteins. *Arterioscler Thromb* **12**, 41-9.

Decaens, C., Durand, M., Grosse, B. and Cassio, D. (2008). Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell* **100**, 387-98.

Dekkers, J. C., van Doornen, L. J. and Kemper, H. C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* **21**, 213-38.

Deleze, G., Paumgartner, G., Karlaganis, G., Giger, W., Reinhard, M. and Sidiropoulos, D. (1978). Bile acid pattern in human amniotic fluid. *Eur J Clin Invest* **8**, 41-5.

Demling, R., Ikegami, K., Picard, L. and Lalonde, C. (1994). Administration of large doses of vitamin C does not decrease oxidant-induced lung lipid peroxidation caused by bacterial-independent acute peritonitis. *Inflammation* **18**, 499-510.

Denk, G. U., Soroka, C. J., Takeyama, Y., Chen, W. S., Schuetz, J. D. and Boyer, J. L. (2004). Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol* **40**, 585-91.

Desmet, V., Roskams, T. and Van Eyken, P. (1995). Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract* **191**, 513-24.

Dhariwal, K. R., Hartzell, W. O. and Levine, M. (1991). Ascorbic acid and dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. *Am J Clin Nutr* **54**, 712-6.

Ding, J. W., Andersson, R., Soltesz, V., Willen, R. and Bengmark, S. (1993). The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* **25**, 11-9.

Donner, M. G., Schumacher, S., Warskulat, U., Heinemann, J. and Haussinger, D. (2007). Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep

and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G1134-46.

Duijvestijn, A. M., van Goor, H., Klatter, F., Majoor, G. D., van Bussel, E. and van Breda Vriesman, P. J. (1992). Antibodies defining rat endothelial cells: RECA-1, a pan-endothelial cell-specific monoclonal antibody. *Lab Invest* **66**, 459-66.

Duran-Sandoval, D., Mautino, G., Martin, G., Percevault, F., Barbier, O., Fruchart, J. C., Kuipers, F. and Staels, B. (2004). Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes* **53**, 890-8.

El-Mir, M. Y., Monte, M. J., Morales, A. I., Arevalo, M., Serrano, M. A. and Marin, J. J. (1997). Effect of maternal cholestasis on biliary lipid and bile acid secretion in the infant rat. *Hepatology* **26**, 527-36.

Englard, S. and Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr* **6**, 365-406.

Erdinçler, D. S., Seven, A., Inci, F., Beger, T. and Candan, G. (1997). Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clin Chim Acta* **265**, 77-84.

Erlinger, S. (1982). Does Na⁺-K⁺-atpase have any role in bile secretion? *Am.J.Physiol* **243**, G243-G247.

Erlinger, S. (1993). Intracellular events in bile acid transport by the liver. In *Hepatic transport and bile secretion. Physiology and Pathophysiology*, pp. 467-475. New York: Raven Press.

Erlinger, S. (1996). Do intracellular organelles have any role in transport of bile acids by hepatocytes? *J Hepatol* **24 Suppl 1**, 88-93.

Evans, W. H. (1980). A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim.Biophys.Acta* **604**, 27-64.

Faaland, C. A., Race, J. E., Ricken, G., Warner, F. J., Williams, W. J. and Holtzman, E. J. (1998). Molecular characterization of two novel transporters from human and mouse kidney and from LLC-PK1 cells reveals a novel conserved family that is homologous to bacterial and Aspergillus nucleobase transporters. *Biochim Biophys Acta* **1442**, 353-60.

Fain, O., Paries, J., Jacquart, B., Le Moel, G., Kettaneh, A., Stirnemann, J., Heron, C., Sitbon, M., Taleb, C., Letellier, E. et al. (2003). Hypovitaminosis C in hospitalized patients. *Eur J Intern Med* **14**, 419-425.

Feiz, H. R. and Mobarhan, S. (2002). Does vitamin C intake slow the progression of gastric cancer in Helicobacter pylori-infected populations? *Nutr Rev* **60**, 34-6.

Feldmann, G. (1986). El Hígado. Histología y citología: En "Fisiología Humana", pp. 104-110. Madrid: Salvat.

Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-47.

Finley, E. B. and Cerklewski, F. L. (1983). Influence of ascorbic acid supplementation on copper status in young adult men. *Am J Clin Nutr* **37**, 553-6.

Fischer, H., Schwarzer, C. and Illek, B. (2004). Vitamin C controls the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3691-6.

Fischer, S., Beuers, U., Spengler, U., Zwiebel, F. M. and Koebe, H. G. (1996). Hepatic levels of bile acids in end-stage chronic cholestatic liver disease. *Clin Chim Acta* **251**, 173-86.

Fishbein, S. L. and Goodstein, S. (1972). The pressure lowering effect of ascorbic acid. *Ann Ophthalmol* **4**, 487-91.

Franceschi, R. T., Wilson, J. X. and Dixon, S. J. (1995). Requirement for Na⁽⁺⁾-dependent ascorbic acid transport in osteoblast function. *Am J Physiol* **268**, C1430-9.

Frei, B. (1991). Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* **54**, 1113S-1118S.

- Frei, B.** (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* **97**, 5S-13S; discussion 22S-28S.
- French, S. W. and Davies, P. L.** (1975). Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes. *Gastroenterology* **68**, 765-774.
- Friedman, S. L.** (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* **275**, 2247-50.
- Fujita, I., Hirano, J., Itoh, N., Nakanishi, T. and Tanaka, K.** (2001). Dexamethasone induces sodium-dependant vitamin C transporter in a mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Br J Nutr* **86**, 145-9.
- Gale, C. R., Martyn, C. N., Winter, P. D. and Cooper, C.** (1995). Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people. *BMJ* **310**, 1563-6.
- Galman, C., Angelin, B. and Rudling, M.** (2005). Bile acid synthesis in humans has a rapid diurnal variation that is asynchronous with cholesterol synthesis. *Gastroenterology* **129**, 1445-53.
- Galle, P. R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G. and Stiehl, A.** (1990). Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* **12**, 486-91.
- Gao, B., St Pierre, M. V., Stieger, B. and Meier, P. J.** (2004). Differential expression of bile salt and organic anion transporters in developing rat liver. *J Hepatol* **41**, 201-8.
- Garcia-Marin, J. J., Villanueva, G. R. and Esteller, A.** (1988). Diabetes-induced cholestasis in the rat: possible role of hyperglycemia and hypoinsulinemia. *Hepatology* **8**, 332-340.
- Garg, A. and Grundy, S. M.** (1994). Cholestyramine therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A short-term, double-blind, crossover trial. *Ann Intern Med* **121**, 416-22.
- Gartung, C. and Matern, S.** (1997). Molecular regulation of sinusoidal liver bile acid transporters during cholestasis. *Yale J Biol Med* **70**, 355-63.
- Gatmaitan, Z. C. and Arias, I. M.** (1995). ATP-dependent transport systems in the canalicular membrane of the hepatocyte. *Physiol Rev* **75**, 261-75.
- Geber, W. F., Lefkowitz, S. S. and Hung, C. Y.** (1975). Effect of ascorbic acid, sodium salicylate, and caffeine on the serum interferon level in response to viral infection. *Pharmacology* **13**, 228-33.
- Geier, A., Dietrich, C. G., Trauner, M. and Gartung, C.** (2007). Extrahepatic cholestasis downregulates Oatp1 by TNF-alpha signalling without affecting Oatp2 and Oatp4 expression and sodium-independent bile salt uptake in rat liver. *Liver Int* **27**, 1056-65.
- Geller, S. A., Petrovic, L.M.** (2003). *Biopsy Interpretation of the Liver*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gerlyng, P., Stokke, T., Huitfeldt, H. S., Stenersen, T., Danielsen, H. E., Grotmol, T. and Seglen, P. O.** (1992). Analytical methods for the study of liver cell proliferation. *Cytometry* **13**, 404-415.
- Gerster, H.** (1997). No contribution of ascorbic acid to renal calcium oxalate stones. *Ann Nutr Metab* **41**, 269-82.
- Gissen, P., Johnson, C. A., Morgan, N. V., Stapelbroek, J. M., Forshew, T., Cooper, W. N., McKiernan, P. J., Klomp, L. W., Morris, A. A., Wraith, J. E. et al.** (2004). Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat Genet* **36**, 400-4.
- Greenwel, P., Rubin, J., Schwartz, M., Hertzberg, E. L. and Rojkind, M.** (1993). Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest* **69**, 210-6.
- Greve, J. W., Gouma, D. J. and Buurman, W. A.** (1989). Bile acids inhibit endotoxin-induced release of tumor necrosis factor by monocytes: an in vitro study. *Hepatology* **10**, 454-8.

- Gumpricht, E., Devereaux, M. W., Dahl, R. H. and Sokol, R. J.** (2000). Glutathione status of isolated rat hepatocytes affects bile acid-induced cellular necrosis but not apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* **164**, 102-11.
- Gumucio, J. J. and Miller, D. L.** (1981). Functional implications of liver cell heterogeneity. *Gastroenterology* **80**, 393-403.
- Gupta, P. D.** (1992). Ultrastructural features of epithelioid tumors. *Indian J Pathol Microbiol* **35**, 278-88.
- Hagen, T. M., Ingersoll, R. T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C. M., Vinarsky, V., Bartholomew, J. C. and Ames, A. B.** (1999). (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J* **13**, 411-8.
- Hagen, T. M., Wehr, C. M. and Ames, B. N.** (1998). Mitochondrial decay in aging. Reversal through supplementation of acetyl-L-carnitine and N-tert-butyl-alpha-phenyl-nitrone. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 214-23.
- Hagenbuch, B. and Meier, P. J.** (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* **93**, 1326-31.
- Hagenbuch, B. and Meier, P. J.** (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1609**, 1-18.
- Halliwell, B., Wasil, M. and Grootveld, M.** (1987). Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. Implications for antioxidant protection in the inflamed rheumatoid joint. *FEBS Lett* **213**, 15-7.
- Hankinson, S. E., Stampfer, M. J., Seddon, J. M., Colditz, G. A., Rosner, B., Speizer, F. E. and Willett, W. C.** (1992). Nutrient intake and cataract extraction in women: a prospective study. *BMJ* **305**, 335-9.
- Harkes, L. and Van Berkel, T. J.** (1984). In vivo characteristics of a specific recognition site for LDL on non-parenchymal rat liver cells which differs from the 17 alpha-ethinyl estradiol-induced LDL receptor on parenchymal liver cells. *Biochim Biophys Acta* **794**, 340-7.
- Hegde, K. R. and Varma, S. D.** (2004). Protective effect of ascorbate against oxidative stress in the mouse lens. *Biochim Biophys Acta* **1670**, 12-8.
- Hernanz, A. and Codoceo, R.** (1985). An improved high-performance liquid-chromatographic determination of conjugated bile acids in serum using paired-ion chromatography. *Clin Chim Acta* **145**, 197-203.
- Huang, J., Agus, D. B., Winfree, C. J., Kiss, S., Mack, W. J., McTaggart, R. A., Choudhri, T. F., Kim, L. J., Mocco, J., Pinsky, D. J. et al.** (2001). Dehydroascorbic acid, a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11720-4.
- Hylemon, P. B., Bohdan, P. M., Sirica, A. E., Heuman, D. M. and Vlahcevic, Z. R.** (1990). Cholesterol and bile acid metabolism in cultures of primary rat bile ductular epithelial cells. *Hepatology* **11**, 982-8.
- Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T. and Sugimoto, Y.** (2003). Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* **64**, 610-8.
- Jacques, P. F. and Chylack, L. T., Jr.** (1991). Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention. *Am J Clin Nutr* **53**, 352S-355S.
- Janvilisri, T., Shahi, S., Venter, H., Balakrishnan, L. and van Veen, H. W.** (2005). Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem J* **385**, 419-26.
- Jin, S. N., Mun, G. H., Lee, J. H., Oh, C. S., Kim, J., Chung, Y. H., Kang, J. S., Kim, J. G., Hwang, D. H., Hwang, Y. I. et al.** (2005). Immunohistochemical study on the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in the respiratory system of adult rat. *Microsc Res Tech* **68**, 360-7.

- Kang, J. S., Kim, H. N., Jung da, J., Kim, J. E., Mun, G. H., Kim, Y. S., Cho, D., Shin, D. H., Hwang, Y. I. and Lee, W. J.** (2007). Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J Invest Dermatol* **127**, 698-706.
- Kannan, R., Stolz, A., Ji, Q., Prasad, P. D. and Ganapathy, V.** (2001). Vitamin C transport in human lens epithelial cells: evidence for the presence of SVCT2. *Exp Eye Res* **73**, 159-65.
- Karaman, A., Iraz, M., Kirimlioglu, H., Karadag, N., Tas, E. and Fadillioglu, E.** (2006). Hepatic damage in biliary-obstructed rats is ameliorated by leflunomide treatment. *Pediatr Surg Int* **22**, 701-8.
- Kashiba, M., Oka, J., Ichikawa, R., Kasahara, E., Inayama, T., Kageyama, A., Kageyama, H., Osaka, T., Umegaki, K., Matsumoto, A. et al.** (2002). Impaired ascorbic acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Radic Biol Med* **33**, 1221-30.
- Kast, C., Stieger, B., Winterhalter, K. H. and Meier, P. J.** (1994). Hepatocellular transport of bile acids. Evidence for distinct subcellular localizations of electrogenic and ATP-dependent taurocholate transport in rat hepatocytes. *J Biol Chem* **269**, 5179-86.
- Keitel, V., Kubitz, R. and Haussinger, D.** (2008). Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* **14**, 5620-9.
- Keppler, D. and Konig, J.** (1997). Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* **11**, 509-16.
- Kim, M., Otsuka, M., Yu, R., Kurata, T. and Arakawa, N.** (1994). The distribution of ascorbic acid and dehydroascorbic acid during tissue regeneration in wounded dorsal skin of guinea pigs. *Int J Vitam Nutr Res* **64**, 56-9.
- Knook, D. L. and Sleyster, E. C.** (1980). Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content. *Biochem Biophys Res Commun* **96**, 250-7.
- Knowles, B. B., Howe, C. C. and Aden, D. P.** (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-9.
- Koneru, B. and Dikdan, G.** (2002). Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation* **73**, 325-30.
- Koneru, B., Reddy, M. C., dela Torre, A. N., Patel, D., Ippolito, T. and Ferrante, R. J.** (1995). Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* **59**, 942-6.
- Korcok, J., Dixon, S. J., Lo, T. C. and Wilson, J. X.** (2003). Differential effects of glucose on dehydroascorbic acid transport and intracellular ascorbate accumulation in astrocytes and skeletal myocytes. *Brain Res* **993**, 201-7.
- Korcok, J., Wu, F., Tyml, K., Hammond, R. R. and Wilson, J. X.** (2002). Sepsis inhibits reduction of dehydroascorbic acid and accumulation of ascorbate in astroglial cultures: intracellular ascorbate depletion increases nitric oxide synthase induction and glutamate uptake inhibition. *J Neurochem* **81**, 185-93.
- Koteish, A. and Diehl, A. M.** (2001). Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* **21**, 89-104.
- Krahenbuhl, S., Talos, C. and Reichen, J.** (1994). Mechanisms of impaired hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology* **19**, 1272-81.
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P. and Schuetz, J. D.** (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **279**, 24218-25.
- Kubin, A., Kaudela, K., Jindra, R., Alth, G., Grunberger, W., Wierrani, F. and Ebermann, R.** (2003). Dehydroascorbic acid in urine as a possible indicator of surgical stress. *Ann Nutr Metab* **47**, 1-5.
- Kubitz, R., Saha, N., Kuhlkamp, T., Dutta, S., vom Dahl, S., Wettstein, M. and Haussinger, D.** (2004). Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver. *J Biol Chem* **279**, 10323-30.

- Kullak-Ublick, G. A. and Meier, P. J.** (2000). Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis* **4**, 357-85.
- Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B. and Meier, P. J.** (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* **126**, 322-42.
- Kuo, S. M., Lin, C. P. and Morehouse, H. F., Jr.** (2001). Dihydropyridine calcium channel blockers inhibit ascorbic acid accumulation in human intestinal Caco-2 cells. *Life Sci* **68**, 1751-60.
- Kuo, S. M., MacLean, M. E., McCormick, K. and Wilson, J. X.** (2004). Gender and sodium-ascorbate transporter isoforms determine ascorbate concentrations in mice. *J Nutr* **134**, 2216-21.
- Larena, M. G., Martinez-Diez, M. C., Monte, M. J., Dominguez, M. F., Pascual, M. J. and Marin, J. J.** (2001). Liver organotropism and biotransformation of a novel platinum-ursodeoxycholate derivative, Bamet-UD2, with enhanced antitumour activity. *J Drug Target* **9**, 185-200.
- LaRusso, N. F., Ishii, M. and Vroman, B. T.** (1991). The ins and outs of membrane movement in biliary epithelia. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **102**, 245-58; discussion 258-9.
- Le Vee, M., Jigorel, E., Glaise, D., Gripon, P., Guguen-Guillouzo, C. and Fardel, O.** (2006). Functional expression of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporters in the differentiated human hepatoma HepaRG cell line. *Eur J Pharm Sci* **28**, 109-17.
- Lee, J., Azzaroli, F., Wang, L., Soroka, C. J., Gigliozzi, A., Setchell, K. D., Kramer, W. and Boyer, J. L.** (2001). Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* **121**, 1473-84.
- Lee, J. H., Oh, C. S., Mun, G. H., Kim, J. H., Chung, Y. H., Hwang, Y. I., Shin, D. H. and Lee, W. J.** (2006). Immunohistochemical localization of sodium-dependent L-ascorbic acid transporter 1 protein in rat kidney. *Histochem Cell Biol* **126**, 491-4.
- Lee, W., Davis, K. A., Rettmer, R. L. and Labbe, R. F.** (1988). Ascorbic acid status: biochemical and clinical considerations. *Am J Clin Nutr* **48**, 286-90.
- Leevy, C. M., Thompson, A. and Baker, H.** (1970). Vitamins and liver injury. *Am J Clin Nutr* **23**, 493-9.
- Lehr, H. A., Frei, B., Olofsson, A. M., Carew, T. E. and Arfors, K. E.** (1995). Protection from oxidized LDL-induced leukocyte adhesion to microvascular and macrovascular endothelium in vivo by vitamin C but not by vitamin E. *Circulation* **91**, 1525-32.
- Leibovitz, B. and Siegel, B. V.** (1978). Ascorbic acid, neutrophil function, and the immune response. *Int J Vitam Nutr Res* **48**, 159-64.
- Lepreux, S., Dubuisson, L., Le Bail, B., Desmouliere, A., Balabaud, C. and Bioulac-Sage, P.** (2001). Can hepatic stellate cells express alpha-smooth muscle actin in normal human liver? *Liver* **21**, 293-4.
- Lester, R., Pyrek, J.S., Little, J.M., Adcock, E.W.** (1983). What is meant by term "bile acid". *Am J Physiol* **244**, 107-10.
- Levine, M.** (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med* **314**, 892-902.
- Levine, M., Conry-Cantilena, C., Wang, Y., Welch, R. W., Washko, P. W., Dhariwal, K. R., Park, J. B., Lazarev, A., Graumlich, J. F., King, J. et al.** (1996). Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3704-9.
- Levine, M., Rumsey, S. C., Daruwala, R., Park, J. B. and Wang, Y.** (1999). Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* **281**, 1415-23.
- Lew, J. L., Zhao, A., Yu, J., Huang, L., De Pedro, N., Pelaez, F., Wright, S. D. and Cui, J.** (2004). The farnesoid X receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *J Biol Chem* **279**, 8856-61.
- Li, Z., Lin, H., Yang, S. and Diehl, A. M.** (2002). Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* **123**, 1304-10.

- Liang, D., Hagenbuch, B., Stieger, B. and Meier, P. J.** (1993). Parallel decrease of Na(+)-taurocholate cotransport and its encoding mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology* **18**, 1162-6.
- Liang, W. J., Johnson, D. and Jarvis, S. M.** (2001). Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol* **18**, 87-95.
- Ljubuncic, P., Fuhrman, B., Oiknine, J., Aviram, M. and Bomzon, A.** (1996). Effect of deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on lipid peroxidation in cultured macrophages. *Gut* **39**, 475-8.
- Louw, J. A., Werbeck, A., Louw, M. E., Kotze, T. J., Cooper, R. and Labadarios, D.** (1992). Blood vitamin concentrations during the acute-phase response. *Crit Care Med* **20**, 934-41.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* **193**, 265-275.
- Lumbroso, S., Paris, F. and Sultan, C.** (2004). Activating Gsalpha mutations: analysis of 113 patients with signs of McCune-Albright syndrome--a European Collaborative Study. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2107-13.
- Lunec, J. and Blake, D. R.** (1985). The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Free Radic Res Commun* **1**, 31-9.
- Lutsenko, E. A., Carcamo, J. M. and Golde, D. W.** (2004). A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Mol Cell Biol* **24**, 3150-6.
- Lykkesfeldt, J., Hagen, T. M., Vinarsky, V. and Ames, B. N.** (1998). Age-associated decline in ascorbic acid concentration, recycling, and biosynthesis in rat hepatocytes--reversal with (R)-alpha-lipoic acid supplementation. *FASEB J* **12**, 1183-9.
- MacDonald, L., Thumser, A. E. and Sharp, P.** (2002). Decreased expression of the vitamin C transporter SVCT1 by ascorbic acid in a human intestinal epithelial cell line. *Br J Nutr* **87**, 97-100.
- Macias, R. I., Jimenez, S., Serrano, M. A., Monte, M. J. and Marin, J. J.** (2006). Effect of maternal cholestasis and treatment with ursodeoxycholic acid on the expression of genes involved in the secretion of biliary lipids by the neonatal rat liver. *Life Sci* **79**, 1014-9.
- Macias, R. I., Pascual, M. J., Bravo, A., Alcalde, M. P., Larena, M. G., St-Pierre, M. V., Serrano, M. A. and Marin, J. J.** (2000). Effect of maternal cholestasis on bile acid transfer across the rat placenta-maternal liver tandem. *Hepatology* **31**, 975-83.
- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J. and Shan, B.** (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362-5.
- Malaguarnera, M., Di Rosa, M., Nicoletti, F. and Malaguarnera, L.** (2009). Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med* **87**, 679-95.
- Marin, J. J., Barbero, E. R., Herrera, M. C., Tabernero, A. and Monte, M. J.** (1993). Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver. *Hepatology* **18**, 1182-92.
- Marin, J. J., Bravo, P., Perez Barriocanal, F., el-Mir, M. Y. and Villanueva, G. R.** (1991). Hyperglycemia-induced cholestasis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* **14**, 184-91.
- Marin, J. J. G., Serrano, M.A., Perez, M.J., Macias, R.I.R.** (2009). Transport and Metabolism in Health and Disease. In *Molecular Bases of the Cellular Handling of Vitamin C (en prensa)*.
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E.** (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal.Biochem.* **87**, 206-210.
- Mashige, F., Imai, K. and Osuga, T.** (1976). A simple and sensitive assay of total serum bile acids. *Clin Chim Acta* **70**, 79-86.

- Maulen, N. P., Henriquez, E. A., Kempe, S., Carcamo, J. G., Schmid-Kotsas, A., Bachem, M., Grunert, A., Bustamante, M. E., Nualart, F. and Vera, J. C.** (2003). Up-regulation and polarized expression of the sodium-ascorbic acid transporter SVCT1 in post-confluent differentiated CaCo-2 cells. *J Biol Chem* **278**, 9035-41.
- May, J. M.** (2000). How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic Biol Med* **28**, 1421-9.
- McNally, N.** (1953). Preliminary report on the use of vitamin C in asthma. *J Ir Med Assoc* **33(198)**, 175-178.
- McNulty, A. L., Vail, T. P. and Kraus, V. B.** (2005). Chondrocyte transport and concentration of ascorbic acid is mediated by SVCT2. *Biochim Biophys Acta* **1712**, 212-21.
- Meier, P. J.** (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Semin.Liver Dis.* **8**, 293-307.
- Meier, P. J.** (1989). The bile salt secretory polarity of hepatocytes. *J Hepatol* **9**, 124-9.
- Meier, P. J.** (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol* **269**, G801-12.
- Meier, P. J. and Stieger, B.** (2002). Bile salt transporters. *Annu.Rev.Physiol* **64**, 635-661.
- Michels, A. J., Joisher, N. and Hagen, T. M.** (2003). Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **410**, 112-20.
- Monte, M. J., Dominguez, S., Palomero, M. F., Macias, R. I. and Marin, J. J.** (1999). Further evidence of the usefulness of bile acids as molecules for shuttling cytostatic drugs toward liver tumors. *J.Hepatol.* **31**, 521-528.
- Monte, M. J., El-Mir, M. Y., Sainz, G. R., Bravo, P. and Marin, J. J.** (1997). Bile acid secretion during synchronized rat liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* **1362**, 56-66.
- Monte, M. J., Morales, A. I., Arevalo, M., Alvaro, I., Macias, R. I. and Marin, J. J.** (1996). Reversible impairment of neonatal hepatobiliary function by maternal cholestasis. *Hepatology* **23**, 1208-17.
- Muller, M. and Jansen, P. L.** (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol* **272**, G1285-303.
- Muller, M., Mayer, R., Hero, U. and Keppler, D.** (1994). ATP-dependent transport of amphiphilic cations across the hepatocyte canalicular membrane mediated by mdr1 P-glycoprotein. *FEBS Lett* **343**, 168-72.
- Mun, G. H., Kim, M. J., Lee, J. H., Kim, H. J., Chung, Y. H., Chung, Y. B., Kang, J. S., Hwang, Y. I., Oh, S. H., Kim, J. G. et al.** (2006). Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res* **83**, 919-28.
- Naidu, K. A.** (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* **2**, 7.
- Nakai, D., Nakagomi, R., Furuta, Y., Tokui, T., Abe, T., Ikeda, T. and Nishimura, K.** (2001). Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 861-7.
- Nathanson, M. H. and Boyer, J. L.** (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* **14**, 551-566.
- Ng, L. L., Ngkeekwong, F. C., Quinn, P. A. and Davies, J. E.** (1998). Uptake mechanisms for ascorbate and dehydroascorbate in lymphoblasts from diabetic nephropathy and hypertensive patients. *Diabetologia* **41**, 435-42.
- Nieto, N., Friedman, S. L. and Cederbaum, A. I.** (2002). Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* **277**, 9853-64.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N. and Yagi, K.** (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* **269**, 13685-8.

- Nowicki, M. T., Aleksunes, L. M., Sawant, S. P., Dnyanmote, A. V., Mehendale, H. M. and Manautou, J. E.** (2008). Renal and hepatic transporter expression in type 2 diabetic rats. *Drug Metab Lett* **2**, 11-7.
- Obrosova, I. G., Fathallah, L., Liu, E. and Nourooz-Zadeh, J.** (2003). Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* **34**, 186-95.
- Obrosova, I. G., Fathallah, L. and Stevens, M. J.** (2001). Taurine counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in early experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* **172**, 211-9.
- Ogawa, Y., Masuzaki, H., Isse, N., Okazaki, T., Mori, K., Shigemoto, M., Satoh, N., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y. et al.** (1995). Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* **96**, 1647-52.
- Ohta, Y., Kongo, M., Sasaki, E., Ishiguro, I. and Harada, N.** (2000). Protective effect of melatonin against alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury in rats. *J Pineal Res* **29**, 15-23.
- Oswald, M., Kullak-Ublick, G. A., Paumgartner, G. and Beuers, U.** (2001). Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver* **21**, 247-53.
- Pain, J. A., Cahill, C. J., Gilbert, J. M., Johnson, C. D., Trapnell, J. E. and Bailey, M. E.** (1991). Prevention of postoperative renal dysfunction in patients with obstructive jaundice: a multicentre study of bile salts and lactulose. *Br J Surg* **78**, 467-9.
- Palmquist, B. M., Philipson, B. and Barr, P. O.** (1984). Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy. *Br J Ophthalmol* **68**, 113-7.
- Parola, M., Leonarduzzi, G., Robino, G., Albano, E., Poli, G. and Dianzani, M. U.** (1996). On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* **20**, 351-9.
- Patak, P., Willenberg, H. S. and Bornstein, S. R.** (2004). Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocr Res* **30**, 871-5.
- Patel, T., Bronk, S. F. and Gores, G. J.** (1994). Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes. *J Clin Invest* **94**, 2183-92.
- Paterson, C. A. and O'Rourke, M. C.** (1987). Vitamin C levels in human tears. *Arch Ophthalmol* **105**, 376-7.
- Paulusma, C. C., Bosma, P. J., Zaman, G. J., Bakker, C. T., Otter, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Borst, P. and Oude Elferink, R. P.** (1996). Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**, 1126-8.
- Peng, X., Grosse, B., Le, T. B., Nicolas, V., Delagebeaudeuf, C., Bedda, T., Decaens, C. and Cassio, D.** (2006). How to induce non-polarized cells of hepatic origin to express typical hepatocyte polarity: generation of new highly polarized cell models with developed and functional bile canaliculi. *Cell Tissue Res* **323**, 233-243.
- Perez, M. J., Castano, B., Gonzalez-Buitrago, J. M. and Marin, J. J.** (2007). Multiple protective effects of melatonin against maternal cholestasis-induced oxidative stress and apoptosis in the rat fetal liver-placenta-maternal liver trio. *J Pineal Res* **43**, 130-9.
- Perez, M. J., Castano, B., Jimenez, S., Serrano, M. A., Gonzalez-Buitrago, J. M. and Marin, J. J.** (2008). Role of vitamin C transporters and biliverdin reductase in the dual pro-oxidant and anti-oxidant effect of biliary compounds on the placental-fetal unit in cholestasis during pregnancy. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**, 327-36.
- Perez, M. J., Macias, R. I., Duran, C., Monte, M. J., Gonzalez-Buitrago, J. M. and Marin, J. J.** (2005). Oxidative stress and apoptosis in fetal rat liver induced by maternal cholestasis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *J Hepatol* **43**, 324-32.
- Perez, M. J., Macias, R. I. and Marin, J. J.** (2006). Maternal cholestasis induces placental oxidative stress and apoptosis. Protective effect of ursodeoxycholic acid. *Placenta* **27**, 34-41.
- Peterson, R. E. and Fujimoto, J. M.** (1973). Retrograde intrabiliary injection: absorption of water and other compounds from the rat biliary tree. *J Pharmacol Exp Ther* **185**, 150-62.

- Pizarro, M., Balasubramaniyan, N., Solis, N., Solar, A., Duarte, I., Miquel, J. F., Suchy, F. J., Trauner, M., Accatino, L., Ananthanarayanan, M. et al.** (2004). Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function. *Gut* **53**, 1837-43.
- Pratt, D. S.** (2005). Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* **21**, 270-4.
- Qiu, S., Li, L., Weeber, E. J. and May, J. M.** (2007). Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res* **85**, 1046-56.
- Qutob, S., Dixon, S. J. and Wilson, J. X.** (1998). Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells. *Endocrinology* **139**, 51-6.
- Rajan, D. P., Huang, W., Dutta, B., Devoe, L. D., Leibach, F. H., Ganapathy, V. and Prasad, P. D.** (1999). Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 762-8.
- Rath, M.** (1993). Eradicating heart disease. San Francisco, CA: Health Now.
- Rodrigues, C. M., Steiers, C. L., Keene, C. D., Ma, X., Kren, B. T., Low, W. C. and Steer, C. J.** (2000). Tauroursodeoxycholic acid partially prevents apoptosis induced by 3-nitropropionic acid: evidence for a mitochondrial pathway independent of the permeability transition. *J Neurochem* **75**, 2368-79.
- Rose, R. C.** (1987). Solubility properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation. *Biochim Biophys Acta* **924**, 254-6.
- Salceda, R. and Contreras-Cubas, C.** (2007). Ascorbate uptake in normal and diabetic rat retina and retinal pigment epithelium. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**, 175-9.
- Sanz, N., Diez-Fernandez, C., Alvarez, A. and Cascales, M.** (1997). Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* **27**, 525-34.
- Savini, I., Rossi, A., Catani, M. V., Ceci, R. and Avigliano, L.** (2007). Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* **361**, 385-90.
- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L. and Catani, M. V.** (2008). SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino.Acids* **34**, 347-355.
- Schachter, E. N. and Schlesinger, A.** (1982). The attenuation of exercise-induced bronchospasm by ascorbic acid. *Ann Allergy* **49**, 146-51.
- Schaffner, F. and Thaler, H.** (1986). Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* **8**, 283-98.
- Scharschmidt, B. F. and Lake, J. R.** (1989). Hepatocellular bile acid transport and ursodeoxycholic acid hypercholerisis. *Dig Dis Sci* **34**, 5S-15S.
- Schnack, H., Stockinger, L. and Wewalka, F.** (1967). Adventitious connective tissue cells in the space of Disse and their relation to fibre formation. *Rev Int Hepatol* **17**, 855-60.
- Schorah, C. J., Downing, C., Piripitsi, A., Gallivan, L., Al-Hazaa, A. H., Sanderson, M. J. and Bodenham, A.** (1996). Total vitamin C, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid concentrations in plasma of critically ill patients. *Am J Clin Nutr* **63**, 760-5.
- Schorah, C. J., Sobala, G. M., Sanderson, M., Collis, N. and Primrose, J. N.** (1991). Gastric juice ascorbic acid: effects of disease and implications for gastric carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* **53**, 287S-293S.
- Seghieri, G., Martinoli, L., Miceli, M., Ciuti, M., D'Alessandri, G., Gironi, A., Palmieri, L., Anichini, R., Bartolomei, G. and Franconi, F.** (1994). Renal excretion of ascorbic acid in insulin dependent diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res* **64**, 119-24.
- Seno, T., Inoue, N., Matsui, K., Ejiri, J., Hirata, K., Kawashima, S. and Yokoyama, M.** (2004). Functional expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 in human endothelial cells. *J Vasc Res* **41**, 345-51.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. and Ames, B. N.** (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10771-8.

- Shivakumar, P., Campbell, K. M., Sabla, G. E., Miethke, A., Tiao, G., McNeal, M. M., Ward, R. L. and Bezerra, J. A.** (2004). Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest* **114**, 322-9.
- Simon, J. A., Hudes, E. S. and Tice, J. A.** (2001). Relation of serum ascorbic acid to mortality among US adults. *J Am Coll Nutr* **20**, 255-63.
- Sinclair, A. J., Girling, A. J., Gray, L., Lunec, J. and Barnett, A. H.** (1992). An investigation of the relationship between free radical activity and vitamin C metabolism in elderly diabetic subjects with retinopathy. *Gerontology* **38**, 268-74.
- Siushansian, R., Tao, L., Dixon, S. J. and Wilson, J. X.** (1997). Cerebral astrocytes transport ascorbic acid and dehydroascorbic acid through distinct mechanisms regulated by cyclic AMP. *J Neurochem* **68**, 2378-85.
- Slater, T. F., Cheeseman, K. H., Davies, M. J., Proudfoot, K. and Xin, W.** (1987). Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *Proc Nutr Soc* **46**, 1-12.
- Sobala, G. M., Pignatelli, B., Schorah, C. J., Bartsch, H., Sanderson, M., Dixon, M. F., Shires, S., King, R. F. and Axon, A. T.** (1991). Levels of nitrite, nitrate, N-nitroso compounds, ascorbic acid and total bile acids in gastric juice of patients with and without precancerous conditions of the stomach. *Carcinogenesis* **12**, 193-8.
- Sobala, G. M., Schorah, C. J., Sanderson, M., Dixon, M. F., Tompkins, D. S., Godwin, P. and Axon, A. T.** (1989). Ascorbic acid in the human stomach. *Gastroenterology* **97**, 357-63.
- Sokol, R. J., Devereaux, M., Khandwala, R. and O'Brien, K.** (1993). Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology* **17**, 869-81.
- Sokol, R. J., McKim, J. M., Jr., Goff, M. C., Ruyle, S. Z., Devereaux, M. W., Han, D., Packer, L. and Everson, G.** (1998). Vitamin E reduces oxidant injury to mitochondria and the hepatotoxicity of taurochenodeoxycholic acid in the rat. *Gastroenterology* **114**, 164-74.
- Sokol, R. J., Winklhofer-Roob, B. M., Devereaux, M. W. and McKim, J. M., Jr.** (1995). Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* **109**, 1249-56.
- Spielholz, C., Golde, D. W., Houghton, A. N., Nualart, F. and Vera, J. C.** (1997). Increased facilitated transport of dehydroascorbic acid without changes in sodium-dependent ascorbate transport in human melanoma cells. *Cancer Res* **57**, 2529-37.
- St-Pierre, M. V., Stallmach, T., Freimoser Grundschober, A., Dufour, J. F., Serrano, M. A., Marin, J. J., Sugiyama, Y. and Meier, P. J.** (2004). Temporal expression profiles of organic anion transport proteins in placenta and fetal liver of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1505-16.
- Steiling, H., Longet, K., Moodycliffe, A., Mansourian, R., Bertschy, E., Smola, H., Mauch, C. and Williamson, G.** (2007). Sodium-dependent vitamin C transporter isoforms in skin: Distribution, kinetics, and effect of UVB-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **43**, 752-62.
- Sternlieb, I. and Quintana, N.** (1985). Biliary proteins and ductular ultrastructure. *Hepatology* **5**, 139-43.
- Stieger, B., O'Neill, B. and Meier, P. J.** (1992). ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles. *Biochem J* **284 (Pt 1)**, 67-74.
- Stolz, A., Rahimi-Kiani, M., Ameis, D., Chan, E., Ronk, M. and Shively, J. E.** (1991). Molecular structure of rat hepatic 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. A member of the oxidoreductase gene family. *J Biol Chem* **266**, 15253-7.
- Stolz, A., Takikawa, H., Ookhtens, M. and Kaplowitz, N.** (1989). The role of cytoplasmic proteins in hepatic bile acid transport. *Annu Rev Physiol* **51**, 161-76.
- Stratakis, C. A., Taymans, S. E., Daruwala, R., Song, J. and Levine, M.** (2000). Mapping of the human genes (SLC23A2 and SLC23A1) coding for vitamin C transporters 1 and 2 (SVCT1 and SVCT2) to 5q23 and 20p12, respectively. *J Med Genet* **37**, E20.

- Strazzabosco, M., Fabris, L. and Spirli, C.** (2005). Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol* **39**, S90-S102.
- Subramanian, V. S., Marchant, J. S., Reidling, J. C. and Said, H. M.** (2008). N-Glycosylation is required for Na⁺-dependent vitamin C transporter functionality. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 123-7.
- Suh, J. H., Shigeno, E. T., Morrow, J. D., Cox, B., Rocha, A. E., Frei, B. and Hagen, T. M.** (2001). Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)-(α)-lipoic acid. *FASEB J* **15**, 700-6.
- Takanaga, H., Mackenzie, B. and Hediger, M. A.** (2004). Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Pflugers Arch* **447**, 677-82.
- Talalay, P.** (1960). Enzymic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem Anal* **8**, 119-43.
- Tavoloni, N.** (1987). The intrahepatic biliary epithelium: an area of growing interest in hepatology. *Semin Liver Dis* **7**, 280-92.
- Taylor, A., Jacques, P. F., Nadler, D., Morrow, F., Sulsky, S. I. and Shepard, D.** (1991). Relationship in humans between ascorbic acid consumption and levels of total and reduced ascorbic acid in lens, aqueous humor, and plasma. *Curr Eye Res* **10**, 751-9.
- Teepe, A. G., Beck, D. J. and Li, A. P.** (1992). Comparison of rat liver parenchymal and nonparenchymal cells in the activation of promutagens. *Environ.Mol.Mutagen.* **20**, 134-139.
- Torbenson, M., Chen, Y. Y., Brunt, E., Cummings, O. W., Gottfried, M., Jakate, S., Liu, Y. C., Yeh, M. M. and Ferrell, L.** (2006). Glycogenic hepatopathy: an underrecognized hepatic complication of diabetes mellitus. *Am J Surg Pathol* **30**, 508-13.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145-149.
- Trout, D. L.** (1991). Vitamin C and cardiovascular risk factors. *Am J Clin Nutr* **53**, 322S-325S.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U. V., Chen, X. Z., Wang, Y., Brubaker, R. F. and Hediger, M. A.** (1999). A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* **399**, 70-5.
- Unger, R. H. and Orci, L.** (2000). Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 4**, S28-32.
- Van Berkel, T. J., De Rijke, Y. B. and Kruijt, J. K.** (1991). Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem* **266**, 2282-9.
- van der Loo, B., Bachschmid, M., Spitzer, V., Brey, L., Ullrich, V. and Luscher, T. F.** (2003). Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in a rat model of aging: implications for antioxidative defense. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 483-7.
- Varma, S. D.** (1987). Ascorbic acid and the eye with special reference to the lens. *Ann N Y Acad Sci* **498**, 280-306.
- Venkatakrishnan, K., von Moltke, L. L. and Greenblatt, D. J.** (2001). Application of the relative activity factor approach in scaling from heterologously expressed cytochromes p450 to human liver microsomes: studies on amitriptyline as a model substrate. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 326-37.
- Vera, J. C., Rivas, C. I., Zhang, R. H. and Golde, D. W.** (1998). Colony-stimulating factors signal for increased transport of vitamin C in human host defense cells. *Blood* **91**, 2536-46.
- Vojtesek, B., Staskova, Z., Nenutil, R., Bartkova, J., Kovarik, J., Rejthar, A. and Bartek, J.** (1990). A panel of monoclonal antibodies to keratin no. 7: characterization and value in tumor diagnosis. *Neoplasma* **37**, 333-42.
- von Kupffer, C.** (1876). Ueber Sternzellen der Leber. *Arch mikr Anat* **12**, 353-358.

- Wang, H., Dutta, B., Huang, W., Devoe, L. D., Leibach, F. H., Ganapathy, V. and Prasad, P. D.** (1999). Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 1-9.
- Wang, Y., Mackenzie, B., Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C. and Hediger, M. A.** (2000). Human vitamin C (L-ascorbic acid) transporter SVCT1. *Biochem Biophys Res Commun* **267**, 488-94.
- Watanabe, N., Tsukada, N., Smith, C. R. and Phillips, M. J.** (1991). Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J. Cell Biol.* **113**, 1069-1080.
- Weber, C., Erl, W., Weber, K. and Weber, P. C.** (1996). Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* **93**, 1488-92.
- Whitaker, M. J.** (1985). Reversing heart disease. New York: Warners Books.
- Wilson, J. X.** (2005). Regulation of vitamin C transport. *Annu Rev Nutr* **25**, 105-25.
- Will, J. C. and Byers, T.** (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nutr Rev* **54**, 193-202.
- Wu, X., Itoh, N., Taniguchi, T., Hirano, J., Nakanishi, T. and Tanaka, K.** (2004). Stimulation of differentiation in sodium-dependent vitamin C transporter 2 overexpressing MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 1159-64.
- Wu, X., Itoh, N., Taniguchi, T., Nakanishi, T. and Tanaka, K.** (2003a). Requirement of calcium and phosphate ions in expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* **1641**, 65-70.
- Wu, X., Itoh, N., Taniguchi, T., Nakanishi, T., Tatsu, Y., Yumoto, N. and Tanaka, K.** (2003b). Zinc-induced sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression: potent roles in osteoblast differentiation. *Arch Biochem Biophys* **420**, 114-20.
- Xia, X., Francis, H., Glaser, S., Alpini, G. and LeSage, G.** (2006). Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* **12**, 3553-63.
- Xu, D. P. and Wells, W. W.** (1996). alpha-Lipoic acid dependent regeneration of ascorbic acid from dehydroascorbic acid in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **28**, 77-85.
- Xu, H., Korneszczuk, K., Karaa, A., Lin, T., Clemens, M. G. and Zhang, J. X.** (2005). Thromboxane A2 from Kupffer cells contributes to the hyperresponsiveness of hepatic portal circulation to endothelin-1 in endotoxemic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G277-83.
- Yang, S. Q., Lin, H. Z., Lane, M. D., Clemens, M. and Diehl, A. M.** (1997). Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2557-62.
- Yue, D. K., McLennan, S., Fisher, E., Heffernan, S., Capogreco, C., Ross, G. R. and Turtle, J. R.** (1989). Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes. *Diabetes* **38**, 257-61.