



**“Efecto protector del HGF ante el daño hepático inducido por la isoniazida y la
rifampicina”**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Biol. Exp. Gloria Cristina Enríquez Cortina

**Director de tesis:
Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

**Asesores
Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz
Dr. Rogelio Hernández Pando**

Director de tesis: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
México, D.F
legq@xanum.uam.mx

Asesora interna: Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz

Departamento de Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
México, D.F
mcgr@xanum.uam.mx

Asesor Externo: Dr. Rogelio Hernández Pando

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Sección de Patología Experimental del Departamento de Patología
México, D.F
rhdezpando@hotmail.com

Dedicatorias

A Christopher

A mis padres Gloria Cortina Herrera y Francisco Enríquez Lizaola, por todo su esfuerzo para hacer de mí una mejor persona cada día; por no rendirse y no dejarme caer; por siempre formar esa unidad en la que he encontrado el equilibrio.

A mi hermana, Angélica , por estar a mi lado, por nuestra amistad de años, por los buenos y mejores ratos compartidos, por ser ejemplo para mí y por haberme dado la alegría de conocer a David Francisco, mi sobrino querido.

A mi nueva familia; a Kurtis Cox por su inagotable cariño, dedicación y apoyo; a mi pequeño Ronnie, por ser mi compañía, el motor para concluir esta etapa de mi vida y por inspirarme a seguir mi formación con más compromiso y entrega.

Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, por ser mi maestro y mí amigo; por ver en mí la capacidad para lograr esta meta; por los buenos consejos, por ser estricto y por compartir conmigo su pasión por la ciencia; por todo el conocimiento heredado y aprendido, ¡gracias!

A la Dra. Concepción Gutiérrez Ruiz, por su magnífica capacidad de coordinar y dirigir el laboratorio de Fisiología Celular, por buscar siempre nuevas oportunidades para todos los que formamos parte de este maravilloso equipo; por sus consejos y por todas las anécdotas compartidas.

A todo el equipo de trabajo; a Denise por ser confidente y mediadora, por su buen carácter, por mantenernos unidos; a Ileana por hacer el trabajo en el laboratorio más divertido, por ser mi amiga, por apoyarme en mis momentos más difíciles; a Karina por su dedicación y su amabilidad; a Marcela por todos los buenos momentos; a Mayra por que sin ella, el equipo c-Met no sería lo mismo; a Natalia, por su capacidad de organizar las actividades dentro y fuera del ambiente de trabajo, por que siempre ha estado presente en los momentos más importantes de esta etapa de mi vida; a mi amiga Maylin, por sus palabras de aliento, por enseñarme nuevas técnicas, por su paciencia, por que sin su apoyo, no hubiera podido terminar este proyecto.

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
EL HÍGADO, BIOTRANSFORMACIÓN DE TÓXICOS Y XENOBIÓTICO	3
1. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	4
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	4
1.2 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	4
2. TUBERCULOSIS	5
3. FARMACOS ANTIFÍMICOS.....	7
4. LA ISONIAZIDA	7
5. RIFAMPICINA	10
6. RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS	11
7. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR ISONIAZIDA Y RIFAMPICINA.....	12
7.1 ASPECTOS GENERALES	12
8. INCIDENCIA, PATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	12
8.1.1 INCIDENCIAS	13
8.1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	13
9. EL PROCESO DE DAÑO/REPARACIÓN HEPÁTICA Y EL HGF	14
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
MODELO DE HEPATOTOXICIDAD Y TRATAMIENTOS.....	18
DETERMINACIÓN DEL MARCADOR DE DAÑO HEPÁTICO ALT.....	19
OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO.....	19
INMUNOHISTOQUÍMICA	20
DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS POR LA TÉCNICA DE TUNEL	20

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	20
MICROSCOPIA CONFOCAL	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	40
REFERENCIAS	41

Resumen

El incremento en la resistencia a fármacos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* en las últimas décadas ha generado cuadros sintomáticos más graves, que requieren del incremento de las dosis de los fármacos convencionales para el tratamiento, elevando el riesgo de toxicidad particularmente a nivel hepático. Uno de los principales sistemas de protección y reparación hepática, es factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), que a través de su receptor c-Met dirige procesos de proliferación, sobrevivencia y el control o defensa ante el estrés oxidante, que representa la principal causa de daño durante el tratamiento contra la tuberculosis. El presente trabajo se enfocó en estudiar el efecto protector del HGF en un modelo experimental de hepatotoxicidad inducido por rifampicina e isoniazida, empleando ratones a los que se les administró durante 7 días, una dosis de rifampicina e isoniazida (vía oral) de 150 y 75 mg/kg respectivamente en combinación o no con 10 mg/kg de HGF recombinante o 5 ng/kg de un anticuerpo anti-HGF (vía intravenosa por la vena de la cola). Una vez concluido el tratamiento, los animales fueron pesados y sacrificados; se colectó sangre para cuantificación de los niveles de la transaminasa sérica de alanina (ALT), como marcador de daño hepático y tejido hepático para diversas determinaciones histológicas con tinciones rutinarias de hematoxilina y eosina y bioquímicas, así como un registro fotográfico para determinar los cambios macroscópicos del órgano. También se determinó la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) *in situ*, utilizando diclorofluoresceína y dihidroetidio, así como apoptosis por inmunofluorescencia mediante la detección de caspasa 3 activa y TUNEL. Finalmente utilizando la técnica Western blot se analizaron las rutas de señalización asociadas a la sobrevivencia y la reparación tisular como son Erk, PKC y enzimas

antioxidantes. Los resultados mostraron que la administración del HGF exógeno indujo una disminución en los niveles de ALT, así como

también disminuyó las ROS que incrementaron significativamente por el tratamiento farmacológico en los ratones, disminuyendo también la apoptosis, lo que demuestra que el HGF previno de manera significativa el daño oxidante inducido por la combinación de los dos fármacos. Utilizando un anticuerpo específico anti-HGF, Se evaluó la participación del HGF en presencia de los fármacos y se encontró que los niveles de las ROS se exacerbaban significativamente con respecto al tratamiento solo con fármacos, de la misma forma se encontraron cambios histológicos que evidenciaron el papel central del HGF en la protección contra la toxicidad inducida por la rifampicina y la isoniazida. El análisis mecanístico arrojó que la protección inducida por el factor de crecimiento puede estar mediado por la activación de las rutas de señalización de Erk y de PKC delta. En conclusión los resultados posicionan al HGF como un punto de control terapéutico tendiente disminuir de manera importante los efectos hepatotóxicos de los fármacos antifímicos abriendo una ventana de posibilidades para la posible elevación de dosis terapéuticas a las que puedan ser sensibles las cepas drogorresistentes que están emergiendo en el mundo.

INTRODUCCIÓN

I EL HÍGADO, BIOTRANSFORMACIÓN DE TÓXICOS Y XENOBIÓTICOS.

El ser humano se encuentra cada día, expuesto a una gran variedad de agentes potencialmente tóxicos como, contaminantes ambientales, productos de consumo regular y fármacos. En el organismo existen diversos sistemas que se encargan de la detoxificación de estos xenobióticos, alojados en el riñón, en el intestino, pero principalmente en el hígado. Generalmente las reacciones químicas involucradas en la biotransformación de fármacos, generan compuestos secundarios solubles en agua, lo que facilita su excreción a través de la orina; sin embargo, algunas de estas reacciones dan como resultado intermediarios altamente reactivos que pueden inducen daño tisular (Parkinson A 2008). Esto, define a la capacidad detoxificante hepática como heterogénea, por lo que es necesario investigar los posibles efectos tóxicos de un xenobiótico, de manera particular.

El proceso de biotransformación de fármacos se divide en tres fases; la fase I comprende las reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación, la fase II esta relacionada a las reacciones de conjugación, y la fase III refiere a la fase de eliminación del hígado y del cuerpo en general, en esta ultima se ubica reacciones mediadas por sistemas enzimáticos ubicados particularmente en el canalículo biliar. Generalmente, el producto de la biotransformación de la fase I se vuelve el substrato de las reacciones de conjugación de la fase II, estas de las de fase III (Jaeschke and Bajt 2006).

La mayoría de las enzimas biotransformadoras de xenobióticos se encuentran presentes en el hepatocito, lo que los convierte el centro de detoxificación no sólo del hígado sino del organismo completo (Parkinson A 2008).

El CYP2E1 es una isoenzima perteneciente a la familia CYP450 , que está involucrada en la activación metabólica de varios compuestos que pueden ser potencialmente tóxicos, particularmente medicamentos, como el acetaminofén, el tetracloruro de carbono, el benceno, el cloroformo, el tricloroetileno y la dietilnitrosamina, entre otros; se expresa básicamente en los hepatocitos centrilobulares, convirtiendo sus substratos en intermediarios altamente reactivos, lo que puede generar necrosis.(Krishnamurthy 2011)

Se ha reportado que en algunas condiciones patológicas como la diabetes se pueden inducir la expresión y activación del CYP2E1, así como por el consumo crónico de alcohol o en los tratamientos con fármacos como la isoniazida, uno de los principales medicamentos que se utiliza en el tratamiento contra la tuberculosis.

1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS:

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1882, Robert Koch identificó al agente causante de la tuberculosis (TB). Los recursos para combatir esta enfermedad, que en el siglo XIX cobrara el 25% de las muertes en Estados Unidos y Europa, parecían estar fuera de alcance. Gracias a este descubrimiento, el médico alemán fue acreedor del premio Nobel en 1905; sin embargo no fue sino hasta 1944 que se documentó la recuperación total de un paciente con TB, al ser tratado con estreptomina, el primer agente antituberculoso o antifímico que logró la recuperación de más de un 90% de los casos documentados, sin embargo, se registró un número significativo de pacientes que presentó de nuevo el cuadro sintomático. Se realizaron cultivos con muestras de saliva de estos pacientes detectando cepas emergentes resistentes a la estreptomina (Keshavjee and Farmer)

1.1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A diferencia de la mayoría de las bacterias Gram-positivas, la composición de la pared celular de *M. tuberculosis* es única, ya que está compuesta de ácidos micólicos que forman una membrana cerosa y gruesa alrededor de la bacteria, confiriéndole protección ante la desecación por largos periodos de tiempo, así como de la entrada de fármacos, debido a la disminución de la permeabilidad celular, lo que obliga un tratamiento costoso y de larga duración (Barry, Lee et al. 1998) . En resumen, la peculiar conformación de la pared celular más la habilidad de este bacilo para catabolizar los ácidos grasos, son adaptaciones indispensables para el éxito de esta bacteria al infectar a su hospedero.

Las cepas patogénicas de *Mycobacterium* sobreviven dentro de los macrófagos de sus hospederos, lo que contrasta con el conocimiento general de que estas células son la principal barrera efectiva para detener las infecciones bacterianas. La infección se establece mediante la unión de varios receptores fagocíticos, a través de los cuales *Mycobacterium* es retenido en una vacuola hasta que la célula hospedera muere por necrosis o apoptosis. La estrategia de *M. tuberculosis* para evitar ser reconocida por la maquinaria fagocítica, radica en su inaccesibilidad para los acarreadores lisosomales, lo que confiere un fenotipo no fusionable que se relaciona directamente con la susceptibilidad y viabilidad de los organismos infectados (Russell 2001).

2. TUBERCULOSIS

La vía de transmisión de la TB es vía aérea, cuando se inhalan gotas de entre 2-5 μm de diámetro, que contienen de 1-3 bacilos, lo que facilita su dispersión y ha mantenido los niveles de contagio fuera de todo control, a pesar de medio siglo de quimioterapia antituberculosa. El panorama de esta epidemia se dificulta aún más dado que al menos un tercio de la población mundial es portadora de una forma inactiva o latente de *M.*

tuberculosis, lo que se traduce en un riesgo de por vida, de la reactivación de la enfermedad. La reactivación de la tuberculosis latente, incluso después de décadas de persistencia subclínica, representa un factor de riesgo sumamente elevado, de desarrollar la enfermedad, particularmente para personas con el sistema inmune comprometido, como los portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), pacientes en terapia con el factor de necrosis antitumoral o pacientes con padecimientos crónicos, como la diabetes. (Koul, Arnoult et al.)

A pesar de todo el conocimiento actual sobre la infección, transmisión y estrategias de sobrevivencia que se tienen de *M. tuberculosis*, la creación de nuevos fármacos y los esfuerzos internacionales para dar seguimiento al tratamiento de los casos existentes para evitar nuevos contagios, no ha podido con la tarea de reducir el número de infecciones nuevas registradas los últimos años (Deretic, Vergne et al. 2004).

En el 2011 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 9.8 millones de casos nuevos, de los cuales el 80% se presentan en países con economías débiles, como México; siendo éste, el año con más casos en la historia de la humanidad. La incidencia mundial de TB *per capita* es del 1%, además de que el incremento de la población mundial, es del 2% anual, por lo que a pesar de que la tasa de incidencia parece disminuir, los nuevos casos de la enfermedad van en aumento. (Dye and Williams)

En los últimos años, la presencia clínica de la TB disminuyó, ya que debido al surgimiento de nuevas cepas farmacorresistentes que pueden mantenerse en estado de latencia durante un largo periodo de tiempo sin presentar síntomas de la enfermedad; además una vez que estas cepas son detectadas, se tratan con los mismos fármacos que fueron creados hace ya varias décadas, como es el caso de la RMP, el último fármaco disponible, creado en 1963, que posee un nuevo mecanismo de acción contra la enfermedad. (Koul, Arnoult et al.)

3. FÁRMACOS ANTIFÍMICOS

Los fármacos más utilizados para el tratamiento contra la TB son la INH y la RMP, sin embargo, en combinación y dado la duración del tratamiento, estos xenobióticos pueden causar daño hepático severo. La posibilidad de desarrollar hepatotoxicidad inducida por las INH y RMP, depende tanto de factores genéticos como adquiridos, sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos celulares y bioquímicos que llevan al desarrollo de este padecimiento. (Chowdhury, Santra et al. 2006)

4. LA ISONIAZIDA

La INH es un fármaco que requiere activarse antes de ser efectivo terapéuticamente, este proceso es mediado por la catalasa-peroxidasa, producto del gen *katG*; mutaciones en este gen, están estrechamente relacionadas con la resistencia a la INH. Una vez activa, la INH tiene varios posibles blancos en la pared celular del bacilo, como la proteína acarreadora de acilos (ACP) enoil reductasa (InhA), β -cetoacil ACP sintetasa (KasA), mediante la unión covalente con el NAD^+ , y/o evitando la síntesis del ácido micólico. (Sandy, Holton et al. 2005)

La ruta metabólica principal para la biotransformación de la isoniazida es la acetilación mediante la enzima hepática N-acetiltransferasa 2 (NAT2). (Tostmann, Boeree et al. 2008)

La INH es acetilada produciendo acetil isoniazida y luego, hidrolizada en acetil hidracina y ácido isonicotínico. La acetilhidracina principalmente es hidrolizada en hidracina o acetilada para la formación de diacetilhidracina, sin embargo una pequeña cantidad de INH es hidrolizada directamente formando ácido isonicotínico e hidracina (Figura 1); esta vía de biotransformación alterna, es de vital importancia, dado que, la incidencia de hepatitis inducida por fármacos antifímicos, es mayor en aquellos individuos que

presentan un genotipo de acetilación lento. Varios estudios sugieren que tanto la acetilhidracina como la hidracina son los productos intermediarios causantes de la toxicidad inducida por este fármaco antituberculoso. La toxicidad de la hidracina, como un agente causante de daño hepatocelular, fue descrita desde 1908.(Keshavjee and Farmer)

La oxidación es la ruta principal para la biotransformación de la hidracina. Los posibles intermediarios de esta biotransformación pueden ser el nitrógeno y la diacina, un potente agente reductor. Estudios realizados en microsomas de hígado de rata señalan a los radicales de nitrógeno y oxígeno formados durante la biotransformación de la hidracina, como parte fundamental de la etiología de la hepatotoxicidad. (Walubo, Smith et al. 1998; Tostmann, Boeree et al. 2008)

La toxicidad inducida por la biotransformación de la isoniazida también está relacionada con el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) cuando a partir de acetilhidracina se genera hidracina (Figura 1.)

Los citocromos P450 (CYPs) son las principales isoenzimas monooxigenasas, encargadas de la fase I en la biotransformación de xenobióticos. La expresión y actividad de los CYPs difiere dependiendo de los polimorfismos encontrados en cada población, de los inductores a los que se exponga el organismo (ej., etanol, pentobarbital, rifampicina) o de la inhibición por fármacos específicos, lo que resulta en mayor variabilidad metabólica. Por lo anterior, el CYP2E1 es una de las enzimas más importante en la activación de intermediarios procarcinógenos y hepatotóxicos como la hidracina (Huang, Chern et al. 2003).

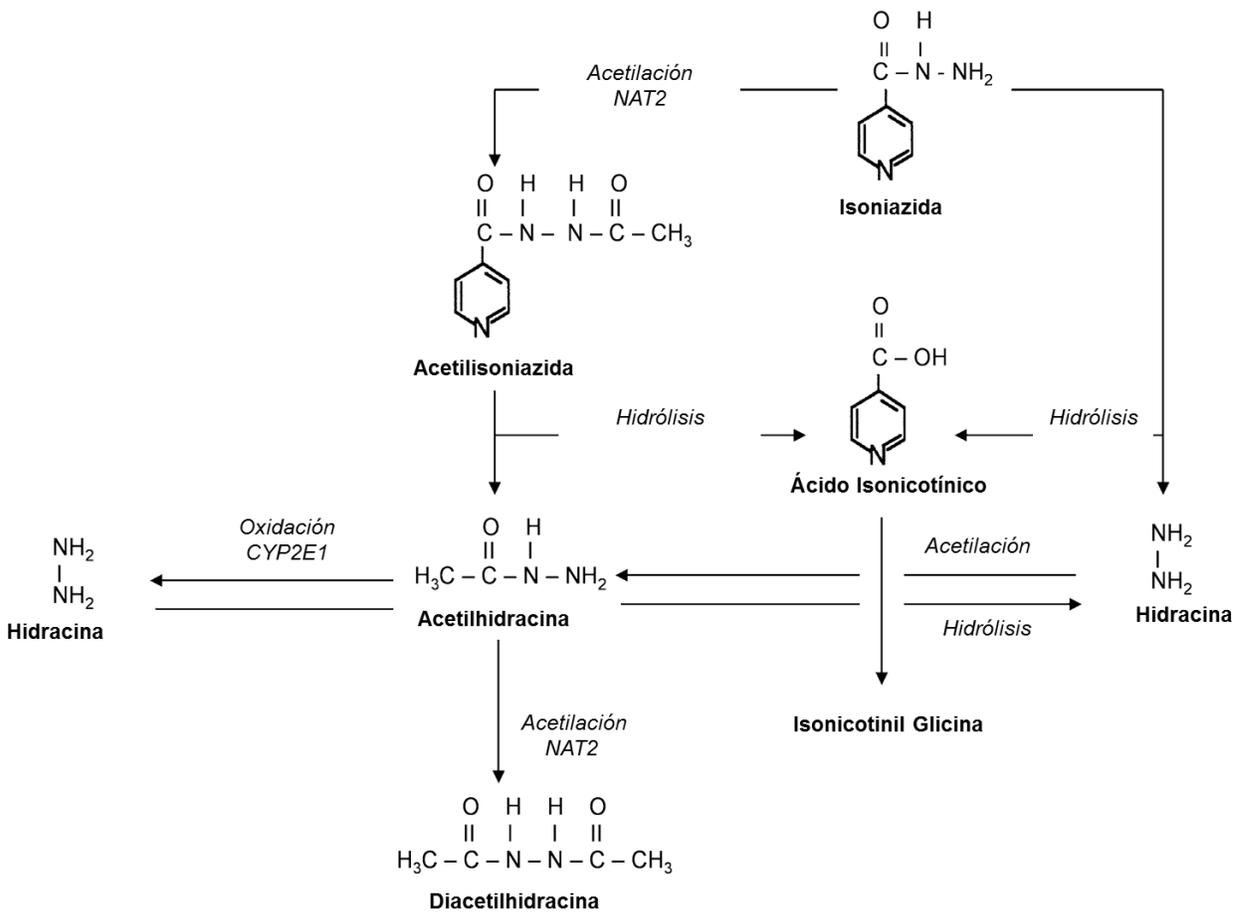


Figura 1. Biotransformación de la isoniazida

Por lo anterior podemos concluir que el análisis genético y bioquímico del CYP2E1 acompañado por experimentos de inducción *in vitro* e *in vivo* puede develar información crucial para nuestro entendimiento del metabolismo de xenobióticos y su efecto hepatotóxico (Tomdo de Nalu Navarro-Alvarez and Kobayashi 2010)

5. RIFAMPICINA

La RMP es un derivado semisintético de las rifamicinas, con un espectro antibacterial extenso, que requiere de concentraciones relativamente bajas (0.01 $\mu\text{g/ml}$) en el tratamiento contra micobacterias y microorganismos Gram-positivos. El blanco terapéutico de este fármaco es la enzima ARN polimerasa, enzima que cataliza la reacción de transcripción de ADN en ARN. La RMP interactúa directamente con la ARN polimerasa bacteriana sin interferir con la actividad de su homóloga en mamíferos. (Wherli 1983).

La biotransformación de la RMP se lleva a cabo mediante la desacetilación en desacetilrifampicina, e hidrólisis que produce independientemente 3-formilrifampicina. Este xenobiótico puede inducir disfunción hepatocelular al inicio del tratamiento, lo que se resuelve suspendiendo el tratamiento, sin embargo, esto representa un riesgo de recaída en los pacientes y el surgimiento de cepas resistentes al fármaco. El mecanismo mediante el cual la RMP causa toxicidad se desconoce, debido a que no hay evidencia de la participación de algún producto tóxico secundario. La RMP, como anteriormente se había mencionado, es un potente inductor de los CYP450 en el hígado y en el intestino, por lo que se incrementa la biotransformación de muchos otros compuestos. El uso combinado de la RMP y la INH ha sido señalado como un factor de alto riesgo para desarrollar hepatotoxicidad. La RMP induce a la hidrolasa de la INH, incrementando potencialmente la producción de hidracina, lo que puede explicar la alta toxicidad de la combinación de estos dos fármacos. (Parkinson A 2008)

La rifampicina también interactúa con drogas anti-retrovirales, lo que afecta los niveles de estos fármacos en el torrente sanguíneo, incrementando también, el riesgo de desarrollar hepatotoxicidad. (Tostmann, van den Boogaard et al. ; Tostmann, Boeree et al. 2008)

6. RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS

Reportes recientes de la OMS señalan que la resistencia a múltiples fármacos o multidrogrresistencia (MDR) representa un problema crucial en todas las regiones donde prevalece la TB, como un problema de salud pública.(Jaramillo 2007) En México, las estrategias de control, incluyendo la detección de la bacteria por microscopía en muestras de saliva, así como los tratamientos estandarizados, se administran sin ninguna prueba previa de sensibilidad a fármacos. Aunque este enfoque es efectivo para las cepas que son fármaco-sensibles e incluso las resistentes al fármaco, no detecta ni erradica a las cepas MDR que comprenden un 40% de las infecciones reportadas en nuestro país. El conocimiento adquirido sobre la dinámica de poblaciones de la resistencia a fármacos antifímicos indica que, la prevalencia de las cepas MDR es una clave determinante para el futuro no solo de *M. tuberculosis*, sino los patógenos en general. (Cohen and Murray 2004; Loughheed, Taylor et al. 2009)

Aquellos pacientes que están infectados con bacilos, requieren de tratamientos más largos, tóxicos y de alto costo (Zignol, van Gemert et al.). Esto representa un reto para la creación de nuevos fármacos que representen menos riesgos de desarrollar hepatotoxicidad, siendo administrados por corto tiempo y/o el cotratamiento con de estos los fármacos actuales con compuestos que prevengan el desarrollo de la hepatotoxicidad para que estos puedan ser administrados el tiempo que sea necesario para eliminar a las bacterias en estado latente. (Sacksteder, Protopopova et al.)

7. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR ISONIAZIDA Y RIFAMPICINA

7.1. ASPECTOS GENERALES

El tratamiento estandarizado para un adulto infectado con TB respiratoria es la administración de INH y RMP por un periodo de 2 meses, seguido por cuatro meses de administración INH únicamente; el etambutanol, en algunos casos, es adicionado a este tratamiento y la OMS sugiere la estreptomicina para pacientes con recaídas.(Koul, Arnoult et al.)

Los efectos adversos más comunes del tratamiento con fármacos antifímicos son hepatotoxicidad, reacciones en la piel, así como desórdenes gastrointestinales y neurológicos. La hepatotoxicidad es el más grave, ya que genera altas tasas de morbilidad y mortalidad, así como disminuye el éxito del tratamiento.(Yew and Leung 2007)

El incremento asintomático de las transaminasas, es común durante el tratamiento contra la TB pero la hepatotoxicidad puede ser fatal cuando no se detecta a tiempo y/o el tratamiento no se suspende. Los efectos secundarios, además de disminuir el éxito del tratamiento, contribuyen a una posible recaída y el surgimiento de cepas MDR. (Sharma, Singla et al.)

8. INCIDENCIA, PATOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

En la literatura, se pueden encontrar varias definiciones para la hepatotoxicidad inducida por fármacos, sin embargo su identificación es muy difícil así como por consecuencia es el diagnóstico. Existen también diferentes métodos para determinar las causales del efecto tóxico de los fármacos, tales como, la cronología de administración, pruebas de respuesta y readministración del fármaco o pruebas histológicas (ya sea que se determinen por la toma de biopsia o en la de autopsia del paciente). (Velayati, Masjedi et al. 2009)

La definición más utilizada para esta patología es el incremento de la alanina aminotransferasa (ALT) siempre que se encuentre tres o hasta cinco veces por arriba de los valores normales. (Sharma 2004)

8.1.1. INCIDENCIA

La incidencia de la hepatotoxicidad inducida por fármacos antifímicos ha sido reportada entre el 2% hasta el 28%. Estos valores dependen de los investigadores, la definición de hepatotoxicidad que se tome por correcta y de, la población estudiada. Dado que el tratamiento contra la TB incluye el cotratamiento con varios fármacos, es difícil atribuir la toxicidad a uno sólo de ellos. Sin embargo, estudios realizados utilizando monoterapia, muestran una incidencia del 0.5% para la INH y del 2% para la RMP.(Yew and Leung 2007; Tostmann, Boeree et al. 2008)

8.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las reacciones hepáticas en respuesta a fármacos antifímicos, aparecen generalmente en los primeros dos meses de su administración, sin embargo, pueden ocurrir en cualquier momento a lo largo del tratamiento. Las características clínicas, bioquímicas e histológicas de la hepatotoxicidad son muy difíciles de distinguir de la hepatitis viral. Los síntomas son variados y pueden presentarse con dolor en el hipocondrio derecho, emesis, y fatiga, por lo que es difícil de identificar, requiriendo estudios de laboratorio para hacer la confirmación del diagnóstico. (Leung, Law et al. 2003)

9. EL PROCESO DE DAÑO/REPARACIÓN HEPÁTICA Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS (HGF)

Los procesos de daño-reparación son coordinados por factores de crecimiento, particularmente para el hígado, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La regeneración y reparación hepática son procesos complejos que involucran a todos los tipos celulares que conforman el parénquima hepático dentro del hígado cuyo éxito depende de la interacción de varias vías reguladoras. Cuando el hígado censa daño, los niveles de HGF en sangre incrementan para contrarrestarlo, sin embargo cuando éste persiste, las medidas de defensa son superadas y eventualmente, este estado de homeostasis alterada, deriva en fallas funcionales del órgano (Trusolino, Bertotti et al. 2010). Entre las entidades más frecuentes y tóxicas para el hígado se encuentran las ROS las cuales pueden ser producidas por infecciones virales, por el procesamiento metabólico o de biotransformación enzimática de xenobióticos, el uso de drogas ilegales y el consumo de alcohol, entre otros; de no ser estabilizadas o eliminadas, estas ROS pueden causar eventualmente, daño hepatocelular. (Valko, Leibfritz et al. 2007)

El HGF y su receptor c-Met le confieren al hígado, particularmente, la regulación del sistema celular antioxidante, mediante el incremento el glutatión (GSH), el aumento en los niveles de expresión de enzimas antioxidantes, como la catalasa o la gama-glutamylcisteina sintetasa (γ -GCS), mediante un mecanismo dirigido por factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) o Nrf2. (Valdes-Arzate, Luna et al. 2009)

Investigación reciente de nuestro grupo muestran que el HGF es capaz de inducir la activación del factor de transcripción Nrf2 quien dirige la expresión de varios genes de regulación del estado redox y de detoxificación como la NADPH quinona oxidoreductasa, la glutatión (GSH) transferasa (GST), la γ -GCS, entre otras. (Klaassen and Reisman 2010)

Bajo condiciones homeostáticas Nrf2 se encuentra asociado a su represor citosólico Keap1, este complejo actúa como sensor de cambios en el estado redox celular, por lo que, al presentarse condiciones oxidantes, Keap1 libera a Nrf2, permitiendo que se transloque al núcleo e inicie la transcripción de proteínas de fase II y III y enzimas antioxidantes.

Como se ha mencionado el hígado es el principal órgano implicado en la biotransformación de cualquier fármaco, por lo que es más vulnerable a la toxicidad inducida por ellos. Los medicamentos son responsables del 40 al 50% de los casos de lesión hepática que requieren evaluación por el servicio de hepatología, y del 25 al 30% de los casos de hepatitis fulminante, lo cual hace imperante la investigación en términos de hepatoprotección. (Takami, Kaposi-Novak et al. 2007)

JUSTIFICACIÓN

La infección por *M. tuberculosis* es, cada día más, un problema serio con fuertes repercusiones a mediano y largo plazo, afectando aproximadamente a un tercio de la población mundial; en el 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó, que anualmente en el mundo, se aplican 9 millones de tratamientos contra la TB. Esta enfermedad es responsable de dos millones de muertes por año, número que prevalece dada la aparición de cepas resistentes a la terapia antituberculosa. Esto implica, en la clínica, administración más prolongada de uno o varios o el incremento de la dosis, lo que genera consecuentemente, el aumento en la incidencia de reacciones adversas, principalmente a nivel hepático. La infección por *M. tuberculosis* es una condición especial por las características del patógeno tales como: crecimiento lento, pared celular resistente, localización tanto extracelular como intracelular y múltiples mecanismos de resistencia; por esta razón se suministra siempre, un tratamiento combinado, que incluya como mínimo la administración diaria de dos medicamentos potencialmente hepatotóxicos: la INH y la RMP, por un periodo de tiempo prolongado o intermitente durante varios meses, incrementando así la posibilidad de daño hepático (Idilman, Ersoz et al. 2006). Este daño se puede presentar como lesión de los hepatocitos, hepatitis aguda o crónica, esteatosis, colestasis, necrosis o incluso falla hepática fulminante. (Cillo, Bassanello et al. 2005; Idilman, Ersoz et al. 2006)

Actualmente se considera que la INH es el medicamento de primera línea en el tratamiento de la TB. Hasta la fecha se han propuesto diferentes mecanismos de toxicidad hepática secundaria a su administración; de ellos, el más aceptado es la producción de un metabolito tóxico, la acetilhidrazina, que actúa como agente acetilador, causando daño de las macromoléculas de los hepatocitos. El estrés oxidante es otro de los mecanismos por los

cuales se explica la toxicidad de éste fármaco. Además la ISO, junto con otros medicamentos antifímicos que producen daño hepatocelular, también ocasiona acumulación de grasa en el hígado, producen un aumento del calcio intracelular que a su vez activa la fosfolipasa A2, degradando fosfolípidos de la membrana.(Yee, Valiquette et al. 2003; Andrade, Camargo et al. 2004)

HIPÓTESIS

El HGF protegerá al hígado del daño oxidante generado por el tratamiento, por siete días, de la combinación de isoniazida y rifampicina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar y caracterizar la respuesta de protección inducida por el HGF en la hepatotoxicidad inducida por la isoniazida y la rifampicina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la hepatotoxicidad en ratones tratados con isoniacida (75 mg/kg) y rifampicina (150 mg/mg) por 7 días, por medio de la determinación de niveles séricos de ALT, así como por el análisis histológico del tejido hepático.
- 2.- Determinar la protección mediada por el HGF (exógeno y endógeno) a nivel hepático empleando estudios histológicos, séricos y bioquímicos de identificación de apoptosis y generación de especies reactivas de oxígeno.
- 3.- Caracterizar el mecanismo molecular de protección mediado por el HGF en el modelo experimental propuesto.

Material y Métodos.

El HGF recombinante fue obtenido de Peprotech de México, el anti-HGF se obtuvo de R&D systems (St Louis, MO, USA), los demás reactivos usados fueron de Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (México) salvo cuando se indique lo contrario.

MODELO DE HEPATOTOXICIDAD Y TRATAMIENTOS

Los animales de experimentación fueron obtenidos del bioterio de la UAM-I y durante el estudio fueron mantenidos de acuerdo a la norma oficial mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), así como por el manual del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana.

Se utilizaron 24 ratones machos de la cepa CD1, de ocho semanas de edad y se dividieron en 6 grupos de cuatro animales para recibir los distintos tratamientos, todos ellos aplicados cada 24 h durante 7 días. Durante el estudio los animales tuvieron libre acceso a alimento estándar balanceado para roedores (Purina 5001) y a agua. Se mantuvieron ciclos de luz/obscuridad, cada uno de 12 h.

Los tratamientos consistieron en la administración de 150 mg/kg de RMP en combinación de 75 mg/kg de INH vía intragástrica (ig), usando solución salina isotónica (SSI) como vehículo; HGF recombinante a una concentración de 10 mg/kg en SSI administrado por vía intravenosa (iv) en la vena de la cola; anti-HGF 5 ng/kg iv.

Los animales de experimentación fueron divididos y tratados en grupos, como se muestra en la Tabla 1.

Grupo	RMP+INH 150+75 mg/kg	HGF 10 mg/kg	anti-HGF 5 ng/kg	Vehículo SSI
A	*			*
B	*	*		*
C		*		*
D	*		*	*
E			*	*
F				*

Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales y tratamientos empleados a lo largo de siete días.

DETERMINACIÓN DEL MARCADOR DE DAÑO HEPÁTICO ALT.

La determinación de la alanina aminotransferasa (ALT) se realizó por métodos automatizados usando tiras reactivas Reflotron (Roche). La determinación se hizo por duplicado en al menos 4 animales de experimentación.

OBTENCIÓN Y PRESERVACIÓN DEL TEJIDO HEPÁTICO

Una vez transcurridos los 7 días de tratamiento, los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con 0.7ml de avertina. Se procedió a la obtención de tejido hepático el cual se dividió en tres partes, una sección de cada lóbulo se reservó para la inclusión en parafina, previa fijación con etanol, otra parte se guardó a -80 °C y finalmente otra sección se

embebió en medio para la obtención de secciones congeladas (Tissue Tek®) para la determinación de ROS *in situ*.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se utilizaron fragmentos hepáticos que fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 24 h. Después de la fijación los fragmentos hepáticos fueron preservados en sacarosa al 10% en PBS. Posteriormente los fragmentos hepáticos criopreservados y fueron cortados siguiendo el protocolo reportado para el uso del criostato (Leica CM 100; Heerbrugg Switzerland) con un grosor de 10 μm en laminillas previamente gelatinizadas (gelatina 0.5%; sulfato de potasio 0.05%); en agua bidestilada a 60°C y almacenadas a -20°C hasta su uso. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

La determinación de caspasa 3 activa se realizó por microscopía confocal usando anti-caspasa 3 activa (Cell Signaling) y anticuerpo secundario conjugado con Alexa fluor 568.

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS POR LA TÉCNICA DE TUNEL

Se utilizó un kit de detección de apoptosis por TUNEL (Promega DeadEnd fluorometric TUNEL system) siguiendo el protocolo del fabricante.

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La determinación *in situ* de especies reactivas de oxígeno se realizó en criocortes frescos de tejido hepático el cual fue incubado con 5 μM de 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH) o 50 μM de dihidroetidio (DHE). El DCFH es una sonda permeable a la célula que no es fluorescente y que al ser oxidada por los peróxidos emite fluorescencia en verde en los 520 nm de longitud de onda. El anión superóxido fue determinado con la sonda permeable DHE el cual al ser oxidada por el anión superóxido emite fluorescencia a los 560 nm.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Todas las imágenes de fluorescencias se obtuvieron en un microscopio confocal multifotónico Carl Zeiss LSM 780. Las imágenes fueron tomadas en todos los casos con los mismos parámetros de apertura del pinhole (1 AU). La excitación se hizo con el laserintonable Camaleón para preservar al máximo la integridad del tejido y no generar falsos positivos particularmente en la oxidación de las sodas fluorescentes DCFH y DHE.

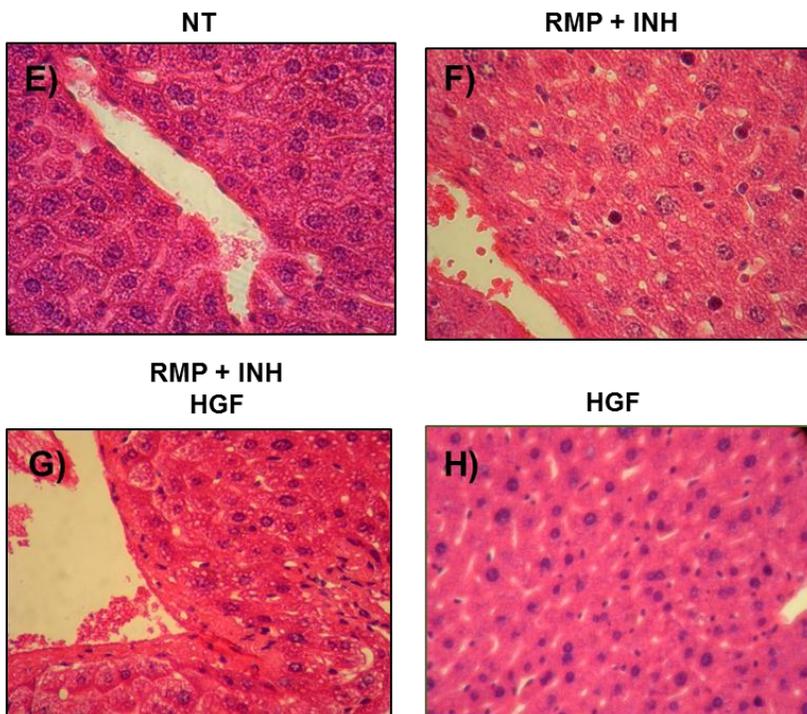
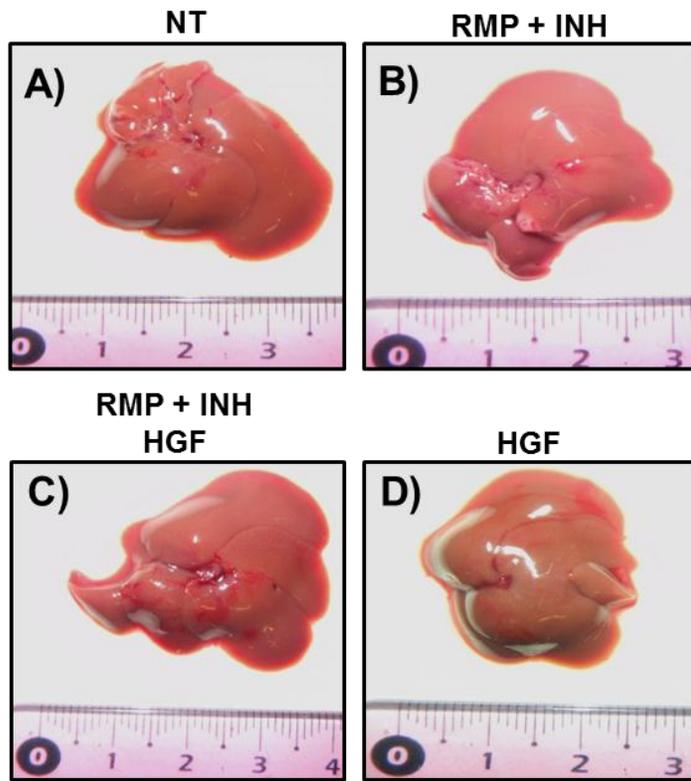
Análisis Estadístico

Cada experimento se realizó por duplicado con tejido de al menos 4 animales de experimentación. Los datos fueron reportados como el promedio \pm error estándar (EE). Para la comparación de promedios de los diferentes grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), seguido de comparaciones múltiples por la prueba de Tukey. Se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.0. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

Resultados

El estudio se inicio con un análisis macroscópico del estado que guarda el hígado de los animales sometidos a los fármacos y al HGF exógeno. La figura 1B muestra una foto representativa del aspecto del hígado en los animales que recibieron solo la combinación de fármacos por una semana, se puede notar un color pálido característico de un hígado con esteatosis en comparación con la figura 1C que se observa un color más cercano al animal control (figura 1A). El análisis histológico por hematoxilina y eosina en el tejido proveniente de los animales con los fármacos muestra una esteatosis microvesicular leve y condensación nuclear característica de las células en apoptosis (figura 1F) en comparación con el tejido de animales no tratados (figura 1E) y con pretratamiento de HGF (figura 1G) donde se observa un tejido prácticamente normal y sin evidencia importante de esteatosis.

La esteatosis observada al ser leve no repercutió en el cociente del peso del hígado con el peso total del animal (figura 1I), sin embargo al analizar los niveles séricos de la ALT un marcador bien aceptado de daño hepático, se puede observar que los animales tratados con los fármacos incrementaron significativamente los niveles de ALT mientras que el tratamiento con HGF evitó dicho aumento dejando los niveles de ALT en valores de los animales no tratados (figura 1J).



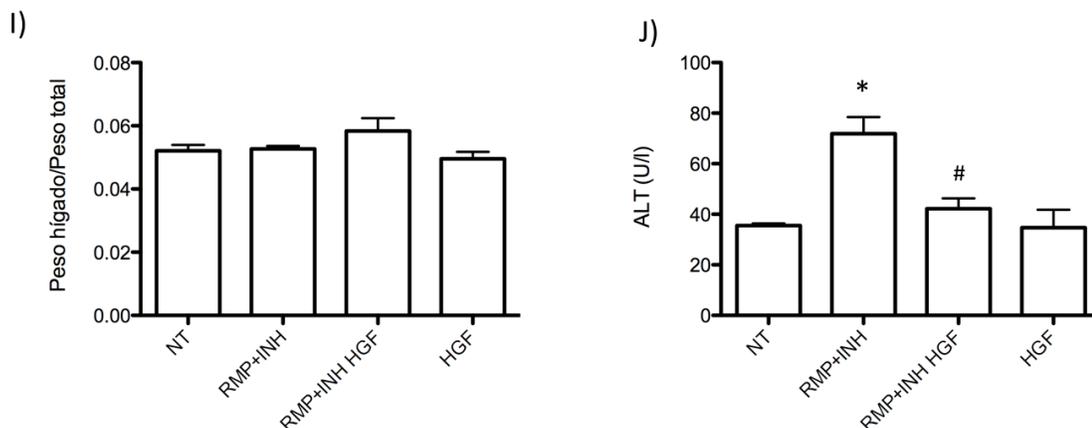
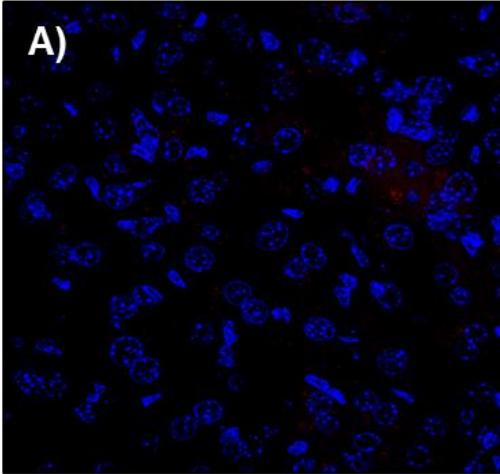


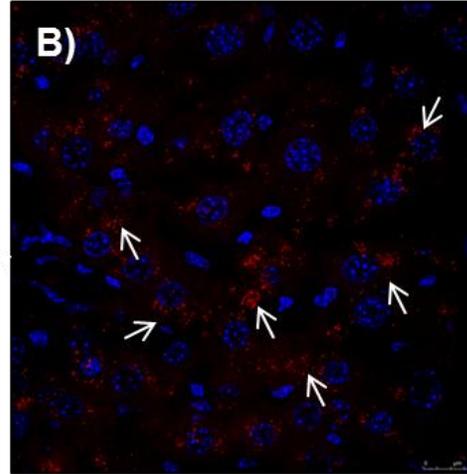
Figura 1. Inspección macroscópica, histológica y de daño del hígado. Aspecto del hígado y del tejido hepático de animales no tratados A) y E); tratados con rifampicina e Isoniazida B) y F); tratados con HGF y la combinación de los dos fármacos C) y G); y tratados solo con HGF D) y H). Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación. I) cociente de peso del hígado y total del animal de experimentación; J) Valores séricos de alanina amino transferasa (ALT). Las barras representan el promedio \pm EE de al menos 4 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $p \leq 0.05$ con respecto al no tratado (NT), # $p \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con rifampicina (RMP) e Isoniazida (INH).

Con la finalidad de corroborar que los fármacos inducen muerte celular particularmente por la inducción de apoptosis se prepararon secciones congeladas de tejido hepático obtenido de los grupos de experimentación y se sometieron a una inmunofluorescencia y detección por microscopía confocal de la caspasa 3 activa, la figura 2B muestra señal positiva en los tejidos provenientes de los animales sometidos a tratamiento con los fármacos, el HGF redujo significativamente la presencia de caspasa 3 activa como se evidencia en la figura 2C. Con la finalidad de corroborar la apoptosis realizamos un ensayo de TUNEL evaluando también por microscopía confocal, la figura 2F muestra que los fármacos incrementan la apoptosis y que el HGF previene la muerte celular (figura 2G), la figura 2I muestra un control positivo con fines de validación de la técnica.

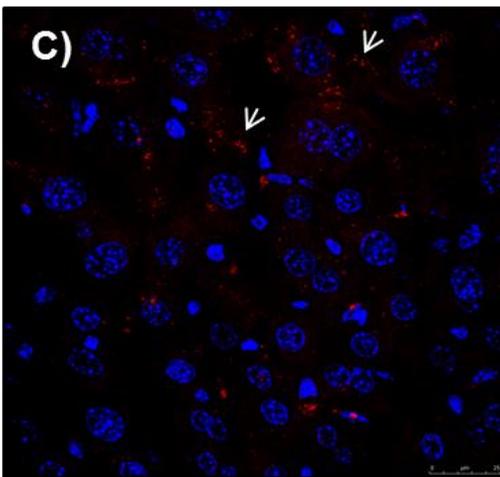
NT



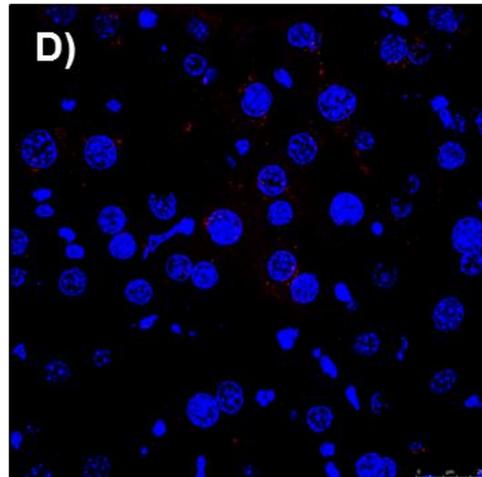
RMP + INH



**RMP + INH
HGF**



HGF



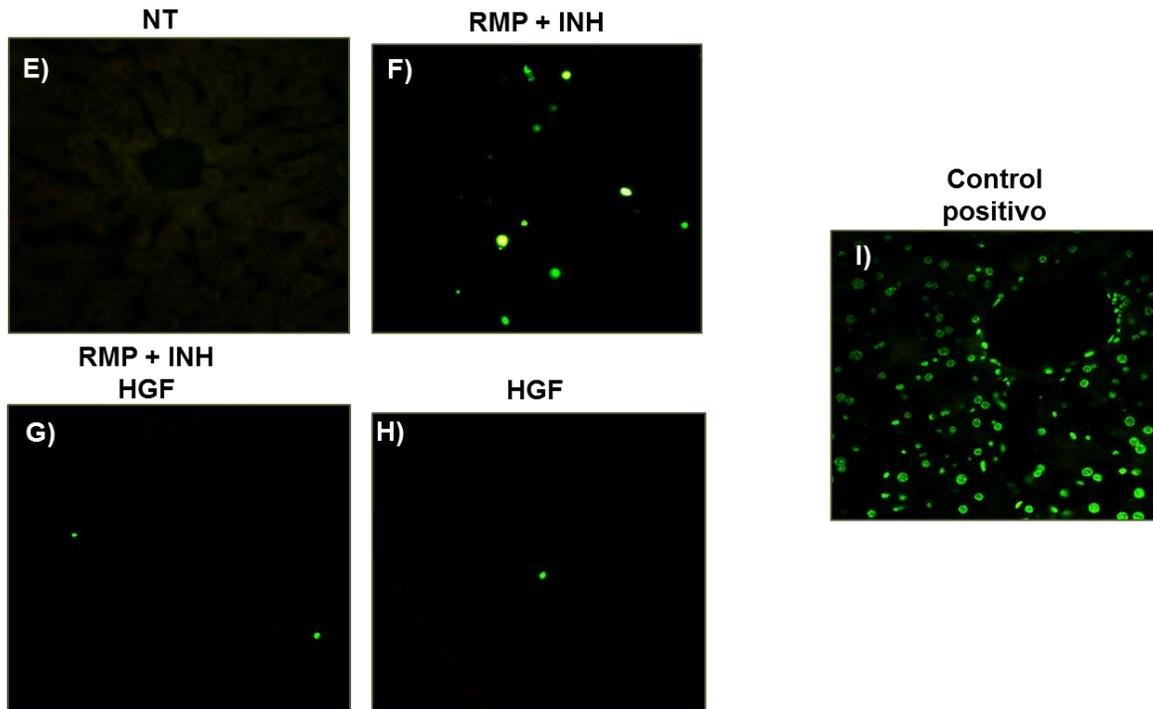


Figura 2. El HGF induce un efecto antiapoptótico. Las imágenes A-D representan la inmunofluorescencia de caspasa 3 y las imágenes E-I muestran la apoptosis por la técnica de TUNEL, ambas determinadas por microscopía confocal. Las muestras provienen de tejido hepático de animales no tratados A) y E); tratados con rifampicina (RMP) e Isoniazida (INH) B) y F); tratados con HGF y la combinación de los dos fármacos C) y G); y tratados solo con HGF D) y H). La imagen I es un control positivo de la técnica consistente en el tratamiento del tejido con DNAsa. Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación.

Dado que los fármacos usados tienen como principal mecanismo de citotoxicidad hepática la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía el citocromo P450 2E1, decidimos ensayar si el HGF era capaz de disminuir las ROS en el tejido hepático. Se usaron dos sondas fluorescentes capaces de detectar con alta sensibilidad la presencia de peróxidos, determinados con DCFH y anión superóxido, determinado con DHE. En la figura 3B se puede observar una zona amplia con señal fluorescente en verde, lo cual indica la presencia de peróxidos, el HGF redujo significativamente la señal en verde (figura 3C), la presencia de peróxidos denota estrés oxidante iniciado por la producción de anión superóxido, particularmente por el Cyp2E1, la figura 3F muestra que el tejido hepático de los animales tratados con los fármacos presentan una elevación importante de anión superóxido determinado por el fluoróforo DHE en comparación con el tejido tratado con el HGF y los fármacos (figura 3G).

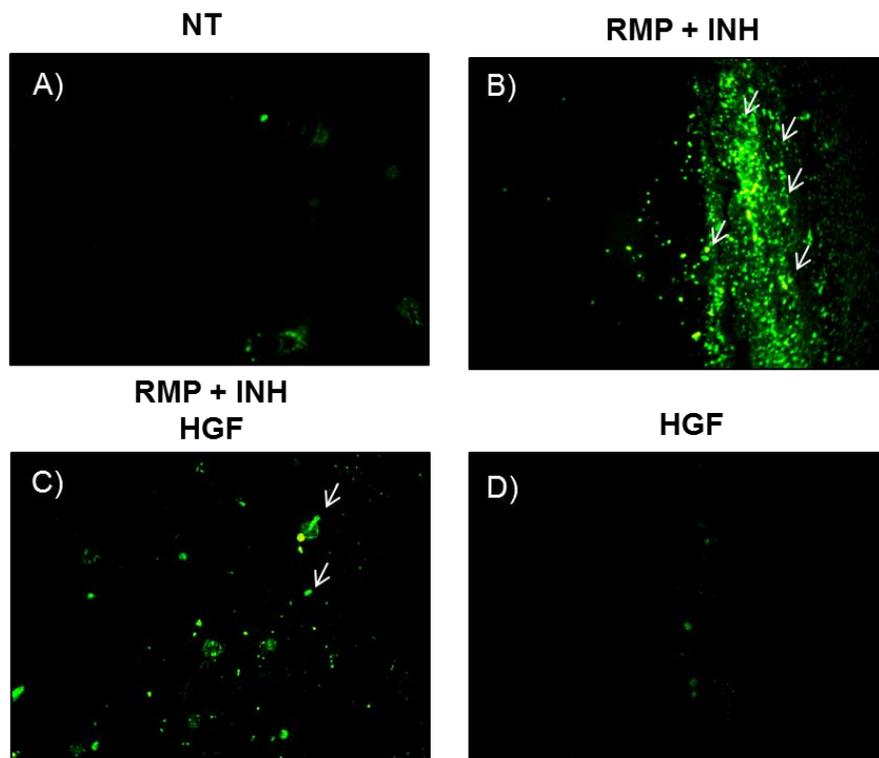
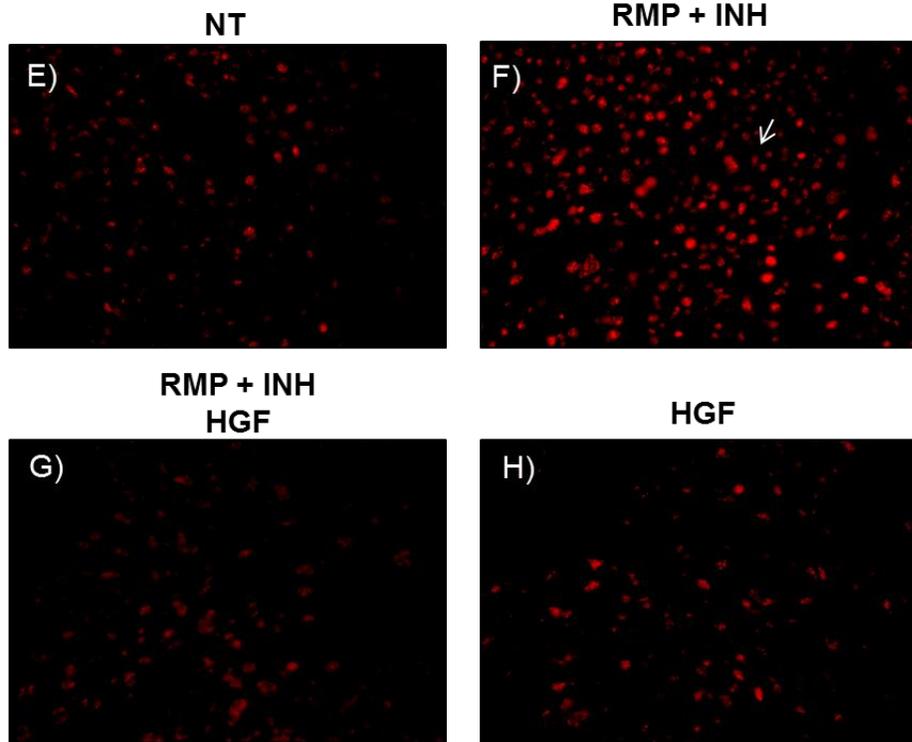


Figura 3. El HGF abroga el efecto prooxidante inducido por los fármacos antifímicos. Las imágenes A-D representan la inmunofluorescencia de la 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH), y las imágenes E-H la del dihidroetidio (DHE), ambas determinadas por microscopía confocal siguiendo el procedimiento descrito en la sección de material y metodología. Las muestras provienen de tejido hepático de animales no tratados A) y E); tratados con rifampicina (RMP) e Isoniazida (INH) B) y F); tratados con HGF y la combinación de los dos fármacos C) y G); y tratados solo con HGF D) y H). Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación.

Con la finalidad de ampliar el estudio en aspectos mecanísticos decidimos explorar por Western blot la expresión de algunas proteínas relacionadas con la sobrevivencia particularmente con el efecto tóxico de fármacos. La figura 4A muestra que Erk1/2, una de las principales señales de sobrevivencia, es activada fuertemente por HGF tanto en el tejido de animales tratados con los fármacos como donde solo se administró el HGF, por otro lado la activación de PKC isoforma delta (PKC δ), cinasa central en la activación del factor de transcripción Nrf2 que provee a la célula de enzimas de detoxificación de fase 2 y 3, de manera similar a Erk, la enzima se activa fuertemente con el tratamiento de HGF, sin cambios en su contenido total.

La figura 4B muestra que la enzima γ -GCS, enzima limitante en la síntesis de GSH y que es considerada como un marcador de protección hepática se incrementó igualmente solo en los casos donde el HGF estuvo presente, teniendo un discreto aumento como respuesta solo al tratamiento con los fármacos.

Finalmente, se ha reportado que el HGF es capaz de disminuir la expresión del Cyp2E1, nuestros datos mostrados en la figura 4C muestran que efectivamente el tratamiento de fármacos y el HGF induce una disminución importante del Cyp2E1 comparado con el tratamiento solo con los fármacos que incrementaron a la enzima.

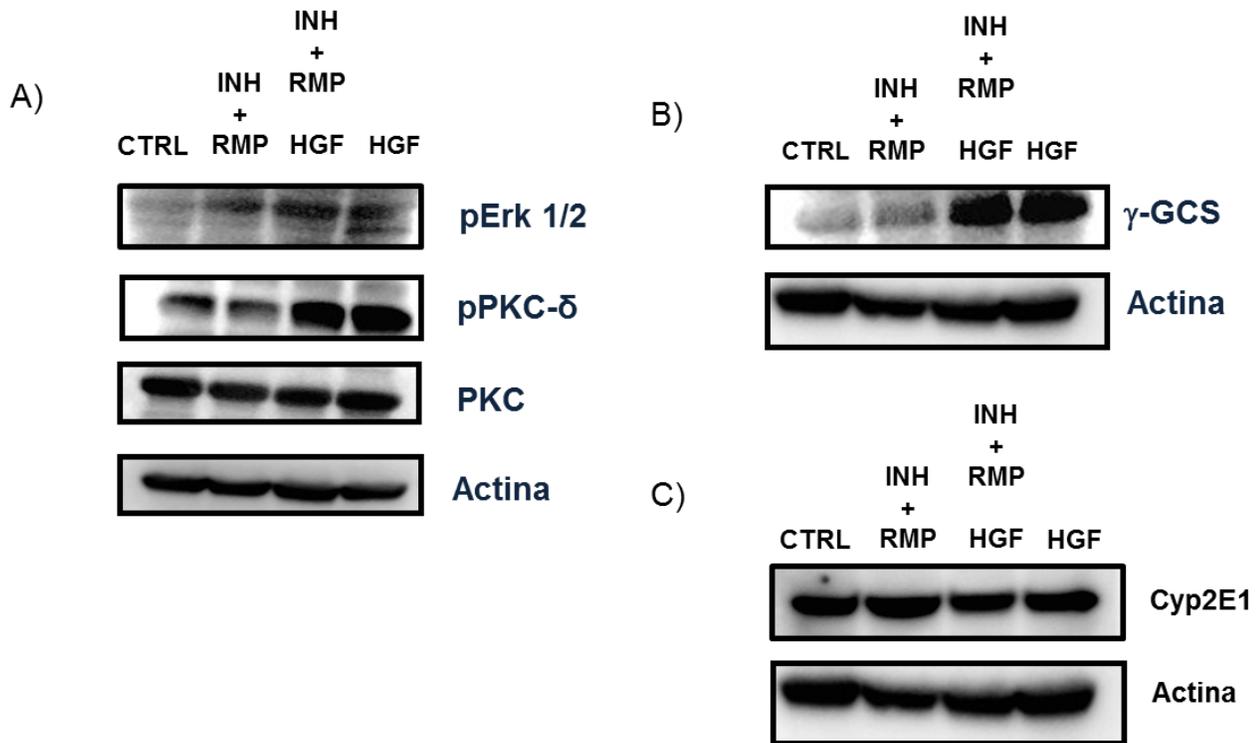


Figura 4. El HGF induce la activación de las rutas de supervivencia mediadas por Erk y PKC y disminuye la expresión de Cyp2E1. Las imágenes son representativas de experimentos de Western blots de al menos 4 experimentos independientes con muestras que provinieron de 4 animales de experimentación. Se siguió el procedimiento delineado en la sección de metodologías.

Con la finalidad de confirmar la importancia del HGF en la protección contra la hepatotoxicidad de los fármacos estudiados, procedimos a evaluar el aporte que el HGF endógeno confiere al animal de experimentación, por lo que suministramos anti-HGF a la par que los fármacos y durante el mismo tiempo de tratamiento. La figura 5A muestra que el anticuerpo dirigido contra el HGF exacerba el daño hepático determinado por los niveles séricos de ALT y en comparación con los animales tratados solo con los fármacos y con los no tratados. En relación a cociente del peso de hígado y total del ratón (figura 5B) se observa que hay un incremento significativo con respecto al grupo tratado solo con los fármacos o no tratados sugiriendo un daño severo al inhibir la producción interna del factor de crecimiento. Los datos anteriores siguieron una exacerbación de la producción de ROS y mayor daño tisular, por lo anterior realizamos la determinación de anión superóxido *in situ* y un análisis histológico en los ratones sometidos al anti-HGF y los fármacos.

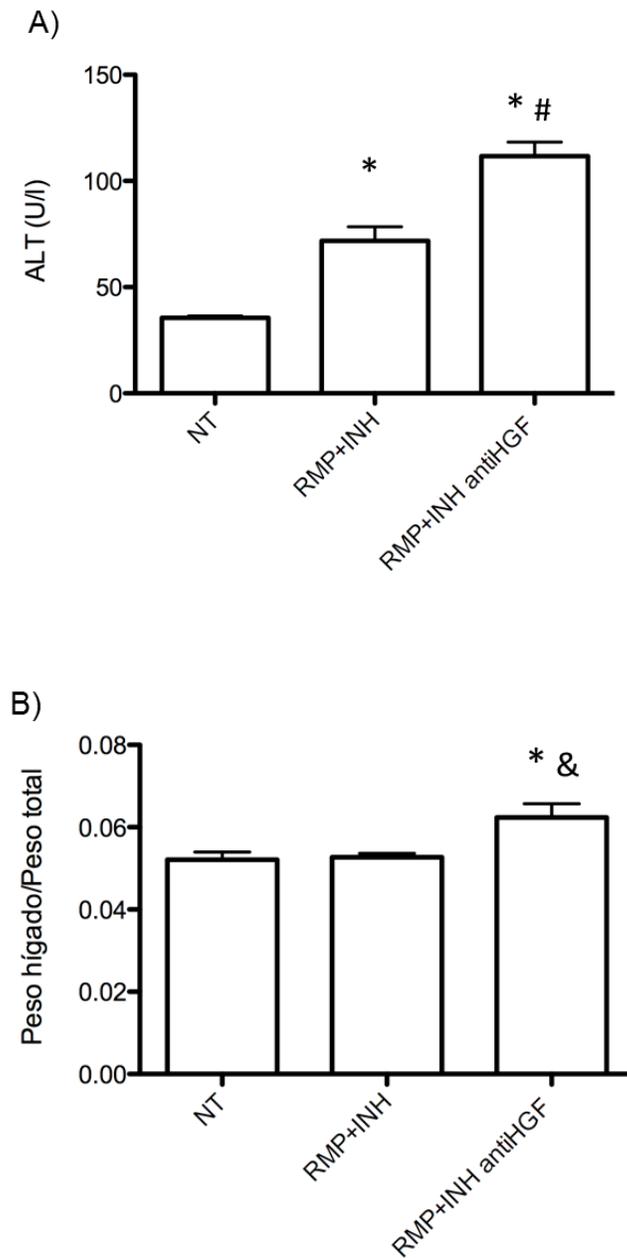


Figura5 .La inhibición del HGF endógeno potencia el efecto tóxico de los fármacos antifímicos. A) Valores séricos de alanina aminotransferasa (ALT) y B) cociente de peso del hígado y total del animal de experimentación. Las barras representan el promedio \pm EE de al menos 4 experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. * $p \leq 0.05$ con respecto al no tratado (NT), # $p \leq 0.05$ con respecto al tratamiento con rifampicina (RMP) e Isoniazida (INH).

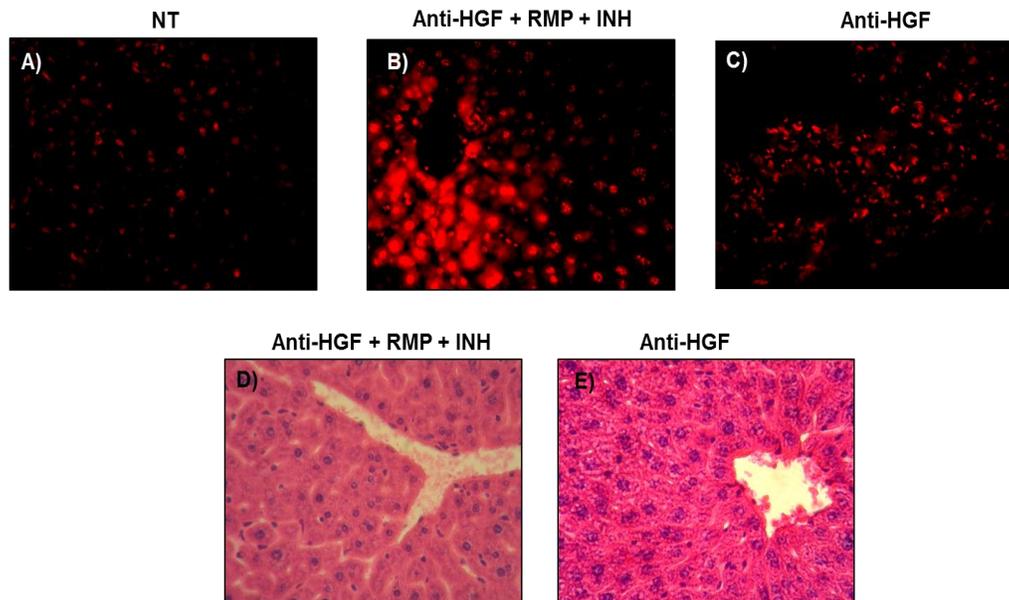


Figura 6. La inhibición del HGF endógeno incrementa el daño al tejido hepático y el estrés oxidante. Se realizó la determinación del anión superóxido con dihidroetidio en tejido de animales no tratados A); tratados con rifampicina (RMP) e Isoniazida (INH) y el anti-HGF B); y solo con anti-HGF C). Se realizó una tinción de hematoxilina y eosina en muestras provenientes de animales tratados con RMP e INH y el anti-HGF D); y solo con anti-HGF E). Las imágenes son representativas de al menos 4 animales de experimentación.

La figura 6B muestra claramente el incremento exacerbado en la producción del anión superóxido en los ratones tratados con el anti-HGF en comparación con aquellos no tratados (figura 6A) o tratados solo con el anticuerpo (figura 6C), por otro lado el análisis histológico mostró un incremento en células con condensación nuclear y pérdida en la estructura del parénquima.

Discusión

En la última década la investigación relacionada con las funciones del factor de crecimiento de hepatocitos ha incrementado el interés de investigadores a nivel mundial del mundo, debido a las propiedades antioxidantes que despliega al unirse a su receptor c-Met, propiedades que han sido caracterizadas particularmente por nuestro grupo de investigación (Kaposi-Novak, Lee et al. 2006; Takami, Kaposi-Novak et al. 2007; Gomez-Quiroz, Factor et al. 2008; Valdes-Arzate, Luna et al. 2009; Marquardt, Seo et al. 2012) .

El HGF a diferencia de otros ligandos y factores de crecimiento, es activado únicamente por el receptor c-Met. La importancia de esta relación uno a uno entre factor de crecimiento y receptor, ha sido demostrada mediante la eliminación condicional a hígado del receptor c-Met, en donde los efectos fisiológicos y terapéuticos del HGF son únicos, por lo que no pueden ser sustituidos en su totalidad por la acción de ningún otro factor de crecimiento. Juntos HGF y c-Met representan potencialmente, un blanco terapéutico para la creación de fármacos, tomando en cuenta sus características agonísticas/activadoras o antagonistas/inhibitorias. Estas funciones pueden caracterizar el descubrimiento de nuevos fármacos, así como las moléculas que actúan como inductoras o inhibitorias en la vía. El HGF puede inducir la activación de rutas como Erk, Stat3 o Akt que eventualmente activan al factor de transcripción NF-kB, desplegando la expresión de una batería de genes que codifican para proteínas tanto antioxidantes como antiapoptóticas (Gomez-Quiroz, Factor et al. 2008), por otro lado estudios realizados en la década de los 1990s, revelaron que el HGF es capaz de suprimir la muerte celular, actuando como citoprotector tras la unión con su receptor c-Met, que además, tiene la capacidad de interactuar físicamente con algunos factores proapoptóticos como el receptor FAS (Wang, DeFrances et al. 2002), o permitir la

expresión de enzimas de fase II y III de detoxificación al modular al factor de transcripción Nrf2 (Kaposi-Novak, Lee et al. 2006).

La inactivación genética del receptor c-Met en hepatocitos, induce estrés en el hígado que se caracteriza por la aparición de cambios multifactoriales en los organelos de células parenquimáticas y no parenquimáticas en el órgano. El espectro de estos cambios abarca desde disminución en la proliferación de los hepatocitos, calcificación patológica de áreas necróticas, característica que impacta la capacidad de los macrófagos para remover material necrótico, activación exacerbada de las células estelares que incrementa inflamación y fibrosis, desregulación de vías de señalización asociadas con el tráfico celular del sistema inmune, estrés oxidante, respuesta al daño al ADN, proliferación y muerte celular. Este perfil establece la importancia del HGF y su receptor c-Met en la protección y reparación ante daño inducido por moléculas tóxicas en el hígado, así como su participación en el desarrollo de la fibrosis (Marquardt, Seo et al.)

Por lo anterior y por los resultados obtenidos en este trabajo, hipotetizamos que el HGF tiene la capacidad de disminuir de manera substancial el efecto hepatotóxico de los fármacos de primera elección en el tratamiento de la tuberculosis, tomando particular relevancia por los reportes actuales de la OMS, en los que se señala la aparición e incremento de cepas del *Mycobacterium tuberculosis* que presentan resistencia a estos antibióticos (Dorman, Chihota et al. 2012; Grutzmacher, Dalmarco et al. 2012; Menon, Dharmshale et al. 2012) por lo cual, en consecuencia, conduce al incremento en las dosis de los fármacos como son la rifampicina y la isoniazida, así como otros que se usan en combinación para atacar la infección. Diversos estudios han demostrado que ambos medicamentos inducen daño hepático leve, moderado e incluso falla hepática fulminante, cuadro que depende principalmente de la capacidad hepática del individuo para la biotransformación de los fármacos (Cillo, Bassanello et al. 2005; Idilman, Ersoz et al. 2006). Es por ello, que surge la

necesidad de la creación de nuevos fármacos capaces de atacar efectivamente a las cepas bacterianas, sin importar si se encuentran metabólicamente activas o en estado de latencia, o bien identificar moléculas que desplieguen respuestas hepatoprotectoras y puedan ser administradas terapéuticamente, antes de dar inicio al tratamiento o coadministrados con los fármacos disponibles, lo cual puede cambiar el panorama actual en los países donde la tuberculosis sigue siendo un problema de salud pública como México.

Los resultados en el presente trabajo muestran que el HGF exógeno, aplicado iv a las dosis y tiempos indicados en material y métodos, fue capaz de contrarrestar notablemente el efecto tóxico de la isoniazida y la rifampicina. La inspección macroscópica e histológica evidenciaron el efecto protector del factor de crecimiento (figura 1). Datos previos reportados por nuestro grupo de investigación muestran que el HGF y su receptor c-Met son indispensables para una correcta respuesta reparadora ante estímulos hepatotóxicos, de tal forma que ratones con eliminación condicional de c-Met (MetKO) fueron más susceptibles a la carcinogénesis química (Takami, Kaposi-Novak et al. 2007), o presentaron mayor efecto fibrogénico cuando fueron tratados con tetracloruro de carbono (Marquardt, Seo et al. 2012), nuestros datos muestran que el HGF exógeno protegió notablemente al órgano, incluso el HGF endógeno resulto ser fundamental para la protección (figura 6).

Uno de los mecanismos principales de generación de daño celular inducido por la isoniazida, es la producción de ROS (Tafazoli, Mashregi et al. 2008) provenientes del sistema de oxidación microsomal, de manera particular el Cyp2E1 (Sotsuka, Sasaki et al. 2011), previamente documentamos que el HGF induce la activación de factores de transcripción que inducen la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de GSH como la gama glutamilcisteín sintetasa, enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa entre otras (Gomez-Quiroz, Factor et al. 2008; Valdes-Arzate, Luna et al. 2009), particularmente el sistema del glutatión es determinante en el mecanismo de

hepatoprotección antioxidante mediado por el HGF y su receptor, (Valdes-Arzate, Luna et al. 2009) en este trabajo mostramos que el tratamiento con HGF indujo significativamente la producción de la enzima limitante de la síntesis del GSH (figura 4B) que es dirigida en su expresión por los factores de transcripción Nrf2 y NF- κ B los cual previamente demostramos, son activados por el HGF mediante la fosforilación de PKC- δ , que se requiere para que el factor de transcripción Nrf2 rompa la interacción física con su supresor Keap1, se transloque al núcleo y se una a su secuencia consenso, iniciando así la transcripción de la batería de genes antioxidantes y de sobrevivencia (Kaposi-Novak, Lee et al. 2006; Gomez-Quiroz, Factor et al. 2008).

Si bien el mecanismo de toxicidad es iniciado por la biotransformación de la isoniazida *per se* y potenciado por la intervención del Cyp2E1 y la interacción y sobreproducción de la hidracina con la rifampicina, se ha documentado también, que a nivel mitocondrial se incrementa el estrés oxidante debido a alteraciones en la permeabilidad membranal, lo que induce el incremento de la oxidación de grupos tioles, protéicos y no protéicos. El *pool* de GSH mitocondrial (mGSH) es esencial para el mantenimiento de la capacidad funcional del organelo y para la sobrevivencia celular. El aumento o disminución del mGSH protege o sensibiliza a la célula ante la muerte celular inducida por estrés oxidante, sin importar los cambios del GSH citosólico. (Chowdhury, Santra et al. 2006). Nuestros datos mostraron que el HGF disminuyó a valores normales la expresión de Cyp2E1, lo cual asegura un buen metabolismo de los fármacos sin exacerbar el efecto oxidante. El control en la generación de las ROS quedó fehacientemente comprobada por la determinación *in situ* de peróxidos y anión superóxido (figura 3).

El mecanismo molecular inducido por el HGF sugiere estar mediado por las rutas de señalización de Erk 1/2 y PKC δ como lo demuestra la figura 4A lo cual no sorprende ya que ambas cinasas son necesarias para la activación de Nrf2 en células hepáticas (Niture, Jain et

al. 2009), por otro lado la γ -GCS, como ya se ha mencionado, es dirigida en su expresión, por Nrf2.

La ruta de las MAPK representa una de las principales vías del proceso de daño y reparación. Sus miembros suelen contrarregularse, de esta forma ERK1/2 inicia una señal de supervivencia mientras que p38 o la cinasa de Jun (JNK) proveen señales de muerte celular por apoptosis (Choi, Lee et al.).

Una vez que ERK1/2 se encuentra en el núcleo es capaz de fosforilar y activar a varios factores de transcripción relacionados con el inicio y progresión del ciclo celular, la expresión de proteínas antiapoptóticas y antioxidantes, por lo que se considera una ruta canónica de supervivencia y reparación.

Los datos que presentamos en la presente tesis muestran una relación directa entre el efecto citoprotector del HGF y la activación de ERK1/2.

Adicionalmente, datos previos de nuestro grupo muestran que la vía de señalización de ERK1/2 es principalmente inducida por HGF y su receptor c-Met (Gomez-Quiroz, Factor et al. 2008).

Conclusión

Los resultados obtenidos dejan claro el efecto protector del HGF ante la hepatotoxicidad inducida por la administración de los fármacos antifímicos, rifampicina y la isoniazida. Presentado como evidencia la participación del HGF endógeno como principal y necesaria para la hepatoprotección basal, así como que el tratamiento con HGF exógeno es capaz de inducir una respuesta protectora potenciada.

El HGF promovió la disminución de la generación de especies reactivas de oxígeno, los cuales son los principales agentes tóxicos producidos como consecuencia de la biotransformación de los fármacos e indujo la activación de las rutas canónicas de sobrevivencia y reparación como ERK y PKC.

Por lo que proponemos al HGF como un blanco terapéutico para en la prevención del desarrollo de la hepatotoxicidad inducida por los antibióticos que se prescriben en la actualidad para el tratamiento contra la infección de *Mycobacterium tuberculosis*, dando oportunidad en la clínica a la administración de dosis más elevadas de los fármacos, que alcancen el límite de tolerancia que tienen las bacterias en estado activo y latente, o bien, la administración del tratamiento por periodos más largos sin riesgo de suspensión por falla hepática.

Referencias

- Andrade, R. J., R. Camargo, et al. (2004). "Causality assessment in drug-induced hepatotoxicity." Expert Opin Drug Saf **3**(4): 329-44.
- Barry, C. E., 3rd, R. E. Lee, et al. (1998). "Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions." Prog Lipid Res **37**(2-3): 143-79.
- Cillo, U., M. Bassanello, et al. (2005). "Isoniazid-related fulminant hepatic failure in a child: assessment of the native liver's early regeneration after auxiliary partial orthotopic liver transplantation." Transpl Int **17**(11): 713-6.
- Cohen, T. and M. Murray (2004). "Modeling epidemics of multidrug-resistant M. tuberculosis of heterogeneous fitness." Nat Med **10**(10): 1117-21.
- Choi, T. G., J. Lee, et al. "Apoptosis signal-regulating kinase 1 is an intracellular inducer of p38 MAPK-mediated myogenic signalling in cardiac myoblasts." Biochim Biophys Acta **1813**(8): 1412-21.
- Chowdhury, A., A. Santra, et al. (2006). "Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice." J Hepatol **45**(1): 117-26.
- Deretic, V., I. Vergne, et al. (2004). "Endosomal membrane traffic: convergence point targeted by Mycobacterium tuberculosis and HIV." Cell Microbiol **6**(11): 999-1009.
- Dorman, S. E., V. N. Chihota, et al. (2012). "Genotype MTBDRplus for direct detection of Mycobacterium tuberculosis and drug resistance in strains from gold miners in South Africa." J Clin Microbiol **50**(4): 1189-94.
- Dye, C. and B. G. Williams "The population dynamics and control of tuberculosis." Science **328**(5980): 856-61.

- Gomez-Quiroz, L. E., V. M. Factor, et al. (2008). "Hepatocyte-specific c-Met deletion disrupts redox homeostasis and sensitizes to Fas-mediated apoptosis." J Biol Chem **283**(21): 14581-9.
- Grutzmacher, L. K., E. M. Dalmarco, et al. (2012). "Drug resistance of Mycobacterium tuberculosis strains in southern Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **45**(1): 95-9.
- Huang, Y. S., H. D. Chern, et al. (2003). "Cytochrome P450 2E1 genotype and the susceptibility to antituberculosis drug-induced hepatitis." Hepatology **37**(4): 924-30.
- Idilman, R., S. Ersoz, et al. (2006). "Antituberculous therapy-induced fulminant hepatic failure: successful treatment with liver transplantation and nonstandard antituberculous therapy." Liver Transpl **12**(9): 1427-30.
- Jaeschke, H. and M. L. Bajt (2006). "Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death." Toxicol Sci **89**(1): 31-41.
- Jaramillo, E. (2007). "[XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis]." Biomedica **27**(4): 473-4.
- Kaposi-Novak, P., J. S. Lee, et al. (2006). "Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype." J Clin Invest **116**(6): 1582-95.
- Keshavjee, S. and P. E. Farmer "Tuberculosis, drug resistance, and the history of modern medicine." N Engl J Med **367**(10): 931-6.
- Klaassen, C. D. and S. A. Reisman (2010). "Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver." Toxicol Appl Pharmacol **244**(1): 57-65.

Koul, A., E. Arnoult, et al. "The challenge of new drug discovery for tuberculosis." Nature **469**(7331): 483-90.

Krishnamurthy, U. A. a. P. (2011). Detoxification Functions of the Liver

Molecular Pathology of Liver Diseases, Molecular Pathology Library. S. P. S. Monga. Kansas City, Springer Science+Business Media. **5**: 147-149.

Leung, C. C., W. S. Law, et al. (2003). "Initial experience on rifampin and pyrazinamide vs isoniazid in the treatment of latent tuberculosis infection among patients with silicosis in Hong Kong." Chest **124**(6): 2112-8.

Lougheed, K. E., D. L. Taylor, et al. (2009). "New anti-tuberculosis agents amongst known drugs." Tuberculosis (Edinb) **89**(5): 364-70.

Marquardt, J. U., D. Seo, et al. "Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways." Biochim Biophys Acta **1822**(6): 942-51.

Marquardt, J. U., D. Seo, et al. (2012). "Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl(4) exposure through deregulation of multiple molecular pathways." Biochim Biophys Acta **1822**(6): 942-51.

Menon, S., S. Dharmshale, et al. (2012). "Drug resistance profiles of Mycobacterium tuberculosis isolates to first line anti-tuberculous drugs: A five years study." Lung India **29**(3): 227-31.

Nalu Navarro-Alvarez, A. S.-G. and a. N. Kobayashi (2010). Hepatic Stem Cells and Liver Development. Hepatocytes, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media: 215-217.

Niture, S. K., A. K. Jain, et al. (2009). "Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for

stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance." J Cell Sci **122**(Pt 24): 4452-64.

Parkinson A, O. B. (2008). Biotransformation of Xenobiotics. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons
K. CD. New York, McGraw-Hill: 161-304.

Russell, D. G. (2001). "Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(8): 569-77.

Sacksteder, K. A., M. Protopopova, et al. "Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action." Future Microbiol **7**(7): 823-37.

Sandy, J., S. Holton, et al. (2005). "Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine N-acetyltransferase protein from Mycobacterium smegmatis." Protein Sci **14**(3): 775-82.

Sharma, S. K. (2004). "Antituberculosis drugs and hepatotoxicity." Infect Genet Evol **4**(2): 167-70.

Sharma, S. K., R. Singla, et al. "Safety of 3 different reintroduction regimens of antituberculosis drugs after development of antituberculosis treatment-induced hepatotoxicity." Clin Infect Dis **50**(6): 833-9.

Sotsuka, T., Y. Sasaki, et al. (2011). "Association of isoniazid-metabolizing enzyme genotypes and isoniazid-induced hepatotoxicity in tuberculosis patients." In Vivo **25**(5): 803-12.

Tafazoli, S., M. Mashregi, et al. (2008). "Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte inflammation model." Toxicol Appl Pharmacol **229**(1): 94-101.

- Takami, T., P. Kaposi-Novak, et al. (2007). "Loss of hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway accelerates early stages of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis." Cancer Res **67**(20): 9844-51.
- Tostmann, A., M. J. Boeree, et al. (2008). "Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review." J Gastroenterol Hepatol **23**(2): 192-202.
- Tostmann, A., J. van den Boogaard, et al. "Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity is uncommon in Tanzanian hospitalized pulmonary TB patients." Trop Med Int Health **15**(2): 268-72.
- Trusolino, L., A. Bertotti, et al. (2010). "MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 834-48.
- Valdes-Arzate, A., A. Luna, et al. (2009). "Hepatocyte growth factor protects hepatocytes against oxidative injury induced by ethanol metabolism." Free Radic Biol Med **47**(4): 424-30.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Velayati, A. A., M. R. Masjedi, et al. (2009). "Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran." Chest **136**(2): 420-5.
- Walubo, A., P. Smith, et al. (1998). "The role of oxygen free radicals in isoniazid-induced hepatotoxicity." Methods Find Exp Clin Pharmacol **20**(8): 649-55.
- Wang, X., M. C. DeFrances, et al. (2002). "A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met." Mol Cell **9**(2): 411-21.
- Wherli, W. (1983). The Use of Rifampin in the Treatment of Nontuberculous Infections. Reviews Of Infectious Diseases. Chicago, Oxford University Press. **5**: S407-S411.

Yee, D., C. Valiquette, et al. (2003). "Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **167**(11): 1472-7.

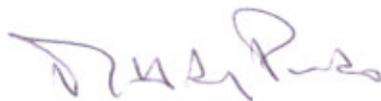
Yew, W. W. and C. C. Leung (2007). "Antituberculosis drugs and hepatotoxicity." Am J Respir Crit Care Med **175**(8): 858; author reply 858-9.

Zignol, M., W. van Gemert, et al. "Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010." Bull World Health Organ **90**(2): 111-119D.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "EFECTO PROTECTOR DEL HGF ANTE EL DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR LA ISONIAZIDA Y LA RIFAMPICINA, con fecha 6 de diciembre del 2012.



Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz
Presidenta



Dr. Rogelio Hernández Pando
Secretario



Dra. Mina Königsberg Fainstein
Vocal



Dra. Leticia Bucio Ortiz
Vocal