

Regulación hormonal de la colestasis inducida por estrógenos

Luis Alberto Henríquez Hernández

Leandro Fernández Pérez (director del trabajo)

La hormona de crecimiento (GH) y las hormonas tiroideas (TH) tienen un papel crítico en el metabolismo de lípidos y ácidos biliares (AB). Sin embargo, su papel en la regulación de genes involucrados en la síntesis de lípidos, el transporte y la síntesis de AB ha sido poco explorado. En este trabajo se midió la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico y biliar mediante PCR cuantitativa en tiempo real, en hígado obtenido de animales hipotiroideos. El objetivo fue el de caracterizar el papel de la GH y las TH sobre la regulación de de estos genes. Nuestros resultados indican que estas hormonas regulan la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos biliares (CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1) o en la transcripción de los mismos (HNF4, PXR, FXR, SHP). Algunas acciones de la GH son opuestas a las de T3.

Growth and thyroid hormones (GH and TH) have a critical role in the regulation of lipid and bile acid (BA) metabolism. Otherwise, its role in the control of genes involved in lipogenesis or synthesis and transport of BA is less studied. In this work was applied Real-Time PCR technology to liver samples obtained from hypothyroidism rats for explore the actions of GH and TH (T3) in the regulation of the expression of genes involved in lipid and BA homeostasis. Our results suggest that these hormones regulate the expression of genes that synthesize BA (CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1) or in the transcription of those (HNF4, PXR, FXR, SHP). Moreover, GH actions are opposite to T3 actions.

Introducción

Una de las funciones hepáticas es la síntesis y secreción de bilis. La bilis tiene dos funciones importantes; en primer lugar, desempeña un papel significativo en la digestión y absorción de las grasas. En segundo lugar, la bilis sirve como medio de transporte para la excreción de varios productos de desecho procedentes de la sangre, entre los que se encuentra la bilirrubina y el exceso de colesterol (Guyton and Hall 2000). La bilis está compuesta en más de un 50% por sales biliares y agua. El precursor de las sales biliares es el colesterol, procedente de la dieta o sintetizado en los hepatocitos en el metabolismo de las grasas y convertido después en ácido cólico (CA) y ácido chenodeoxicólico (CDCA). Alrededor del 94% de las sales biliares se reabsorbe en el intestino delgado, pasan al torrente sanguíneo y vuelven al hígado, donde son captadas casi en su totalidad.

Esta recirculación de las sales biliares se llama circulación enterohepática (Guyton and Hall 2000).

La conversión del colesterol en ácidos biliares (AB) puede ser iniciada tanto por la enzima 7 α -hidroxilasa (CYP7A1) en su vía clásica (neutra) como por la esterol 27-hidroxilasa mitocondrial (CYP27A) en su vía alternativa (ácida). El colesterol, además, es capaz de regular la transcripción de distintos genes a través de distintas rutas de señalización; que involucran a los receptores nucleares LXR α (un sensor de oxisteroles que en ratones induce la expresión de CYP7A1 (Chiang, Kimmel et al. 2001)), y los factores de transcripción SREBPs, los cuales estimulan la actividad transcripcional de multitud de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos (lipogénesis), colesterol, y lipoproteínas (Brown and Goldstein 1999). Se conocen tres isoformas de SREBP, SREBP-1a, -1c y -2. Cuando el nivel de esteroides cae en la célula, se inicia un proceso que culmina con la libe-



CLÍNICA
SAN ROQUE

familia
Megías Martínez

Artículo patrocinado por

Clínica San Roque y
Familia Megías Martínez

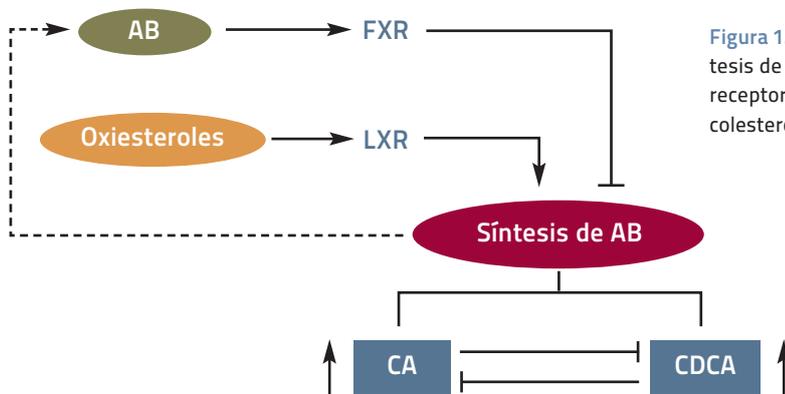


Figura 1. Diagrama que representa la autoregulación de la síntesis de los ácidos biliares (AB) por los propios AB a través del receptor nuclear Fxr, así como del papel de los derivados del colesterol. El ratio entre los dos principales AB, el ácido cólico (CA) y chenodeoxicólico (CDCA), está controlado por un mecanismo de regulación cruzada. La inducción se representa por → y la inhibición por ⇨.

ración por proteólisis de SREBPs, que entran en el núcleo celular para activar la transcripción de un conjunto de genes involucrados en el metabolismo lipídico (Horton, Goldstein et al. 2002).

La circulación enterohepática de los ácidos biliares constituye un importante proceso fisiológico que permite controlar la síntesis y el flujo biliar a través de un mecanismo de retroalimentación mediado por varios receptores nucleares. El ratio entre la síntesis de ácidos biliares, su composición y sus niveles de excreción varía profundamente según la especie, el sexo, las condiciones fisiopatológicas y otros factores ambientales como la dieta o las drogas (Arias and Boyer 2001). Se han descubierto múltiples receptores nucleares que participan en la regulación de la transcripción de los genes propios de la síntesis de ácidos biliares (Chiang 2003). Dos receptores nucleares han sido identificados por ser activados por ácidos biliares: 1) FXR, que regula la síntesis, el transporte y la absorción de ácidos biliares, así como el transporte reverso de colesterol (Makishima, Okamoto et al. 1999; Parks, Blanchard et al. 1999; Makishima, Lu et al. 2002) y 2) LXR, que es un receptor de oxiesteroles importante en la regulación del metabolismo lipídico (Forman, Ruan et al. 1997) (Figura 1).

Diversas sustancias químicas y metabolitos, así como hormonas (estrógenos, GH y TH entre otras) y múltiples receptores nucleares (FXR, SHP, SREBP-1c, HNF-4 α , TR α y β ...) regulan la expresión de los principales genes relacionados con la síntesis (Cyp7A1, Cyp8B1, CYP27A1) y el transporte (Bsep, mrp2, NTCP) de AB (Figura 2). En este estudio se abordó la regulación hormonal de los principales genes involucrados en la homeostasis lipídica y biliar (Figura 3).

Material y métodos

Modelo Experimental

Se utilizaron ratas macho adultas de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Sprague-Dawley (Møllegaard, Dinamarca). Las ratas se mantuvieron en condiciones controladas, tanto de temperatura (21-23 °C) como de luz (ciclos de 12 horas luz-oscuridad). Los animales se sacrificaron bajo el efecto de la anestesia, procediéndose primero a la extracción de sangre desde la vena cava caudal, y posterior recolección del hígado. El modelo de animal hipotiroideo TX se consiguió administrando 0.05% peso/volumen de metimazol (MTZ) en el agua de bebida durante un período de al menos 21 días a los machos adultos a partir de los 50 días de edad y hasta el sacrificio (Cooper 2005). Este modelo experimental fue acompañado de un grupo de animales intactos no tratados como control. En los últimos 7 días se administró vehículo o tratamiento (GH, T3 o EE). El sacrificio se realizó a los 73 días de vida. El hígado extraído era inmediatamente troceado y congelado en nitrógeno líquido seguido de congelación a -80 °C hasta su uso. La sangre extraída se procesaba seguidamente para obtener suero, procediéndose a continuación a su almacenamiento a -80 °C.

PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada por Mullis, KB en el año 1983 mediante la cual se puede conseguir un número muy alto de copias de un gen partiendo de una cantidad pequeña de DNA, usando la enzima natural de síntesis de dicha molécula (DNA polimerasa) bajo unas condicio-

nes determinadas (Mullis and Faloona 1987). Para llevarla a cabo solo es necesario DNA, un par de primers específicos para el fragmento de DNA que deseamos amplificar, DNA polimerasa que llevará a cabo el proceso, nucleótidos libres y un termociclador. El ciclo de temperaturas consiste en (i) desnaturalizar la doble hélice de DNA, (ii) alineamiento de los primers a una temperatura específica y (iii) extensión, que consiste en la incorporación de nucleótidos libres por la polimerasa a la hebra previamente abierta, en un proceso que ocurre a otra temperatura distinta. El resultado inicial tras un ciclo es que, partiendo de una única copia del gen contenido en el DNA, tenemos 2 copias de ese fragmento específico que nos interesa. Estos fragmentos vuelven a ser de doble hélice, por lo que el ciclo vuelve a repetirse originando un crecimiento exponencial de copias hasta un máximo final de unos 100.000 millones de copias en función de la disponibilidad de nucleótidos, de primers y la vida media de la enzima. La qRT-PCR se basa en el principio de la PCR. Igualmente se necesita DNA (o cDNA) como muestra de partida, una polimerasa, unos primers y unos fluorocromos que se excitan a una determinada longitud de onda originando una señal, que permite que la amplificación y la detección se hagan simultáneamente en la misma reacción, (Livak 1999). Debido a que cada nuevo fragmento sintetizado lleva incorporado fluorocromos, es posible saber exactamente y en cada ciclo la cantidad de moléculas sintetizadas, que será proporcional a la señal de fluorescencia emitida. La cinética de la reacción de amplificación es por tanto conocida y registrada. Los termocicladores para llevar a cabo qRT-PCR están equipados con un lector de fluorescencia que recoge distintas longitudes de onda según el fluoróforo usado. Un algoritmo específico convierte la señal luminosa en un número que es usado por nosotros para saber cuánto se está generando en una determinada muestra y en un determinado momento.

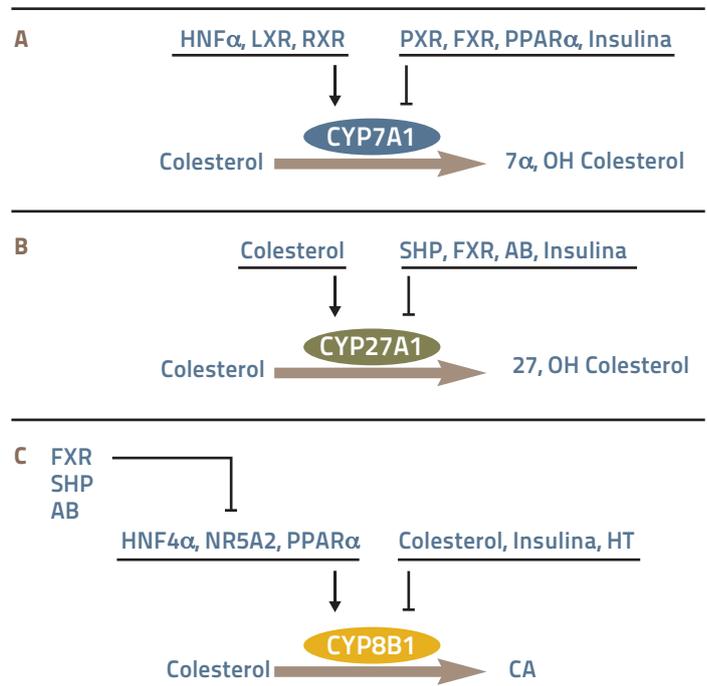


Figura 2. Diagrama que resume la regulación de las principales enzimas involucradas en la síntesis de AB. La inducción se representa por → y la inhibición por —.

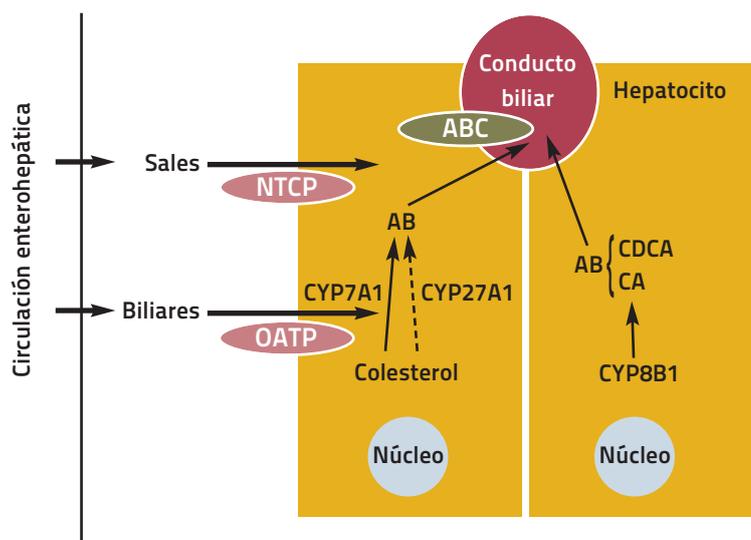


Figura 3. Representación gráfica general de la fisiología biliar. AB = ácidos biliares, ABC = ATP binding cassette proteins, CA = ácido cólico, CDCA = ácido chenodeoxicólico

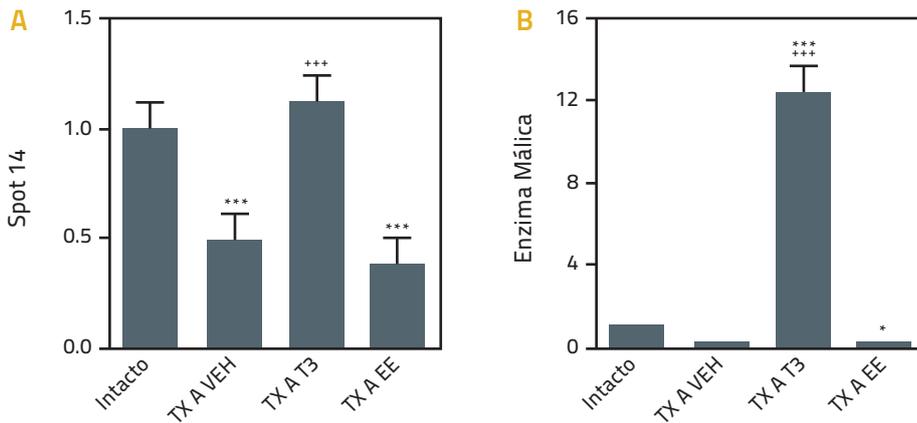


Figura 4. Determinación de los niveles de mRNA de los genes Spot 14 (A) y Enzima Málica (B) por PCR cuantitativa a tiempo real. Los asteriscos indican significación respecto al VEH intacto ($p < 0.001$), mientras que la cruz indica significación respecto al TX A VEH ($p < 0.001$). Las unidades están normalizadas frente a la media de los valores del intacto no tratado.

Resultados

Resultados previos indican que las hormonas hipofisarias tienen un papel crítico en las acciones de los estrógenos (EE) en un modelo de colestasis experimental sobre la regulación del metabolismo de lípidos y ácidos biliares. En este aspecto, al menos dos hormonas son relevantes: las TH y la GH. Para estudiar los efectos de estas hormonas se creó un modelo TX. En estas condiciones, los niveles séricos de TH y de GH caen significativamente, y el efecto puede revertirse inyectando a los animales T3 y/o GH. Como alguno de los efectos de TH o GH pueden ser mimetizados por los estrógenos, estudiamos paralelamente las acciones del EE en este modelo. En concreto, durante la última semana de vida de los animales se trataron con Veh, T3 (25 g/kg x 7 días), GH (300 µg/kg x 7 días) o EE (0.5 mg/kg x 5 días).

Regulación de la expresión de los genes Spot14 y enzima málica (ME)

Diferentes genes de la vía lipogénica, incluidos Spot14 y ME, son regulados por estas hormonas. Como control de los experimentos, en la Figura 4 mostramos que Spot 14 y ME siguen este patrón: el hipotiroidismo agudo (TX), por sí mismo, reprime la expresión de ambos genes, mientras que el tratamiento con T3 restablece sus niveles. El EE carece de efecto demostrándose que es un efecto específico de T3.

Regulación de la expresión de los genes para los receptores TR α , TR β y ER α

La regulación de la expresión de los receptores nucleares por su propios ligandos es un fenómeno relativa-

mente frecuente. Por ello quisimos conocer los efectos que la ausencia de hormonas tiroideas (TX) y el tratamiento hormonal podría ocasionar en los niveles de expresión de sus receptores (Figura 5B y 5C). De forma similar se analizaron los niveles de expresión de ER α (Figura 5A). La Figuras 5 muestra que el TX, por sí mismo, induce la expresión de TR α (B) y TR β (C). Esto sugiere que la no ocupación de estos receptores por T3 favorece la transcripción de los mismos. Por el contrario, el tratamiento con T3 normaliza los niveles de expresión de ambos receptores con respecto a un animal normal. Ni el EE ni la GH modificaban el nivel de TR α mientras que, sobre TR β , aunque sin significancia estadística, se observó un efecto similar al observado con T3. El estudio de la regulación de TR β por GH y estrógenos resultaría muy interesante porque tanto estas hormonas como este receptor tienen un papel clave en el metabolismo lipídico hepático (Flores-Morales, Gullberg et al. 2002). La Figura 5A muestra que el TX por sí mismo disminuye el ER α aproximadamente un 50% con respecto al animal intacto. Esto se explica porque el ER hepático tiene una regulación multihormonal en la que participan GH, TH, glucocorticoides y estrógenos. La drástica disminución de T3 y GH en el TX permite explicar la disminución del nivel de expresión de ER α . Ni T3 ni GH son suficientes, por sí mismas, para normalizar el nivel de ER lo que indica que es necesaria la participación conjunta de ambas hormonas.

Regulación de la expresión de los genes para las enzimas CYP7A1, CYP8B1 y CYP27

La Figura 6 muestra que el TX induce, por sí mismo, los niveles de expresión de tres enzimas esenciales en la síntesis de ácidos biliares: CYP7A1 (7 α -hydroxylase)

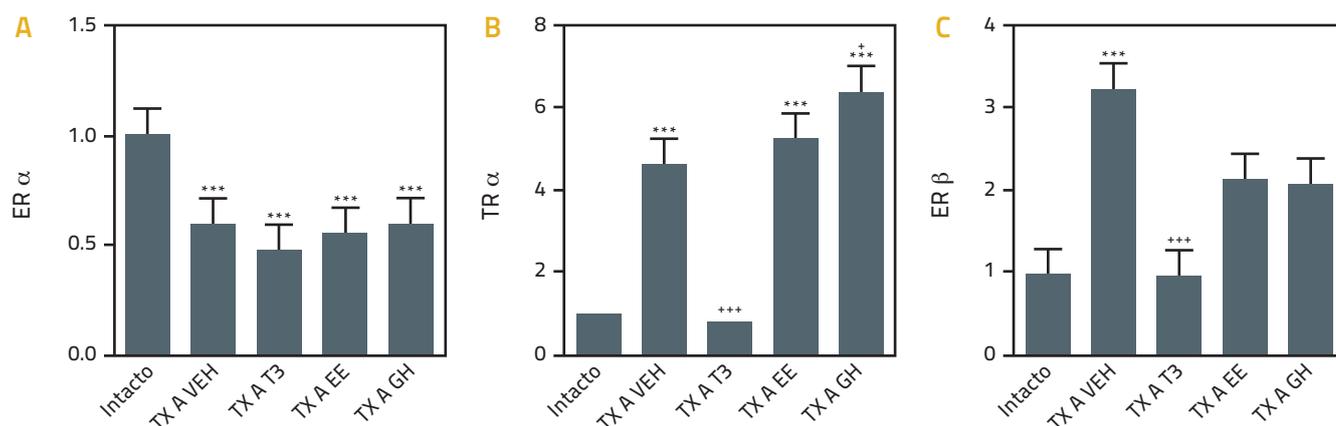


Figura 5. Determinación de los niveles de mRNA del ER α (A), TR α (B) y TR β (C) por PCR cuantitativa a tiempo real. Los asteriscos indican significación respecto al VEH intacto ($p < 0.001$). La cruz indica significación respecto al TX A VEH ($p < 0.05$, $p < 0.001$). Las unidades están normalizadas frente a la media de los valores del intacto no tratado.

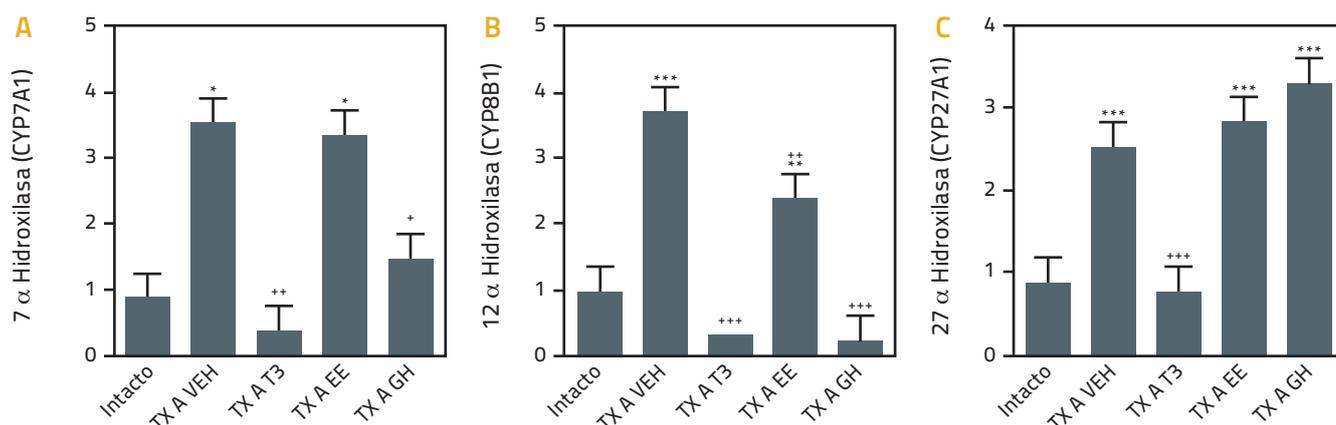


Figura 6. Determinación de los niveles de mRNA de las enzimas 7 α Hidroxilasa (A), 12 α Hidroxilasa (B) y 27 α Hidroxilasa (C) por PCR cuantitativa a tiempo real. Los asteriscos indican significación respecto al VEH intacto ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), mientras que la cruz indica significación respecto al TX A VEH ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Las unidades están normalizadas frente a la media de los valores del intacto no tratado.

(A), CYP8B1 (12 α hydroxylase) (B) y CYP27A1 (27 α -hydroxylase) (C). Esto sugiere que la no ocupación de los receptores para hormonas tiroideas favorece la transcripción de estos genes. Por el contrario, el tratamiento con T3 normaliza (o incluso inhibe) los niveles de expresión de estos genes con respecto a un animal normal. A diferencia de lo que observamos en el animal intacto, el EE no reprime la expresión de CYP7A1 y CYP27A1 mientras que sí lo hace sobre CYP8B1. Por el contrario, la GH tiene un efecto similar a la T3 sobre la expresión de CYP7A1 y CYP8B1 mientras que no revierte la inducción producida por TX sobre CYP27A1.

Regulación de la expresión de los genes para los transportadores Ntcp, Bsep y Mrp2

El TX provoca efectos muy dispares sobre la expresión de los transportadores biliares. Por un lado induce la expresión de Ntcp (Figura 7A) y Bsep (Figura 7C). Estos resultados sugieren una vez más que la no ocupación de los receptores para hormonas tiroideas favorece la transcripción de estos genes. La Figura 7C muestra que, de forma similar a T3, la administración de GH a TX restablece los niveles de expresión normales de Bsep. Esto sugiere que el efecto de T3 sobre Bsep está mediado, en gran medida, por GH. A diferencia de lo que

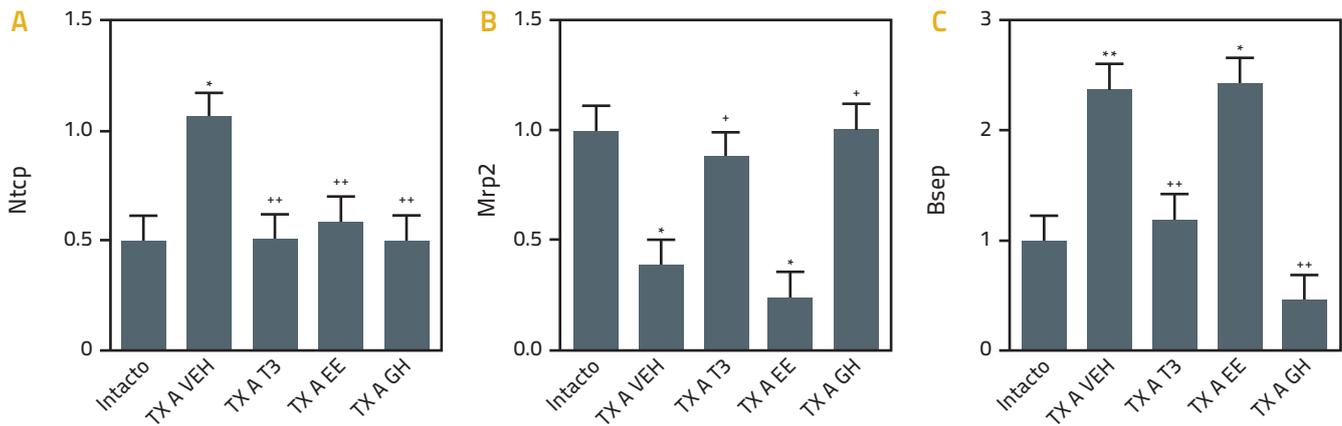


Figura 7. Determinación de los niveles de mRNA de los transportadores AB Ntcp (A), Mrp2 (B) y Bsep (C) por PCR cuantitativa a tiempo real. Los asteriscos indican significación respecto al VEH intacto ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$), mientras que la cruz indica significación respecto al TX A VEH ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$). Las unidades están normalizadas frente a la media de los valores del intacto no tratado.

observamos en el animal intacto, y en concordancia con lo detectado en animales hipofisectomizados (HYPOX) que carecen totalmente de hormonas pituitarias, el EE no inhibe la expresión de Bsep en el animal TX. Esto sugiere que EE necesita la presencia de T3 y/o GH para inhibir la expresión de Bsep. La importancia de las hormonas hipofisarias sobre este efecto del EE ha sido demostrada previamente por nuestro grupo de investigación. En HYPOX el tratamiento con EE no sólo no inhibe sino que por el contrario induce la expresión de Bsep. Los mecanismos que median los efectos del EE sobre Ntcp parecen ser diferentes. De forma similar a T3, el tratamiento con EE normalizaba el nivel de expresión de Ntcp. Esto puede deberse a una regulación directa de la transcripción dependiente del ER o a un mecanismo indirecto a través de la GH. Se sabe que la administración continua de GH reduce los niveles de expresión de Ntcp en la rata macho y explica por qué el nivel de expresión es menor en la hembra (Simon F, 2004). Este mecanismo feminizante también podría explicar el efecto inhibitorio que el EE provoca sobre la expresión de Ntcp en el modelo de colestasis estrogénica. La importancia de las hormonas hipofisarias en esta acción quedó demostrada en el animal HYPOX, en el cual los efectos del EE sobre Ntcp desaparecen. El TX pone de manifiesto una vez más la importancia de determinadas hormonas pituitarias (p.ej, T3 y/o GH) en las acciones de los estrógenos sobre el hígado. Mrp2 extrae del hepatocito hacia la sangre ácidos biliares tóxicos y otros metabolitos (Trauner and Boyer 2003). La Figura 7B muestra que, a diferencia de lo observado con Ntcp y Bsep, el TX inhibe la expresión de Mrp2 mientras que el tratamiento con T3 y GH normalizan su expresión. Estos resultados nos indican que, aunque en sentido inverso si se compara con sus efectos

sobre Ntcp y Bsep, las hormonas tiroideas y la GH regulan también la expresión de Mrp2. A diferencia de lo que se observó con Ntcp, el tratamiento con EE no causaba ningún efecto sobre la expresión de Mrp2.

Regulación de la expresión de los genes HNF4 α , PXR, FXR y SHP: receptores nucleares involucrados en el metabolismo del colesterol-ácidos biliares y xenobióticos

La síntesis y el transporte de ácidos biliares está controlada a nivel transcripcional por la participación coordinada de diferentes receptores nucleares. Algunos de estos receptores están regulados por hormonas hipofisarias. Este es el caso de HNF4 α o de PPAR regulados positiva y negativamente por GH, respectivamente. SHP es inducido por estrógenos e inhibido por la administración continua de GH. La Figura 8 muestra los efectos del TX y del tratamiento hormonal sustitutorio sobre HNF4 PXR, FXR y SHP.

HNF4 α es un receptor nuclear que induce la expresión de CYP7A1, CYP27A1 y CYP8B1, enzimas claves en la síntesis de ácidos biliares. La Figura 8A muestra que TX induce la expresión de HNF4 α . El tratamiento con T3, pero no GH ni EE, restablece sus valores normales. Es interesante destacar que los animales TX tratados con GH muestran una inducción significativa con respecto a los tratados con vehículo, indicando que esta hormona, por sí misma y en ausencia de T3, puede regular positivamente la expresión de HNF4 α . Esto también nos puede estar indicando que la T3 antagoniza algunas acciones de la GH. Se sabe que la hipofisectomía no modifica los niveles de expresión de HNF4 lo que indica que existen mecanismos de regulación que compensan la ausencia de GH como de T3.

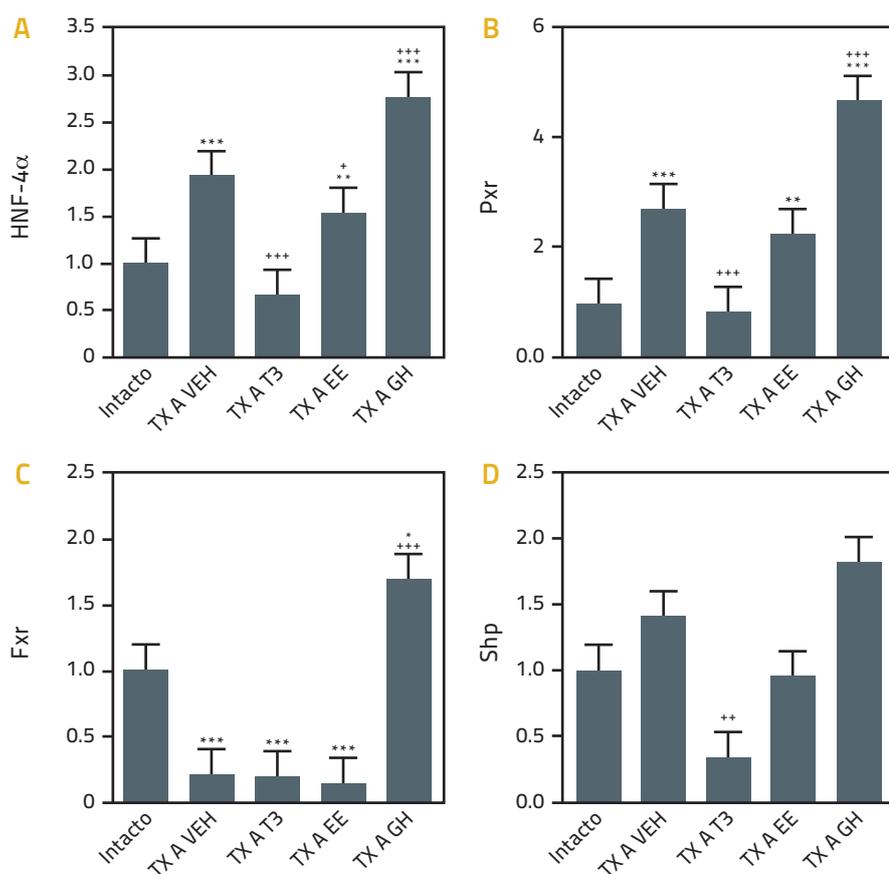


Figura 8. Determinación de los niveles de mRNA de los receptores huérfanos HNF-4 α (A), Pxr (B), Fxr (C) y Shp por PCR cuantitativa a tiempo real. Los asteriscos indican significación respecto al VEH intacto ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$), mientras que la cruz indica significación respecto al TX A VEH ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Las unidades están normalizadas frente a la media de los valores del intacto no tratado.

PXR es un receptor nuclear promiscuo que es activado por ácidos biliares, esteroides y xenobióticos. Su activación reprime la expresión de CYP7A1. La Figura 8B muestra que el TX induce la expresión de PXR. El tratamiento con T3, pero no GH ni EE, restablece sus valores normales. De forma similar a lo ocurrido con HNF4 α , los animales TX tratados con GH muestran una inducción significativa con respecto al vehículo indicando que esta hormona, por sí misma y en ausencia de T3, puede regular positivamente la expresión de PXR. Esto también nos puede estar indicando que la T3 y la GH interactúan en la regulación de PXR. La hipofisectomía *per se* no modificaba la expresión de PXR, lo que sugiere que existen mecanismos de regulación que compensan la ausencia de GH como de T3.

La activación de FXR por ácidos biliares reprime la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos biliares, inhibe la expresión de Ntcp e induce la de Bsep (Eloranta and Kullak-Ublick 2005). El nivel de expresión de FXR disminuye drásticamente en ausencia de hormonas hipofisarias. La Figura 8C muestra que algo similar ocurre en el TX y que ni el tratamiento con T3 ni con EE inducen la expresión de FXR. Sin embargo, el tratamiento con GH induce potentemente su expresi-

ón indicando que esta hormona hipofisaria tiene un papel crítico en la regulación de FXR.

SHP juega un papel crítico en el mecanismo de retroalimentación negativa que permite a los ácidos biliares controlar su propia síntesis y transporte y metabolización. FXR, activado por ácidos biliares, induce SHP y este inhibe la transcripción de genes involucrados en la síntesis de ácidos biliares (Eloranta and Kullak-Ublick 2005). La expresión de SHP por estrógenos depende de ER α (Lai, Harnish et al. 2003). SHP es un receptor nuclear con una gran relevancia fisiológica por su papel como regulador negativo de la actividad transcripcional de muchos factores de transcripción involucrados en la homeostasis de lípidos y ácidos biliares o de receptores nucleares como GR, ER o TR (Seol, Choi et al. 1996; Lai, Harnish et al. 2003; Tirona and Kim 2005). La Figura 8D muestra que el TX, aunque se observa una tendencia no significativa a la inducción, no afecta el nivel de expresión de SHP. El tratamiento con T3, sin embargo, reprime drásticamente su expresión. Por el contrario el tratamiento con GH muestra una tendencia no significativa a la inducción de SHP en animales TX. Esto indica que T3, y no GH, es un potente represor de la expresión de SHP. Esto también nos

ayuda a entender que la hipofisectomía *per se* induzca la expresión de SHP con respecto al animal intacto. Sorprendentemente, y a pesar de que el EE induce la expresión de SHP en el animal intacto, no observamos ningún efecto de este estrógeno en los animales TX, lo que sugiere que la inducción de SHP producida por EE en el animal intacto depende, al menos en parte, de GH.

Conclusiones

Estos resultados indican que las hormonas tiroideas y la GH controlan los niveles de expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos biliares (CYP7A1, CYP8B1 y CYP27A1) o en la transcripción de los mismos (HNF4 α , PXR, FXR, SHP). No obstante, los mecanismos de regulación parecen más complejos que lo que indican estos resultados. En ausencia de hormonas tiroideas, HNF4 α y PXR se inducen y el tratamiento con hormonas tiroideas normaliza sus niveles. Sin embargo, en el animal HYPOX los niveles de estos receptores no se modifican indicando que existen mecanismos de regulación que compensan la ausencia de hormonas hipofisarias. Por otra parte, la GH induce la expresión de HNF4 α y PXR por encima de los valores observados en el animal TX, indicando una regulación contraria a la producida por las hormonas tiroideas.

El nivel de expresión de FXR cae dramáticamente tanto en el animal HYPOX como en TX indicando una dependencia crítica de las hormonas hipofisarias. Nosotros hemos demostrado que la GH, y no la T3, tiene un papel crítico en la regulación de FXR hepático.

El nivel de expresión de SHP, aunque se observa una tendencia a la inducción, no se modifica por el TX. Sin embargo, T3 es un potente represor de la expresión de SHP. Esto también nos ayuda a entender que la hipofisectomía *per se* induzca la expresión de SHP con respecto al animal intacto. Sorprendentemente, y a pesar de que el EE induce la expresión de SHP en el animal intacto, no observamos este efecto en el animal TX. Esto podría explicarse por una reducción del ER α y/o de GH, un fenotipo que caracteriza al modelo hipotiroideo.

Glosario de abreviaturas

AB	ácidos biliares
BSEP	bomba exportadora de sales biliares
CA	ácido cólico
CDCA	ácido chenodeoxicólico
cDNA	DNA complementario
CYP27A1	27 α hidroxilasa
CYP7A1	7 α hidroxilasa
CYP8B1	12 α hidroxilasa
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EE	Etinilestradiol
ER	Receptor de Estrógenos
FXR	Farnesoid X Receptor
GH	Hormona de crecimiento
GR	Receptor de Glucocorticoides
HNF-4 α	Factor Nuclear Hepático 4
HYPOX	hipofisectomizado
LDLR	Receptor para lipoproteínas de baja densidad
LXR	Liver X Receptor
ME	enzima málica
MRP	proteína resistente a multidrogas
MTZ	metimazole
NTCP	proteína co-transportadora de taurocolato dependiente de sodio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PXR	Pregnane X Receptor
RNA	Ácido Ribonucleico
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SHP	Small Heterodimer Partner
SREBP	Proteína captadora de elementos de respuesta a esteroides
T3	triyodotiroxina
TH	Hormonas Tiroideas
TR	Receptor de hormonas tiroideas (α y β)
TX	hipotiroideo

El presente trabajo es parte de la Tesis Doctoral titulada *Análisis de Perfiles de Expresión Génico Hepáticos Hormono-Dependientes: Aplicación de la Tecnología de Dna Microarrays*, realizada por Luis Alberto Henríquez Hernández y dirigida por Leandro Fernández Pérez. El trabajo íntegro se ha publicado en la revista *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2007, 320(2):695-705).

Referencias bibliográficas

- Arias, I. M. and J. L. Boyer (2001). *The liver: biology and pathobiology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1999). "A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood". *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11041-8.
- Chiang, J. Y. (2003). "Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(3): G349-56.
- Chiang, J. Y., R. Kimmel, et al. (2001). "Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha)". *Gene* 262(1-2): 257-65.
- Cooper, D. S. (2005). "Antithyroid drugs". *N Engl J Med* 352(9): 905-17.
- Eloranta, J. J. and G. A. Kullak-Ublick (2005). "Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism". *Arch Biochem Biophys* 433(2): 397-412.
- Flores-Morales, A., H. Gullberg, et al. (2002). "Patterns of liver gene expression governed by TRbeta". *Mol Endocrinol* 16(6): 1257-68.
- Forman, B. M., B. Ruan, et al. (1997). "The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism". *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10588-93.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2000). *Textbook of medical physiology*. Philadelphia, Saunders.
- Henríquez-Hernández, L.A., A. Flores-Morales, et al. (2007) "Role of pituitary hormones on 17alpha-ethinylestradiol-induced cholestasis in rat". *J Pharmacol Exp Ther.* 320(2):695-705.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein, et al. (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver". *J Clin Invest* 109(9): 1125-31.
- Lai, K., D. C. Harnish, et al. (2003). "Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner". *J Biol Chem* 278(38): 36418-29.
- Livak, K. J. (1999). "Allelic discrimination using fluorescent probes and the 5' nuclease assay". *Genet Anal* 14(5-6): 143-9.
- Makishima, M., A. Y. Okamoto, et al. (1999). "Identification of a nuclear receptor for bile acids". *Science* 284(5418): 1362-5.
- Makishima, M., T. T. Lu, et al. (2002). "Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor". *Science* 296(5571): 1313-6.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction". *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Parks, D. J., S. G. Blanchard, et al. (1999). "Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor". *Science* 284(5418): 1365-8.
- Seol, W., H. S. Choi, et al. (1996). "An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors". *Science* 272(5266): 1336-9.
- Simon, F. R., J. Fortune, et al. (2004). "Multihormonal regulation of hepatic sinusoidal Ntcp gene expression". *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(4): G782-94.
- Tirona, R. G. and R. B. Kim (2005). "Nuclear receptors and drug disposition gene regulation". *J Pharm Sci* 94(6): 1169-86.
- Trauner, M. and J. L. Boyer (2003). "Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation". *Physiol Rev* 83(2): 633-71.

Reseña curricular

Luis Alberto Henríquez Hernández nació en Las Palmas de Gran Canaria el 4 de abril de 1978. Realizó la licenciatura de Veterinaria en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en la promoción 1996-2001. Durante el último año de carrera obtuvo una beca del Ministerio de Educación y Ciencia para colaborar en el Departamento de Ciencias Clínicas de esta Universidad. Tras licenciarse obtuvo una beca del Plan Nacional de Formación del Profesorado Universitario del MEC para la realización de una Tesis Doctoral, entre los años 2002 y 2005 (Grupo de Endocrinología Molecular-Profesor Leandro Fernández Pérez). El 21 de abril de 2006, tres días después del nacimiento de su hija, leyó la Tesis Doctoral titulada "Análisis de Perfiles de Expresión Génico Hepáticos Hormono-Dependientes: Aplicación de la Tecnología de Dna Microarrays" obteniendo una calificación de Sobresaliente *Cum Laude*. Esta Tesis Doctoral se hizo en formato Europeo, siendo la primera de estas características en el Departamento de Ciencias Clínicas. Para ello pudo disfrutar durante su período doctoral de dos estancias en el Instituto Karolinska (Estocolmo, Suecia). Su formación post-doctoral ha estado orientada hacia la genética del cáncer, en su vertiente traslacional y clínica. Estuvo contratado como Técnico Especialista por la Fundación Canaria de Investigación y Salud (FUNCIS) durante los años 2007 a 2009 y, desde entonces, por el Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC). Actualmente desarrolla su labor investigadora en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín. Además coordina la labor investigadora con la docente, ya que desde abril de 2008 es profesor asociado a tiempo parcial en el área de Toxicología del Departamento de Ciencias Clínicas de la ULPGC.

Dirección: Universidad de Las Palmas de GC, Facultad de Ciencias de la Salud, Dpto. Ciencias Clínicas-Toxicología, Plaza Dr. Pasteur s/n. Campus de San Cristóbal, 35016. Las Palmas de Gran Canaria.

Teléfono: 928 451461 - 928 449940

Correo electrónico: lhenriquez@dcc.ulpgc.es

L. Fernández-Pérez (nacido en Las Palmas de GC, 1961) obtuvo la licenciatura en Medicina y Cirugía (1985) y el Doctorado en el área de Farmacología (1989) en la Universidad de La Laguna. Durante esta etapa disfrutó de una beca predoctoral del programa INNOVA y del Plan Nacional de Formación de Profesorado y Personal Investigador del MEC. Desde 1989 hasta la fecha, ha ocupado diferentes cargos docentes en el área de Farmacología de la Universidad de Las Palmas de GC. Desde 1997, es Profesor Titular de Universidad. Ha trabajado como investigador postdoctoral el Laboratorio de Marcadores Hormonales (ULPGC) (1989-1994), en el Medical Nutrition Department (NOVUM) (1994-1996) y el Center for Molecular Medicine (CMM) (2000-2001) del Instituto Karolinska (Suecia). Desde 2007 es Investigador Afiliado al CMM. Este centro ha servido de laboratorio de referencia para la formación predoctoral de estudiantes que han realizado su programa de doctorado en la ULPGC. Ha sido fundador y coordinador, hasta la actualidad, del grupo de investigación en Endocrinología Molecular y Traslacional de la ULPGC. Su actividad investigadora está centrada en la comprensión de los mecanismos moleculares que participan en las acciones hormonales, fundamentalmente relacionada con esteroides y citoquinas. Desde el punto de vista tecnológico ha sido pionero en la implementación y desarrollo de la tecnología de DNA microarrays (exploración funcional y a gran escala del genoma) en nuestro entorno y en las áreas de Endocrinología y Farmacología experimentales. Su nombre también ha estado vinculado a la identificación de receptores de membrana para esteroides anabolizantes y glucocorticoides así como al estudio de los mecanismos que regulan la sensibilidad celular a la Hormona de Crecimiento. En la actualidad, coordina la labor docente en la Facultad de Ciencias de la Salud de la ULPGC con la de investigador principal de un Proyecto Nacional MICINN para la investigación preclínica de nuevos fármacos antitumorales y antiinflamatorios. Regularmente, es invitado como revisor de revistas internacionales de alto impacto en los campos de la Farmacología y Endocrinología experimentales.

Dirección: Universidad de Las Palmas de GC, Facultad de Ciencias de la Salud, Dpto. Ciencias Clínicas-Farmacología, Plaza Dr. Pasteur s/n. Campus de San Cristóbal, 35016. Las Palmas de Gran Canaria

Teléfono: 928 452736

Correo electrónico: lfernandez@dcc.ulpgc.es