

Osteopontina: un regulador del metabolismo lipídico y biliar hepático

Maitane Núñez-García¹, Beatriz Gómez-Santos¹, Marta R. Romero², Jose J.G. Marin², Marco Briones-Orta³, Wing-Kin Syn³, Olatz Fresnedo¹, Patricia Aspichueta^{1,4}

¹Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Basque Country UPV/EHU; ²Laboratory of Experimental Hepatology and Drug Targeting (HEVEFARM), CIBERehd, IBSAL, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ³Regeneration and Repair Group, The Institute of Hepatology, Foundation for Liver Research, London, UK; ⁴Biocruces Research Institute

La osteopontina (OPN), glicoproteína sobreexpresada en numerosos procesos patológicos, está involucrada en la patogénesis de la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA)¹ y en el desarrollo de fibrosis hepática y hepatocarcinoma². Su expresión hepática está incrementada en obesidad³ y se correlaciona con la resistencia a insulina⁴. Sin embargo, se desconoce si OPN ejerce algún efecto como regulador metabólico hepático. Estudios preliminares mostraron que la ausencia de OPN provoca cambios en el lipidoma y metaboloma hepático así como el incremento del CE hepático 24 horas post-hepatectomía parcial. **Los objetivos principales de este trabajo fueron analizar la implicación de OPN en la regulación de la síntesis de novo de lípidos en el hepatocito e identificar su asociación con cambios en el metabolismo biliar hepático.**

MATERIALES Y MÉTODOS:

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS:

Se emplearon ratones hembra de 10 semanas de edad OPN-KO y controles (C57BL/6J; WT) de Jackson Laboratories. A un grupo de 5 ratones se administró OPN recombinante (rOPN) (15 µg/ratón; R&D Systems) en suero fisiológico como vehículo y al otro se le administró únicamente el vehículo vía intravenosa en dos días alternos. Por otro lado, a otro grupo de 4 ratones se les administró Atorvastatina (100 mg/kg) vía oral, durante dos semanas en días alternos. Se aislaron y purificaron hepatocitos de los animales en estudio empleando el método descrito por Smedsrød y Pertoft⁵.

SILENCIAMIENTO DE OPN EN CÉLULAS HUH7:

Para los estudios de silenciamiento de OPN, se utilizó la línea celular HUH7. Tras la siembra las células se transfectaron empleando 4 µg de un plásmido shOPN RNA y su respectivo control. Se comprobó mediante western blot⁶ que 48 h después de la transfección, en los cultivos transfectados con el plásmido control se expresó OPN y en los silenciados no. Dos días después de la transfección, las células fueron tratadas con Atorvastatina (100 nM) durante 48 h.



INCORPORACIÓN DE ACETATO RADIACTIVO:

Cultivos primarios de hepatocitos se incubaron con [³H] acetato (20 µM, 20 µCi/mL) tal y como describen Aspichueta y cols⁷. Las células se procesaron a los tiempos indicados, los lípidos se extrajeron⁸, separaron⁹ y el tritio incorporado en los lípidos se determinó mediante centelleo líquido.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS:

Los lípidos (TAG, DAG, PC y PE) se cuantificaron mediante TLC y análisis de imagen según Ruiz y Ochoa⁹, tras la extracción (Bligh y Dyer¹⁰) de homogenizado hepático.

HPLC-MS/MS METHOD

Los ácidos biliares de las muestras de hígado se extrajeron en fase sólida (Sep-Pack Plus C18) tal y como lo indican Monte y cols¹¹. Se analizaron en un HPLC-MS/MS¹² (6410 Triple Quad LC/MS, Agilent Technologies), siguiendo una modificación del método descrito por Ye y cols¹³. La separación cromatográfica se realizó mediante elución en gradiente en una columna Zorbax Eclipse a 35 °C y flujo de 0,5 ml/min, seguida de ESI y detección en modo negativo.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA:

Los niveles relativos de mRNAs en extractos de RNA total (Trizol) se determinaron mediante la cuantificación por RT-PCR empleando la plataforma Biomark HD (Fluidigm Corporation; SGIker UPV/EHU). El procesamiento y análisis de los datos se realizó mediante el software GenEx.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados son la media ± SEM de una n= 4-7. Para determinar la significancia estadística se utilizó el test t Student y la Anova de una o dos vías.

REFERENCIAS:

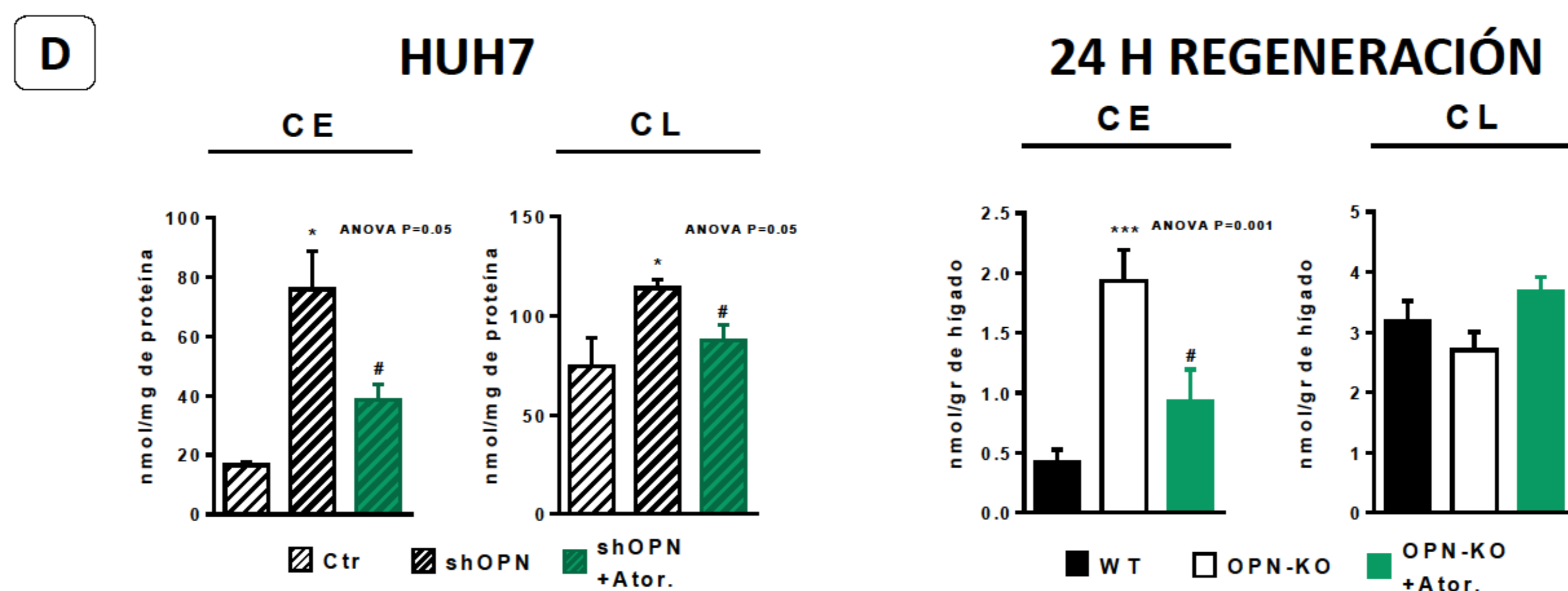
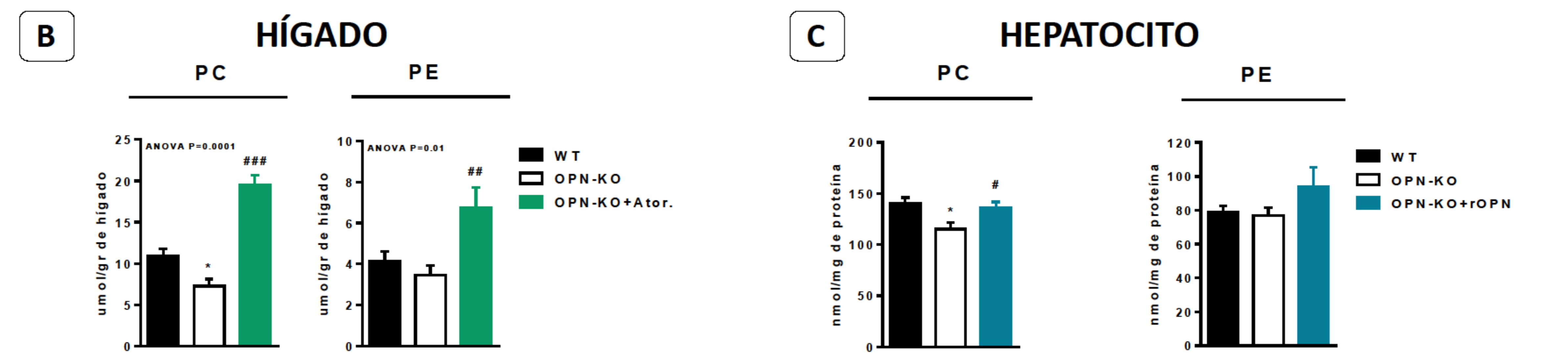
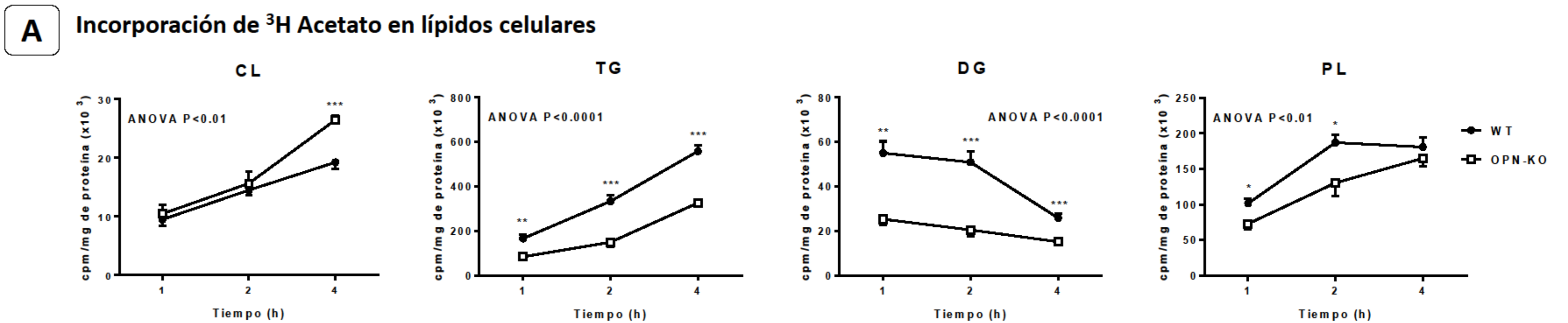
- Syn WK, Choi SS, Liaskou E, y cols. 2011. Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 53(1):106-15.
- Shang S, Plymoth A, y cols. 2012. Identification of osteopontin as a novel marker for early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 55(2):483-90.
- Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Ramírez B, Rodríguez A, y cols. 2007. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 92:3719-27.
- Chapman J, Miles PD, Offerio JM, y cols. 2010. Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS one*. 5(11): 1-14.
- Smedsrød B, Pertoft H. 1985. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J Leukoc Biol*. 38(2):213-30.
- Choi SS, Claridge LC, Jhaveri R, Swiderska-Syn M, Clark P y cols. 2014. Osteopontin is up-regulated in chronic hepatitis C and is associated with cellular permissiveness for hepatitis C virus replication. *Clin Sci (Lond)*. 126(12):845-55.
- Aspichueta P, Perez S, Ochoa B, Fresnedo O. 2005. Endotoxin promotes preferential periportal upregulation of VLDL secretion in the rat liver. *J Lipid Res*. 46: 1017-26.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 226(1):497-509.
- Ruiz J y Ochoa B. 1997. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *Journal of lipid research*. 38: 1482-88.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*. 37 (8): 911-91.
- Monte MJ, Martínez-Díez MC, El-Mir MY, Mendoza ME, Bravo P, Bachs O, Marin JJ. 2002. Changes in the pool of bile acids in hepatocyte nuclei during rat liver regeneration. *J Hepatol*. 36: 534-542.
- Nytofte NS, Serrano MA, Monte MJ, Gonzalez-Sanchez E, Turner Z, Ladefoged K, Briz O, Marin JJ. 2011. A homozygous nonsense mutation (C214C>A) in the biliverdin reductase alpha gene (BLVRA) results in accumulation of biliverdin during episodes of cholestasis. *J Med Genet*. 48: 219-225.
- Ye L, Liu S, Wang M, Shao Y, Ding M. 2007. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 860(1): 10-17.

ABREVIATURAS:

Ácido beta-muricólico (b-MC), ácido biliar (AB), ácido glicocólico (GC), ácido glicoursodesoxicólico (GUDC), ácido hiodoxicólico (HioDC), Atorvastatina (Ato), "ATP-binding cassette, sub-family B" (Mdr2), diacilglicerido (DG), colesterol libre (CL), colesterol esterificado (CE) cromatografía en capa fina (TLC), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfolípidos (PL), "hepatocyte nuclear factor 4, alpha" (Hnf4a), "liver receptor homologe 1" (Lrh1), osteopontina recombinante (rOPN), "small hairpin" osteopontina (shOPN), solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1" (Ntcp), triacilglicerido (TG).

RESULTADOS:

Figura 1: La falta de OPN provoca cambios en el contenido lipídico hepático ligados a cambios en la síntesis de novo lipídica.



En la línea celular HuH7, el silenciamiento de OPN provoca el incremento en la concentración de CE (D), como lo hace durante la regeneración hepática (D); en ambos casos el aumento se revierte por administración de atorvastatina. En lo referente a CL, el silenciamiento en OPN en las Huh7 está asociado al incremento en su concentración, que se revierte con atorvastatina. Sin embargo, no se observan cambios en CL tras 24 h post hepatectomía parcial.

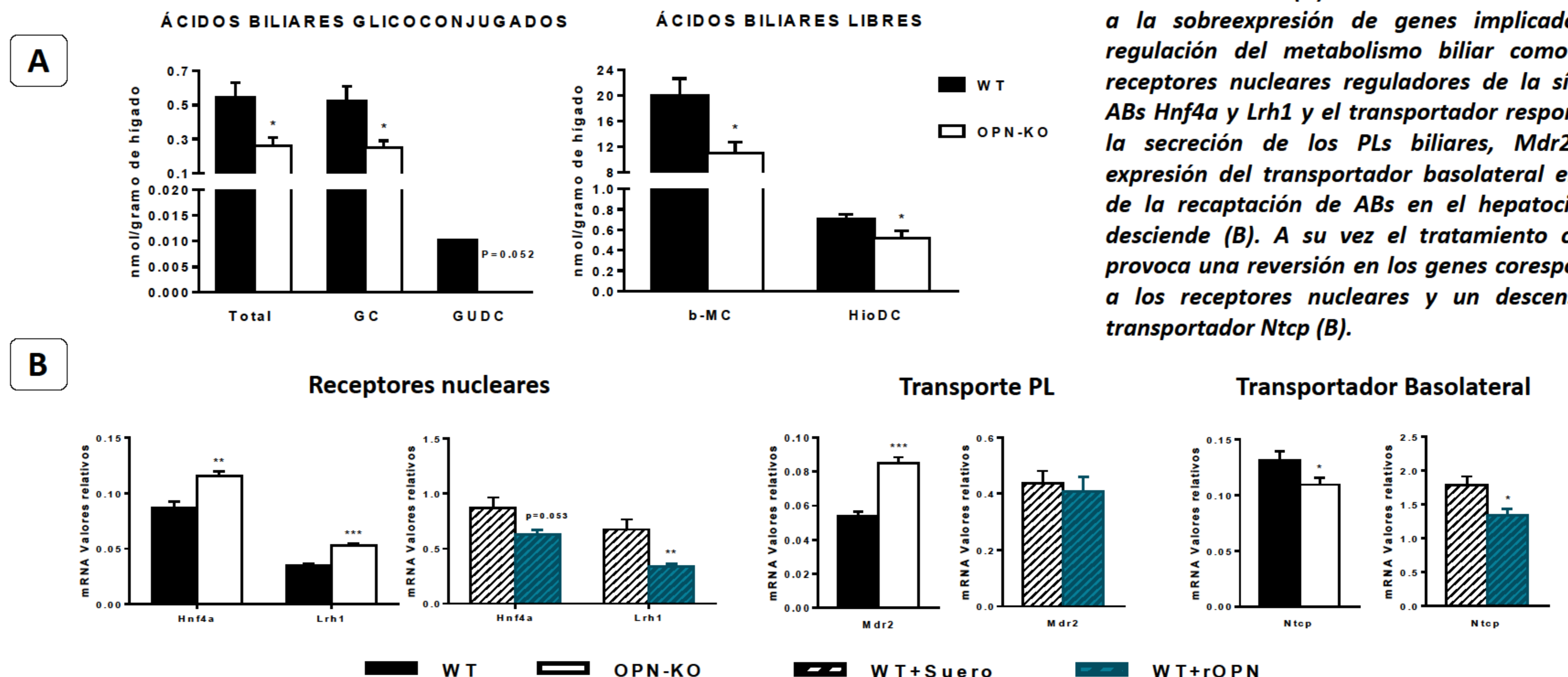
En hepatocitos aislados de ratón la ausencia de OPN deriva en el incremento de la síntesis de novo de CL y en el descenso de la síntesis de novo de TG, DG y PL (A).

Estos cambios están asociados al descenso en la concentración en PC en hígado (B) y hepatocitos (C) que revierte tras exposición a OPN recombinante (C) o por tratamiento in vivo con atorvastatina (B). A su vez, no se produce un descenso estadísticamente significativo a causa de la carencia de OPN, a pesar de que haya un ligero descenso en la concentración de PE (B y C), ambos tratamientos provocan un aumento de los niveles de PE tanto en el hepatocitos como en el hígado (B y C).

Figura 2: La ausencia de OPN resulta en la remodelación del metabolismo hepático biliar.

En cuanto al análisis de ácidos biliares (AB), los resultados muestran que la ausencia de OPN resulta en el descenso en el contenido total de ABs glicoconjugados, principalmente en el ácido glicocólico y glicoursodesoxicólico y en especies moleculares de ABs libres como el ácido beta-muricólico

y hiodoxicólico (A). Estos cambios están asociados a la sobreexpresión de genes implicados en la regulación del metabolismo biliar como son los receptores nucleares reguladores de la síntesis de ABs Hnf4a y Lrh1 y el transportador responsable de la secreción de los PLs biliares, Mdr2 (B); la expresión del transportador basolateral encargado de la recaptación de ABs en el hepatocito, Ntcp, desciende (B). A su vez el tratamiento con rOPN provoca una reversión en los genes correspondientes a los receptores nucleares y un descenso en el transportador Ntcp (B).



CONCLUSIÓN:

La osteopontina es un regulador esencial del metabolismo lipídico y biliar. Los resultados sugieren que la falta de OPN resulta en el incremento en la síntesis de novo de CL y vinculado a un aumento en su utilización en la vía biliar, lo que a su vez podría inducir un incremento de secreción de PC y el descenso en su contenido hepático. Nuestras evidencias indican que estas adaptaciones del metabolismo lipídico podrían ser consecuencia del papel de la OPN extracelular en el mantenimiento del metabolismo biliar en el hepatocito.

Subvencionado por GV (IT-336-10) y UPV/EHU (UFI11/20)