



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador

Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Facultad de Ingeniería

Maestría en Biología Computacional

**Análisis de la expresión diferencial y las vías de  
señalización involucradas en la hepatotoxicidad inducida  
por APAP a las 6 horas vs.24 horas en ratones**

Maestrante: María Gabriella Rodríguez Marcano, Fctica.

Tutor: Doris Vela, PhD.

Quito, 05 de marzo de 2023

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Metodología.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Búsqueda de conjuntos de datos de chip de ADN.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Identificación de expresión diferencial de genes (DEG).....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Anotación de ontología genética y análisis de enriquecimiento de rutas KEGG de la DEG.....</b>	<b>8</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Descripción general de los datos de microarreglos ómnibus de expresión génica e identificación de genes expresados diferencialmente.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Análisis de enriquecimiento funcional de ontología génica.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Análisis de enriquecimiento de rutas de genes y genomas de Enciclopedia de Kioto.....</b>	<b>14</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 DEG.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 KEGG.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1 Vía de señalización p53.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.2 Vía de señalización IL-17.....</b>	<b>23</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>24</b>
<b>6. REFERENCIAS.....</b>	<b>26</b>

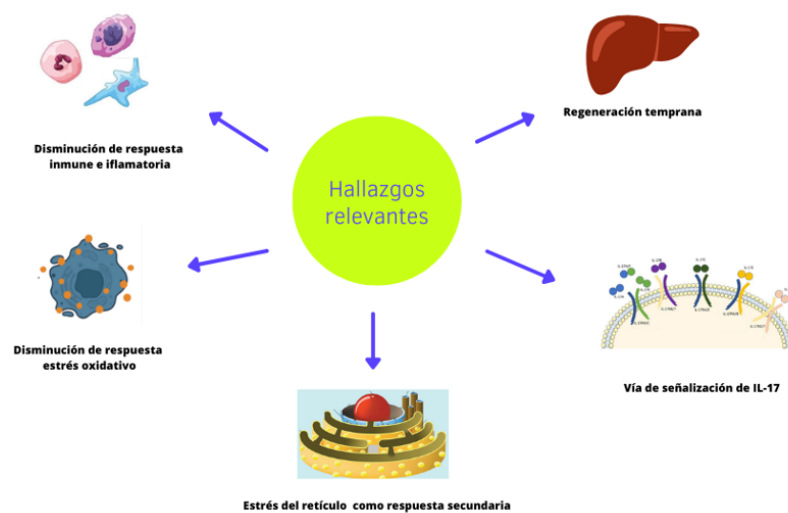
## **RESUMEN**

El acetaminofén (APAP), también conocido como paracetamol, es uno de los analgésicos más seguros y más comúnmente utilizados en el mundo para el tratamiento del dolor y la fiebre. Con frecuencia, el APAP ha estado implicado en sobredosis intencionales o no intencionales en las que puede causar daños graves como lesión hepática aguda e incluso insuficiencia hepática aguda. El único antídoto aprobado para uso clínico es la N-acetilcisteína, la cual, sin embargo, no es efectiva una vez transcurridas 24 horas de la intoxicación, justamente el tiempo cuando generalmente se presentan los pacientes en los centros de salud.

Por lo antes expuesto, se considera necesario encontrar nuevas moléculas con aplicación clínica que permitan tratar con efectividad la etapa tardía de la intoxicación (después de 24 horas en humanos). Para ello, es indispensable un mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción del APAP, y este conocimiento incluye identificar los genes expresados diferencialmente y el análisis de enriquecimiento ontológico-funcional para la dilucidación de las vías involucradas en la toxicidad tardía.

En el presente estudio se realizó una comparación de la expresión diferencial de genes en un modelo de ratón en las etapas temprana vs tardía para identificar los genes expresados diferencialmente (DEG) entre los grupos control, APAP\_6horas (toxicidad temprana en ratón) y APAP\_24horas (toxicidad tardía en ratón). El análisis se realizó mediante a herramienta en línea GEO2R y luego se aplicó el análisis de enriquecimiento de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) para dilucidar las vías de señalización relevantes de los DEG involucrados, empleando la base datos para anotación DAVID.

Los genes relevantes identificados diferencialmente entre APAP\_6horas y APAP\_24horas (Btg2, Ier2, Gdf15, Cyp2c37, Serpine1, S100a8, Pald1//Thbs1 y Fos) se encuentran relacionados con la regeneración temprana, estrés oxidativo e inicio de la atenuación del daño celular. Mientras que la vía principal involucrada en el análisis de enriquecimiento de genes fue el de la citoquina IL-17 por lo que podría pensarse en esta interleuquina como un posible blanco terapéutico para esta fase tardía de la intoxicación. Se sugiere complementar este estudio con una generación y análisis de una red de interacción proteína-proteína (PPI) a fin de interpretar los mecanismos moleculares diferenciales de las actividades celulares clave en la toxicidad por APAP en la etapa tardía.



**Resumen gráfico: Toxicidad temprana vs tardía de APAP**

## 1. INTRODUCCIÓN

El acetaminofén (APAP, siglas del inglés N-Acetil-P-Aminophenol), también conocido comercialmente como paracetamol, es uno de los analgésicos más seguros y más comúnmente utilizados en el mundo para el tratamiento de dolor y fiebre. Sin embargo, debido a su amplia disponibilidad y falta de regulación, con frecuencia está implicado en sobredosis intencionales o no intencionales en las que puede causar daños graves como lesión hepática aguda (AILI, del inglés APAP-induced acute liver injury) e incluso insuficiencia hepática aguda (ALF, siglas del inglés Acute Liver Failure). La toxicidad de APAP es la principal causa de casos de ALF a nivel mundial y es responsable de 500 muertes al año solo en Estados Unidos, así como de 100.000 llamadas a centros de control de intoxicaciones, 50.000 visitas a salas de emergencia y 10.000 hospitalizaciones al año (Lee, 2017; Bunchorntavakul y Reddy, 2018; Ramachandran y Jaeschke, 2019).

A pesar del problema de salud pública que representa la hepatotoxicidad por APAP, únicamente se cuenta con un antídoto aprobado para uso clínico: la N-acetilcisteína (NAC). La NAC, sin embargo, algunas veces puede presentar efectos secundarios y no es tan efectiva después de la ingestión de altas dosis de APAP. Adicionalmente, la eficacia de la NAC disminuye una vez transcurridas 8 horas de la ingestión, siendo poco efectiva después de 24 horas desde la intoxicación. Con frecuencia, especialmente los casos de ingestiones no intencionales, las intoxicaciones con APAP son evidenciadas en etapas relativamente tardías por lo que el uso de NAC es significativamente menos eficaz (Jaeschke et al., 2020; Jaeschke et al., 2021; Ramachandran y Jaeschke, 2017).

Los mecanismos de la lesión hepática inducida por APAP son muy complejos y muchos eventos intracelulares y extracelulares están involucrados en este proceso fisiopatológico, incluido el metabolismo de APAP, el estrés oxidativo mitocondrial, el estrés del RE, la autofagia, la inflamación estéril, la disfunción microcirculatoria y la regeneración hepática (Ramachandran y Jaeschke, 2017). Estos eventos regulan varios aspectos de lesión hepática inducida por APAP, como iniciar la lesión, mediar directamente en la muerte de los hepatocitos, limitar la respuesta al estrés celular y ayudar al hígado a repararse y regenerarse. Como tal, las estrategias terapéuticas dirigidas a estos eventos pueden no ser beneficiosas al final, una preocupación que se ha reflejado en ciertos estudios preclínicos. En general, se necesitan más estudios para aclarar de mejor manera el papel preciso de estos eventos dependientes del tiempo en la lesión hepática aguda inducida por APAP, y así encontrar opciones terapéuticas que puedan emplearse en cualquier estadio de la intoxicación (Yan et al., 2018; Jaeschke et al., 2021).

Los estudios mecanísticos llevados a cabo hasta el momento no han sido efectivos para encontrar una opción terapéutica con uso clínico, además de la NAC. En muchos casos estos estudios presentan errores en el uso de los modelos de hepatotoxicidad según se ha reportado por Jaeschke et al. en 2021. Uno de estos errores en el modelo en ratón consiste en no medir en diferentes tiempos, correspondientes a los distintos estadios de la intoxicación en los cuales se modifican determinados parámetros (p. Ej. Actividad del citocromo P450, Aductos de proteína NAPQI, Fragmentación de ADN nuclear, entre otros) (Jaeschke et al., 2021).

En el modelo de hepatotoxicidad en ratón, cuyos eventos mecanísticos son idénticos al del humano (Ramachandran y Jaeschke, 2017), existen 4 fases que determinan el curso temporal de la intoxicación por APAP: Fase de metabolismo 0-3 h post APAP (dependiendo de la dosis),

Fase de lesión temprana (2-6 h post APAP), Lesión tardía-fase de recuperación temprana (12-24 h post APAP) y Fase de regeneración (24-96 h post APAP). Investigaciones más recientes sobre la hepatotoxicidad por APAP han establecido el papel crítico de la disfunción mitocondrial en la mediación de la lesión hepática, y se han aclarado los mecanismos de muerte celular de los hepatocitos inducida por APAP. A partir de este nuevo conocimiento, se establece que el estrés oxidativo y nitrosativo mitocondrial es una característica mecánica clave involucrada en la señalización de esta intoxicación. También, la identificación de mediadores específicos de la muerte celular necrótica ha establecido la naturaleza regulada de la muerte celular de los hepatocitos inducida por APAP. Finalmente, el descubrimiento del papel de la dinámica mitocondrial y la autofagia en la lesión hepática producida por APAP proporciona información adicional sobre los elaborados mecanismos de señalización celular implicados en la patogenia de este importante problema clínico (Ramachandran y Jaeschke, 2017).

En los estudios realizados hasta la fecha para encontrar moléculas con potencial terapéutico, no se han considerado las fases de la toxicidad por APAP (metabólica, lesión temprana/tardía y regeneración) lo que ha llevado a conclusiones erradas acerca del mecanismo de acción protector de los compuestos ensayados (Jaeschke et al., 2021). A pesar de los importantes avances que se han realizado para dilucidar el mecanismo de acción del APAP (Ramachandran y Jaeschke, 2017), se considera necesario un mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción del APAP, que incluya los genes expresados diferencialmente y el análisis de enriquecimiento ontológico-funcional, lo cual podría mejorar el diseño de los estudios y permitir encontrar nuevas moléculas con aplicación clínica.

En resumen, la hepatotoxicidad por APAP es un problema de salud pública mundial favorecido por el fácil acceso que se tiene a este medicamento de venta libre y su amplio uso

como antipirético y analgésico. La única opción terapéutica disponible en el mercado, la NAC, no ofrece una respuesta adecuada cuando se emplea en la fase tardía de la intoxicación. A los fines de encontrar nuevos tratamientos para la intoxicación con APAP, es imprescindible que se realicen estudios que permitan dilucidar el mecanismo detallado del efecto tóxico del APAP.

## **2. Metodología**

### ***2.1 Búsqueda de conjuntos de datos de chip de ADN***

Se seleccionaron datos de expresión genética obtenidos mediante chip de ADN con la tecnología Affymetrix en muestras de hígado de ratones macho cepa C57BI6/N. Affymetrix es una plataforma comercial de chip de ADN que permite el análisis de la expresión génica del genoma completo para una amplia variedad de organismos experimentales (Jiang et al., 2008).

Según Jaeschke y colaboradores en 2021 (Jaeschke et al., 2021) en el modelo de intoxicación por APAP en ratones la fase de lesión temprana se produce entre las 2-6 horas, y la tardía e inicio de la recuperación de 12-24 horas post administración de APAP. Por esta razón se tomaron los puntos post administración de APAP de 6 horas y 24 horas del estudio de Holland (Holland et al., 2022) para realizar la comparación. En el estudio original del que se extrajeron los datos de microarreglo (Holland et al., 2022), los autores indican que las diferencias con los controles fueron mayores entre las 12 horas y el día 2, y posteriormente regresaron a los niveles de control con lo cual se confirma la pertinencia de la elección de estos dos puntos de tiempo (6 horas y 24 horas postadministración de APAP).

Los conjuntos de datos (chip de ADN) que contienen la expresión genética en hígados de ratones tratados con 300 mg/Kg de p.c. de APAP a las 6 horas y 24 horas se recuperaron de la

base de datos DrugMatrix (<https://ntp.niehs.nih.gov/data/drugmatrix/>) la cual constituye una de las mayores fuentes de recursos de referencia toxicogenómica disponibles al público para realizar análisis genéticos completos (Ganter et al., 2006).

## ***2.2 Identificación de expresión diferencial de genes (DEG)***

Los DEG entre los grupos control, APAP\_6horas y APAP\_24horas se extrajeron y analizaron mediante GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). GEO2R es una herramienta de análisis web integradora que contribuye a identificar DEG entre diferentes grupos de muestras. Los valores de corte de los DEG se definieron como un valor de  $P < 0,05$  y un logaritmo de cambio de pliegue o fold change (logFC)  $>2$ . Posteriormente, se analizaron los diagramas obtenidos para determinar los DEG comunes.

## ***2.3 Anotación de ontología genética y análisis de enriquecimiento de rutas KEGG de la DEG.***

El análisis de ontología génica (GO) es una parte importante de la investigación de genómica funcional, que se aplica para anotar el proceso biológico, la composición celular y la función molecular de todos los genes en el genoma (Xie et al., 2020). Se aplicó el análisis de enriquecimiento de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) para dilucidar las vías de señalización relevantes de los DEG involucrados.

Para analizar la función biológica de los datos anotados de GO se empleó la base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID; versión 6.7; <http://david.ncifcrf.gov>) la cual es una base de datos bioinformática en línea que proporciona

información de anotación biométrica integrada de genes (Zhou et al., 2020). Se utilizó el valor de  $P < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### 3. Resultados

#### 3.1 Descripción general de los datos de microarreglos ómnibus de expresión génica e identificación de genes expresados diferencialmente.

Para el GEO de accesión GSE167032, se estableció un valor de  $p$  ajustado  $< 0,05$  y un fold change o cambio de pliegue  $\geq$  dos veces como límite para ser considerado un gen expresado diferencialmente estadísticamente significativo. Se seleccionaron un total de 8138 genes significativos según el análisis GEO2R para GSE167032. Mediante el uso de un diagrama de Venn, se identificaron elementos únicos de los grupos APAP\_6 horas, APAP\_24 horas y Control. Se extrajeron un total de 938 DEG comunes de los 3 grupos después de la comparación (Figura 1), de los cuales 37 se expresaron diferencialmente en los 3 grupos, 17 sobrerregulados y 20 subregulados.

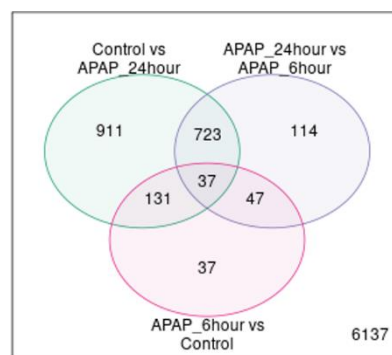


Figura 1. Diagrama de Venn

En la figura 2 se observan los gráficos de volcán (Volcano Plot) de la expresión de genes subexpresados (azul) y sobreexpresados (rojo). En la figura 3 del gráfico dimensional UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection), de GEO2R, confirmamos que los tres

grupos (APAP\_6 horas, APAP\_24 horas y Control) se encuentran en áreas separadas, lo cual significa que tienen características que les diferencian. En la figura 4 del gráfico de caja (Boxplot) se puede observar los diferentes grupos que se desean comparar, indicados por las barras de colores, y se muestran las medianas ubicadas aproximadamente en el mismo nivel (6) por lo que se demuestra que los grupos son comparables. El grupo de genes de importancia identificados en cada una de las comparaciones fueron los que se indican en la tabla 1.

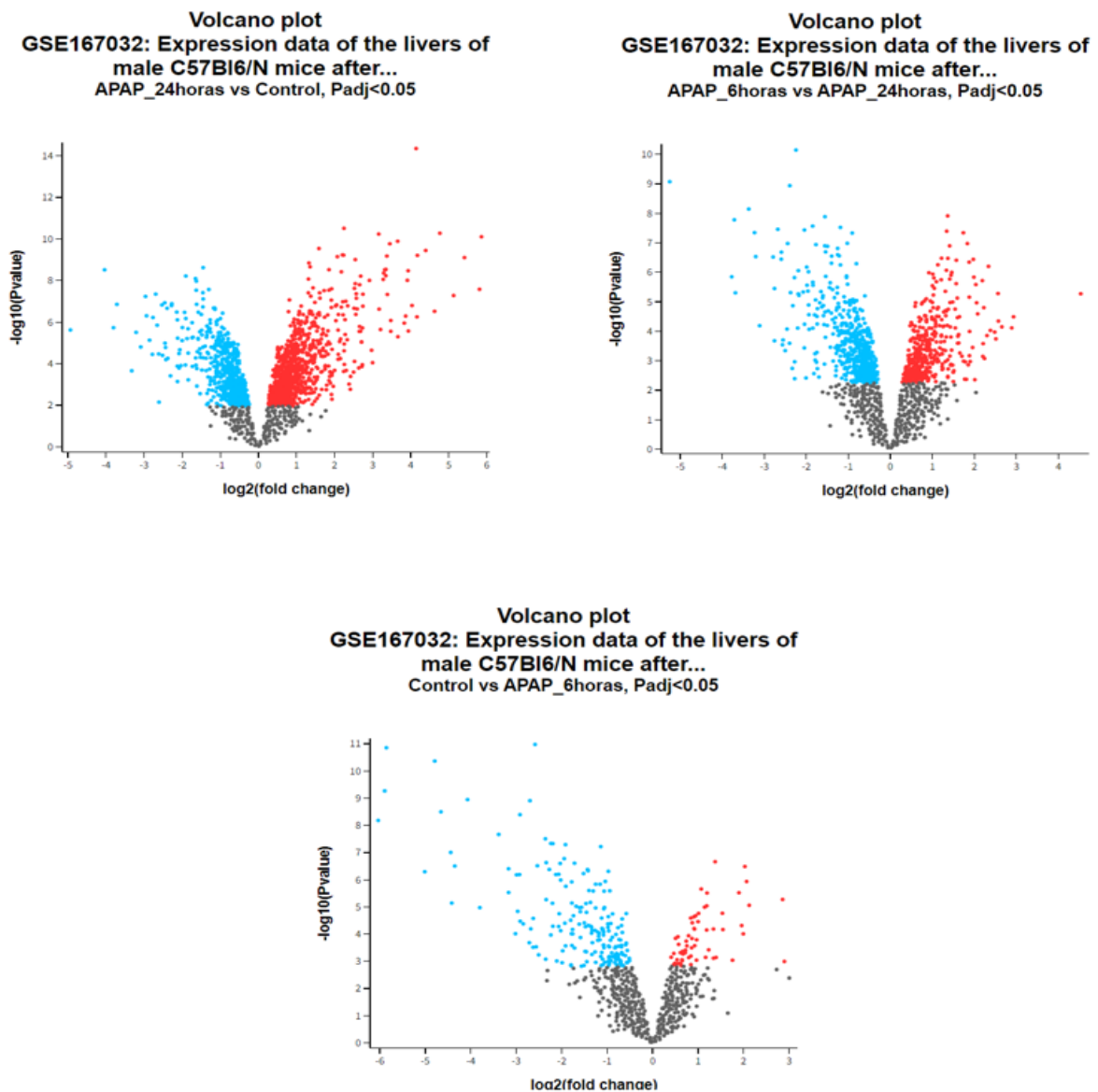


Figura 2. Gráficos tipo volcán GSE167032: Datos de expresión en los hígados de ratones macho C57BI6/N después de la administración I.P. de paracetamol (APAP)

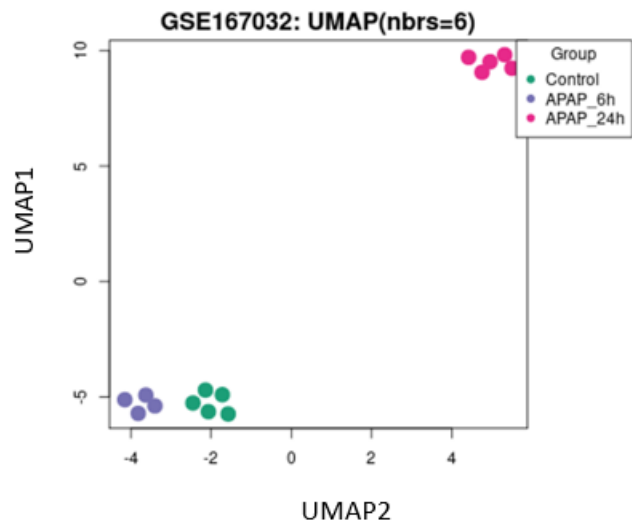


Figura 3. Gráfico unidimensional UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection). Datos de expresión en los hígados de ratones macho C57BI6/N después de la administración I.P. de paracetamol (APAP)

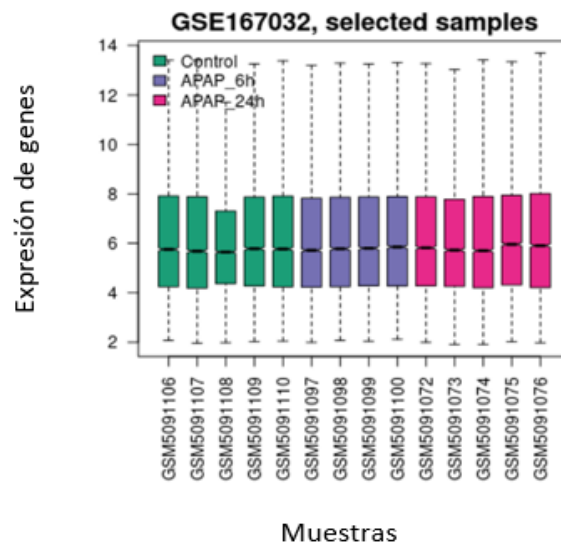


Figura 4. Gráfico de caja (Boxplot). Datos de expresión en los hígados de ratones macho C57BI6/N después de la administración I.P. de paracetamol (APAP)

Tabla 1. Genes significativos en los grupos Control, APAP\_6h y APAP\_24h. Datos de expresión en los hígados de ratones macho C57BI6/N después de la administración I.P. de paracetamol (APAP)

Genes de expresión diferencial APAP 6 h vs. 24 h	
Subexpresados	Sobrexpresados
Pgd	Gdf15
Fosl1	Fos
Gm3776///Gsta2///Gsta1	Ier2
Cd93	Btg2
Tubb6	Oat
Fabp4	Sucnr1
Pald1///Thbs1	Jun
S100a8	Egr1
Tardbp	Cxcl10
Serpine1	Maff
Chic2	Ets2
Cpsf2	Cyp2c50
Rpl22l1	Sgk1
Pecam1	Zfand5
Krt8	Cebpa
(Krt8)	Gm13363///Ptp4a1
Mcam	Slc22a1
	(Zfand5)
	Gm12657///Gm6749///H3f3c///Gm10257///H3f3b///H3f3a
	Cyp2c37

Tabla 2. Comparación de expresión genética a las 6 horas vs. 24 horas de genes significativos con logFC >2. Datos de expresión en los hígados de ratones macho C57BI6/N después de la administración I.P. de paracetamol (APAP)

ID	Símbolo del gen	Título del gen	Función	Expresión
1416250_at	Btg2	Gen de translocación de células B 2	Antiproliferativa	Sobrexpresado
1416442_at	Ier2	Gen 2 de proteína de respuesta temprana inmediata	Activación de transcripción	Sobrexpresado
1418949_at	Gdf15	Factor 15 de crecimiento/diferenciación	Activación de transcripción	Sobrexpresado
1419094_at	Cyp2c37	Monooxigenasa del citocromo P450. Familia 2. Subfamilia c, polipéptido 37.	Monooxigenasa	Sobrexpresado
1423100_at	Fos	Protooncogén Fos, subunidad del factor de transcripción AP-1	Proliferación, diferenciación y transformación celular	Sobrexpresado
1419149_at	Serpine1	Inhibidor de proteinasa de serina (o cisteína), clado E, miembro 1.	Inhibición de la fibrinólisis	Subexpresado
1419394_s_at	S100a8	Proteína relacionada con el factor inhibidor de la migración 8 (calgranulina A)	Progresión de ciclo celular y diferenciación	Subexpresado
1421811_at	Pald1///Thbs1	Paladina con dominio de fosfatasa 1///Trombospondina 1	Unión celular	Subexpresado

### *3.2 Análisis de enriquecimiento funcional de ontología génica*

Se realizaron tres categorías de análisis de anotación funcional GO de los genes de importancia en la comparación 6 horas vs. 24 horas (Tabla 2), incluido el proceso biológico, el componente celular y la función molecular. Como se muestra en la Tabla 2 los resultados del análisis GO para los DEG comunes indicaron que en el proceso biológico los genes sobreexpresados se enriquecieron en los procesos relacionados con la transcripción, antiproliferación, transcripción y diferenciación como los genes *Btg2*, *Gdf15* y *Ier2*, además del metabolismo de lípidos como el gen de la monooxigenasa *Cyp2c37*. Los genes que pertenecen a los grupos regulados a la baja estaban predominantemente asociados con los procesos inflamatorios y de respuesta inmune, así como la respuesta al estrés oxidativo y regulación de la fibrinólisis (Tabla 2).

Los componentes celulares encontrados de manera diferencial en el análisis por DAVID fueron la proteína KW-0964, ubicada en la matriz extracelular y la proteína del retículo endoplasmático KW-0256. Finalmente, para la función molecular, los genes sobreexpresados se enriquecieron en la actividad monooxigenasa, actividad proapoptótica y antiproliferativa. Mientras que los genes subregulados se enriquecieron en la actividad de MAPKinasa, NFk beta, unión a ARN y TGF-beta.

### 3.3 Análisis de enriquecimiento de rutas de genes y genomas de Enciclopedia de Kioto

Para analizar más a fondo las rutas enriquecidas de estos DEG, se realizó posteriormente un análisis de enriquecimiento de la ruta KEGG con los genes de la tabla 2 (comparación 6 horas vs. 24 horas). Como se muestra en el gráfico, el análisis de la vía KEGG reveló que los DEG se enriquecieron principalmente en la vía de señalización p 53 y en la vía de señalización de IL-17 (Figuras 4 y 5).

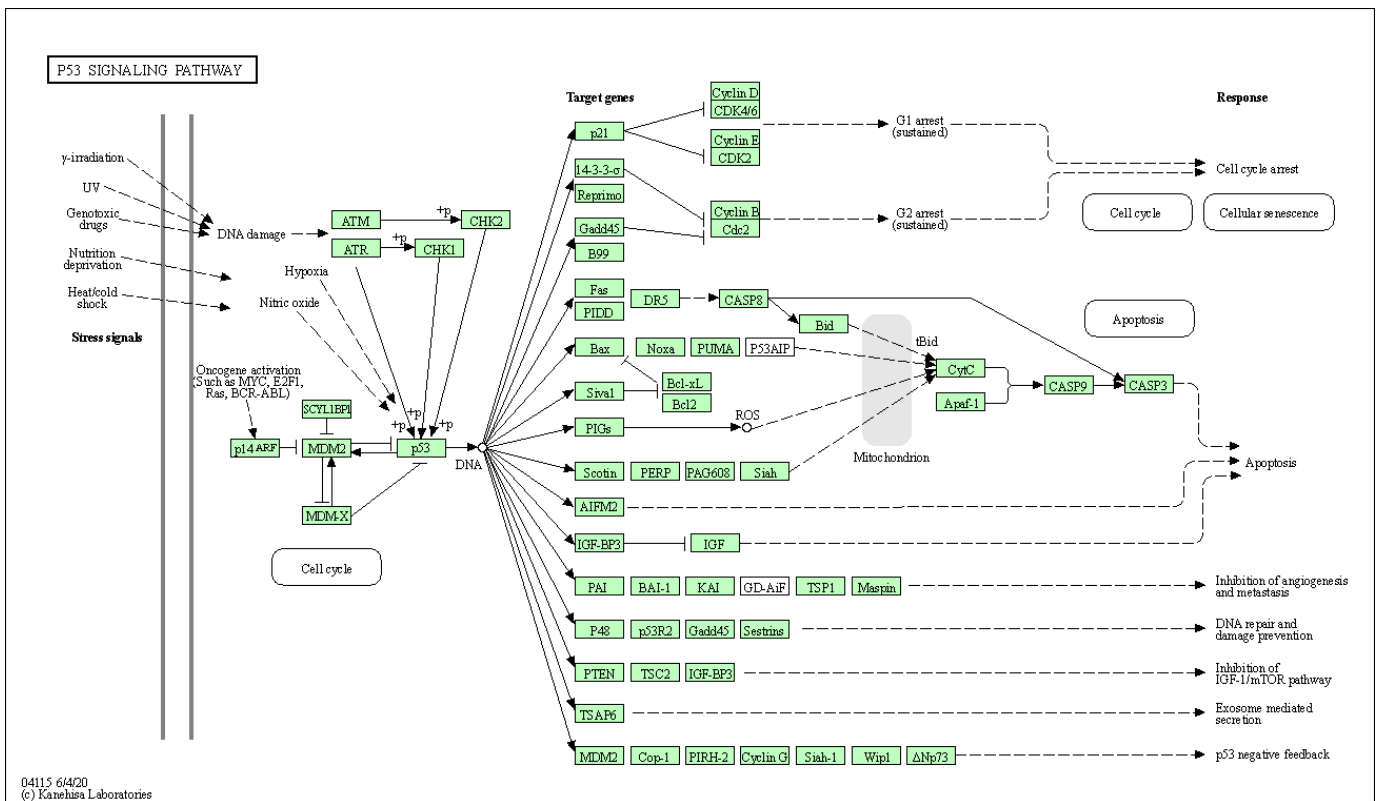


Figura 4. KEGG vía de señalización P53.

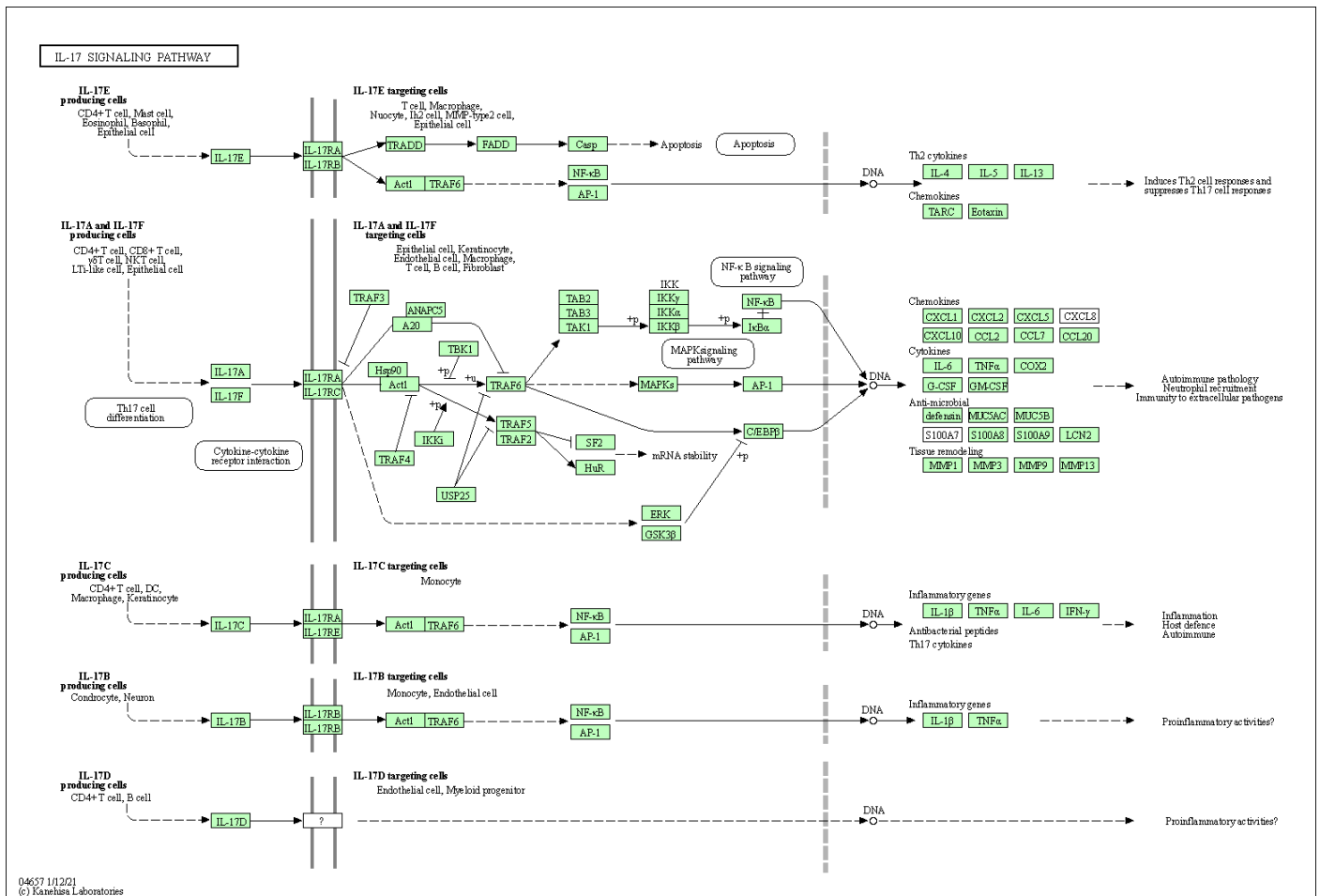


Figura 5. KEGG vía de señalización IL-17

## 4. DISCUSIÓN

Las investigaciones más recientes sobre la hepatotoxicidad por APAP han establecido el papel crítico de la disfunción mitocondrial en la mediación de la lesión hepática, así como han aclarado los mecanismos de muerte celular de los hepatocitos inducidos por APAP (Ramachandran et al., 2018). De este modo, ahora se ha establecido que el estrés oxidativo y nitrosativo mitocondrial es una característica clave del mecanismo involucrado en la señalización aguas abajo después de una sobredosis de APAP. La identificación de

mediadores específicos de la muerte celular necrótica establece además la naturaleza regulada de la muerte celular de hepatocitos inducida por APAP (Ramachandran et al., 2018; Ramachandran y Jaeschke, 2019). Adicionalmente, el descubrimiento del papel de la dinámica mitocondrial y la autofagia en la lesión hepática inducida por APAP añade información sobre los elaborados mecanismos de señalización celular implicados en la patogenia de este importante problema clínico. A pesar de estos nuevos conocimientos sobre los mecanismos de daño hepático, todavía existe una gran controversia sobre el papel de la inmunidad innata en la hepatotoxicidad inducida por APAP (Ramachandran et al., 2018; Ramachandran y Jaeschke, 2019).

Aunque la hepatotoxicidad por APAP se conoce y estudia desde hace muchos años, los avances para esclarecer su mecanismo de acción tóxico y, más aún, encontrar un antídoto efectivo en todas las etapas de la intoxicación no han sido del todo satisfactorios (Akakpo, 2021). A pesar de que la N-acetilcisteína (NAC) se utiliza con cierta efectividad terapéutica en los estadios iniciales de la intoxicación, no existe un antídoto de uso clínico que permita a los pacientes ser tratados en la fase tardía de la intoxicación. Parte del problema para encontrar una molécula efectiva en la etapa tardía, es el desconocimiento de los mecanismos de acción exactos que operan en la toxicidad por APAP (Akakpo, 2021).

En este estudio se utilizó un modelo de ratones induciendo una lesión temprana y una tardía a fin de encontrar las diferencias en estos dos estadios de la intoxicación y tener mejor comprensión de los mecanismos diferenciales involucrados.

#### **4.1 DEG**

El análisis de enriquecimiento de GO demostró que los genes de alta expresión estaban involucrados principalmente con el desarrollo, diferenciación y función celular (Btg2, Gdf15, Ier2) y metabolismo de lípidos (Cyp2c37) (Tabla 2). Estos hallazgos son compatibles con las investigaciones llevadas cabo en ratones a diferentes dosis por Bhushan et al. (Bhushan et al. 2014) en las cuales se estudió la regeneración hepática, encontrándose que a la dosis de 300 mg/Kg la cuantificación del total de células positivas para el antígeno nuclear de células en proliferación(PCNA) mostró evidencia de unas pocas células que ingresan al ciclo celular tan pronto como 3 horas luego de la administración de APAP (300 mg/Kg), pero solo se observó una respuesta de proliferación robusta con un aumento dramático en las células positivas para PCNA a partir de las 12 horas después del tratamiento con APAP, específicamente alrededor de las áreas necróticas (Bhushan et al. 2014).

La sobreexpresión del gen Cyp2c37 de las vías metabólicas de los lípidos (metabolismo del araquidonato) mostró discrepancia con los estudios *in vitro* realizados por Behrends en 2019 (Behrends et al., 2019) en el cual las conclusiones sugieren que un bloqueo del anabolismo, consistente con una reducción sustancial de la proliferación, es una consecuencia metabólica importante de la exposición a APAP en las células HepG2. Sin embargo, aquí hay que hacer un par de consideraciones importantes: por una parte, la comparación de los modelos *in vivo* e *in vitro* suele ser compleja, sobre todo para determinar la equivalencia en cuanto a las etapas (tempranas/tardías), y luego, en función del hallazgo contrapuesto al nuestro de los autores, se infiere que la etapa que ellos visualizaron es previa a la etapa tardía, ya que en esta última la proliferación se ve incrementada y no disminuida como encuentran en su estudio. Esperaríamos en una etapa tardía, como la que evaluamos, al menos el inicio de la recuperación de la actividad anabólica.

En cuanto a los genes de baja expresión, estos estaban predominantemente asociados con los procesos inflamatorios y respuesta inmune, así como la respuesta al estrés oxidativo y regulación de la fibrinólisis. A este respecto, existe una controversia entre los investigadores en relación a la respuesta inflamatoria estéril después de una sobredosis de APAP, ya que algunos piensan que esta respuesta está principalmente involucrada en la regeneración mientras que otros creen que agrava la lesión inicial. Ahora bien, si nos centramos en los aspectos clínicamente relevantes, en pacientes con sobredosis de APAP, la formación de citoquinas proinflamatorias es limitada y la activación de neutrófilos no ocurre durante la fase de lesión sino más durante la regeneración. De acuerdo con estos hallazgos de neutrófilos, los macrófagos derivados de monocitos que se reclutan durante la hepatotoxicidad por APAP muestran un fenotipo prorregenerativo en ratones y humanos, lo que sugiere que la respuesta inflamatoria se orienta principalmente hacia la recuperación de la lesión tisular (Jaechske, 2018). Recordando que a las 24 horas post-tratamiento en ratones se encuentra un estadio de lesión tardía e inicio del proceso de recuperación, entonces podemos afirmar que, según nuestros resultados, el proceso de regeneración es incipiente por la baja expresión de los genes asociados con el proceso inflamatorio lo cual también es coherente con los hallazgos de lesiones tardías.

La hepatotoxicidad por paracetamol APAP se caracteriza por un estrés oxidativo extenso. A pesar de las controversias en este sentido, el paradigma actual sugiere que las mitocondrias son la principal fuente de ROS, el cual altera la función mitocondrial y es responsable de la señalización celular que resulta en la muerte celular (Du, 2016).

Además de ser una fuente de radicales libres que inician eventos de señalización, las mitocondrias también actúan como plataformas de integración de señales, donde las proteínas

citósicas se translocan para amplificar el daño inducido por el estrés oxidativo inicial. Esto probablemente permite un efecto de umbral, de modo que los hepatocitos expuestos a niveles variables de radicales libres pueden responder de manera diferente para modular la respuesta funcional del hígado a la lesión. Este paradigma permitiría limitar la necrosis a las células expuestas a los niveles más altos de APAP alrededor del área centrolobulillar, evitando las células más alejadas, lo que podría estimular la recuperación y regeneración y permitir la posterior repoblación y recuperación de la función hepática. (Ramachandran et al., 2018). En el presente estudio se confirmó una disminución de la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo lo cual bien podría tener que ver con el efecto umbral que se alcanza en la etapa tardía de la lesión.

En cuanto al componente celular que se encontró diferencialmente, se destaca la proteína KW-0256, ubicada en el retículo endoplásmico. Se ha demostrado que el APAP induce estrés de retículo endoplasmático (ER) y que tales efectos deletéreos podrían jugar un rol fundamental en la muerte celular inducida por APAP en el hígado. Ahora bien, el mecanismo mediante el cual el APAP induce ER no está del todo claro hasta la fecha, aunque se plantea la posibilidad de que sea consecuencia de alteraciones microsomales secundarias a la generación del metabolito tóxico N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI) por la depleción de glutatión (GSH), peroxidación lipídica y un desbalance de la ER oxidorreductasa ERp72 y PDI en los microsomas (vesículas del retículo endoplasmático) hepáticos. Adicionalmente, NAPQI puede unirse covalentemente a varias proteínas microsomales lo cual podría inducir ER. La otra propuesta es que el ER podría ser secundario a la disfunción mitocondrial que produce el APAP, disfunción que se encuentra ampliamente documentada (Foufelle et al., 2016). Por lo tanto, es de esperarse que este incremento de la proteína KW-0256, ubicada en

el retículo endoplasmático, esté relacionada con una mayor actividad en este organelo debido al estrés oxidativo.

En la función molecular los genes sobreexpresados que se enriquecieron están relacionados con la actividad monooxigenasa, actividad proapoptótica y antiproliferativa (Btg2, Gdf15, Ier2, Cyp2c37). En referencia a la actividad proapoptótica es importante aclarar que los últimos estudios han revelado que cuando se seleccionan ciertos parámetros bioquímicos, parece que hay mucha evidencia de muerte celular apoptótica durante la lesión hepática inducida por APAP. Sin embargo, cuando se considera la falta de especificidad de estos parámetros para la apoptosis, es muy obvio que el apoyo es realmente débil, en el mejor de los casos. Además, si la hepatotoxicidad de APAP se compara directamente con un control positivo para la apoptosis y se usa una intervención selectiva como un inhibidor de caspasa, se observa una falta de protección del inhibidor frente a la toxicidad por APAP, por lo que es bastante claro que la apoptosis no es un modo de muerte celular cuantitativamente relevante durante el daño inducido por APAP. Actualmente no existe una justificación científica o evidencia experimental sólida para respaldar la hipótesis de que la apoptosis está involucrada de manera crítica en la hepatotoxicidad de APAP en cualquier modelo animal o *in vitro* relevante (Jaeschke et al., 2018).

Por todo lo anterior, a pesar de que la función molecular relacionada con la apoptosis se haya visto sobreexpresada habría que revisar cuidadosamente este punto para verificar que el tipo de elementos considerados sean exclusivos de la apoptosis (lo cual es lo menos probable dada la evidencia) o si son mecanismos comunes entre la apoptosis y la necrosis.

En relación a la sobreexpresión de genes relacionados con la actividad antiproliferativa debemos entender que la lesión hepática aguda después de cualquier agresión, incluida la sobredosis de APAP, va seguida de una regeneración hepática compensatoria, que promueve la recuperación y es un determinante crucial del resultado final. La regeneración del hígado después de una lesión hepática inducida por APAP depende de la dosis y se ve afectada después de una sobredosis grave de APAP. Aunque la respuesta regenerativa robusta está asociada con la recuperación espontánea y la supervivencia, la regeneración deteriorada da como resultado una progresión más rápida de la lesión y la muerte después de una sobredosis de APAP. La regeneración hepática inducida por hepatotoxicidad por APAP implica una interacción compleja dependiente del tiempo y la dosis de varios mediadores de señalización, incluidos factores de crecimiento, citoquinas, factores angiogénicos y otras vías mitogénicas (Bhushan et al., 2019). En el caso de este experimento podría esperarse que en una fase tardía se haya deteriorado significativamente la capacidad de regeneración compensatoria que se inicia en la etapa temprana, por lo cual es razonable pensar en un incremento de la actividad antiproliferativa a favor de otros mecanismos de propios de la etapa de la lesión.

De manera muy interesante, los genes relacionados con la actividad monooxigenasa se vieron sobreexpresados en este estudio. Aunque la principal monooxigenasa que se ha encontrado que interviene en la lesión inducida por APAP es el CYP450, no es esta la que contribuye en mayor medida a una de las principales alteraciones funcionales como lo es el estrés oxidativo. Por el contrario, se sabe que la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias es la fuente principal del estrés oxidativo. La unión de NAPQI a las proteínas mitocondriales inicia el estrés oxidativo, que se amplifica aún más a través de la activación de JNK. La dependencia del estrés oxidativo de la formación de metabolitos reactivos y la unión

a proteínas reconcilia hipótesis previamente contrapuestas. Por tanto, otras fuentes de ROS como el citocromo P450 y la NADPH oxidasa parecen tener una relevancia limitada en la fisiopatología (Jaeschke y Ramachandran, 2018). En función de esto último, la sobreexpresión de la actividad monooxigenasa, aunque debe considerarse dentro de mecanismo de acción tóxica tardía, es poco probable que tenga una alta incidencia en la progresión de la toxicidad.

Finalmente, la sobreexpresión del gen Fos, coincide con lo reportado por Yang et al. en 2017 quienes encontraron que la administración de APAP en ratones producía un incremento en la expresión de Fos/Jun, lo cual están asociado con el grado de daño hepático inducido por APAP (Yang et al. 2017).

En relación con los genes subregulados (Serpine1, S100a8 y Pald1///Thbs1) no existe información relevante en la literatura publicada a la fecha que relaciones dichos genes con el daño hepático inducido por APAP. Si bien la proteína para la cual codifica el gen Serpine 1 es un inhibidor de la fibrinólisis, lo cual podría observarse en una fase tardía de recuperación, no hay datos que soporten esta hipótesis.

## **4.2 KEGG**

El análisis de la vía KEGG reveló que los DEG se enriquecieron principalmente en la vía de señalización p 53 y en la vía de señalización de IL-17.

#### ***4.2.1 Vía de señalización p53***

La proteína supresora de tumores p53 juega un papel crucial en la modulación del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia y el metabolismo en respuesta a diversos estímulos como el estrés celular y el daño del ADN. Una vez activado, p53 promueve la supervivencia celular y la reparación del daño genético (a través de genes diana que intervienen en la detención del ciclo celular y facilitan la reparación del ADN) en respuesta al estrés y al daño celular moderados; sin embargo, ante niveles letales de ROS y/o daños severos en el ADN, las células no pueden repararse ni salvarse, entonces serían eliminadas permanentemente por altos niveles de muerte celular mediada por p53 (Yan et al., 2018).

En la hepatotoxicidad por APAP, la proteína p53 también se activa por el estrés oxidativo inducido por el tóxico y el papel en la patogenia es específico de la etapa de lesión. La p53 activada desempeña una función protectora durante la fase de lesión de la hepatotoxicidad por APAP mediante la inhibición de la activación de JNK, mientras que retrasa la progresión de la reparación hepática en la fase de regeneración. En el caso de este estudio se confirma la importancia de la vía que involucra a esta proteína, aunque se conoce que, como tal, p53 puede no ser un objetivo prometedor para la toxicidad hepática aguda inducida por APAP debido al papel dual de p53 en la patogénesis de la hepatotoxicidad inducida por APAP (Yan et al., 2018)

#### ***4.2.2 Vía de señalización IL-17***

Cada vez hay más pruebas de que la interleucina-17 (IL-17) es una citocina proinflamatoria que juega un papel importante en el reclutamiento de células inflamatorias,

particularmente neutrófilos, en los sitios de inflamación. La IL-17 puede ser producida por las células T help y muchas poblaciones de células inmunitarias innatas, como las células asesinas naturales (NK), las células NKT, los neutrófilos y las células T  $\gamma\delta$  (Lee et al., 2018).

Estudios previos han demostrado que las células T  $\gamma\delta$  son una fuente importante de IL-17 y desempeñan un papel fundamental en la protección contra la infección bacteriana. El reclutamiento de neutrófilos en el sitio de inflamación está mediado por células T  $\gamma\delta$  en el modelo murino de sepsis. Además, otro estudio también demuestra que las células T  $\gamma\delta$  productoras de IL-17 median la infiltración de neutrófilos posterior y el daño en la inflamación hepática inducida por APAP (Lee et al., 2018).

En nuestro trabajo se confirma el papel central de la vía que involucra a la citoquina IL-17 cuando se comparan las administraciones en las fases tempranas y tardías. En el estudio de Lee et al. En 2018 (Lee et al., 2018) se demostró que la deficiencia de IL-17 en ratones produce una disminución en la lesión inducida por APAP al presentar una menor infiltración de células hepáticas inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y células T  $\gamma\delta$ ) al compararse con ratones de tipo salvaje, soportando la hipótesis de que la IL-17 puede jugar un papel relevante en el reclutamiento de neutrófilos y la subsecuente hepatotoxicidad inducida por APAP.

## **5. CONCLUSIONES**

En el presente estudio se muestra que los mecanismos diferenciales más relevantes al comparar las fases temprana y tardía de la intoxicación por APAP en ratones son los

relacionados con la regeneración temprana, estrés oxidativo e inicio de la atenuación del daño celular.

Observamos una regeneración incipiente en la fase tardía de la intoxicación, como lo indican la sobreexpresión de genes relacionados con estas funciones como Btg2, Gdf15 y Ier2. Adicionalmente, y como era de esperarse en un estadio tardío, los procesos inflamatorios y respuesta inmune se ven subregulados, posiblemente como resultado del hecho de que la lesión ya se encuentra en una fase tardía y se tiende hacia la regeneración, en la cual los marcadores inflamatorios e inmunes evidencian apenas un inicio de su elevación. En cuanto al mecanismo relacionado con el estrés oxidativo se confirmó una disminución de la expresión de los genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo lo cual bien podría tener que ver con el efecto umbral que se alcanza en la etapa tardía de la lesión, lo cual trae como consecuencia una disminución de la respuesta antioxidante ante el marcado daño oxidativo que induce APAP en la lesión temprana.

Los componentes celulares encontrados de manera diferencial confirman el mecanismo de estrés oxidativo en la lesión inducida por APAP, y aunque el estrés del retículo (ER) tras la administración de APAP no es bien comprendido hasta la fecha, sería interesante relacionar este evento como respuesta secundaria a la disfunción mitocondrial, la cual se sabe que está ampliamente involucrada en la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en la etapa inicial de la intoxicación y podría tener su efecto tardío en la inducción de ER.

En nuestro trabajo se confirma el papel central de la vía que involucra a la citoquina IL-17 cuando se comparan las administraciones en las fases tempranas y tardías. Debido a que la deficiencia de IL-17 en ratones produce una disminución en la lesión inducida por APAP al presentar una menor infiltración de células hepáticas inflamatorias, podría pensarse en esta interleuquina como un posible blanco terapéutico para esta fase tardía de la intoxicación.

Finalmente, aunque nuestros hallazgos pudieran ofrecer cierta orientación sobre el mecanismo de acción tóxica tardía del APAP, se sugiere complementar este estudio con una generación y análisis de una red de interacción proteína-proteína (PPI) a fin de interpretar los mecanismos moleculares diferenciales de las actividades celulares clave en la toxicidad por APAP en la etapa tardía.

## REFERENCIAS

Agrawal, S., y Khazaeni, B. (2022). Acetaminophen Toxicity. En StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Akakpo, J. Y., Ramachandran, A., Curry, S. C., Rumack, B. H., y Jaeschke, H. (2022). Comparing N-acetylcysteine and 4-methylpyrazole as antidotes for acetaminophen overdose. *Archives of toxicology*, 96(2), 453–465. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03211-z>

Behrends, V., Giskeødegård, G. F., Bravo-Santano, N., Letek, M., y Keun, H. C. (2019). Acetaminophen cytotoxicity in HepG2 cells is associated with a decoupling of glycolysis from the TCA cycle, loss of NADPH production, and suppression of anabolism. *Archives of toxicology*, 93(2), 341–353. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2371-0>

Bhushan, B., y Apte, U. (2019). Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *The American journal of pathology*, 189(4), 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.006>

Bunchorntavakul, C., y Reddy, K. R. (2018). Acetaminophen (APAP or N-Acetyl-p-Aminophenol) and Acute Liver Failure. *Clinics in liver disease*, 22(2), 325–346. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2018.01.007>

- Díaz, L. A., Ayares, G., Arnold, J., Idalsoaga, F., Corsi, O., Arrese, M., y Arab, J. P. (2022). Liver Diseases in Latin America: Current Status, Unmet Needs, and Opportunities for Improvement. *Current treatment options in gastroenterology*, 1–18. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s11938-022-00382-1>
- Du, K., Ramachandran, A., y Jaeschke, H. (2016). Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox biology*, 10, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.001>
- Farnsworth, A., Flaman, A. S., Prasad, S. S., Gravel, C., Williams, A., Yauk, C. L., y Li, X. (2010). Acetaminophen modulates the transcriptional response to recombinant interferon-beta. *PLoS one*, 5(6), e11031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011031>
- Foufelle, F., y Fromenty, B. (2016). Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacology research y perspectives*, 4(1), e00211. <https://doi.org/10.1002/prp2.211>
- Ganter, B., Snyder, R. D., Halbert, D. N., y Lee, M. D. (2006). Toxicogenomics in drug discovery and development: mechanistic analysis of compound/class-dependent effects using the DrugMatrix database. *Pharmacogenomics*, 7(7), 1025–1044. <https://doi.org/10.2217/14622416.7.7.1025>
- Harris, A. J., Dial, S. L., y Casciano, D. A. (2004). Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. *Mutation research*, 549(1-2), 79–99. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.11.014>
- Holland, C. H., Ramirez Flores, R. O., Myllys, M., Hassan, R., Edlund, K., Hofmann, U., Marchan, R., Cadenas, C., Reinders, J., Hoehme, S., Seddek, A. L., Dooley, S., Keitel, V., Godoy, P., Begher-Tibbe, B., Trautwein, C., Rupp, C., Mueller, S., Longerich, T., Hengstler, J. G., ... Ghallab, A. (2022). Transcriptomic Cross-Species Analysis of Chronic Liver Disease Reveals Consistent Regulation Between Humans and Mice. *Hepatology communications*, 6(1), 161–177. <https://doi.org/10.1002/hep4.1797>
- Iguchi, K., Takahashi, Y., Kaneto, Y., Kubota, M., Usui, S., y Hirano, K. (2005). Identification of differentially expressed genes in hepatic HepG2 cells treated with acetaminophen using suppression subtractive hybridization. *Biological y pharmaceutical bulletin*, 28(7), 1148–1153. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1148>
- Jaeschke H. (2015). Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 33(4), 464–471. <https://doi.org/10.1159/000374090>
- Jaeschke, H., Akakpo, J. Y., Umbaugh, D. S., y Ramachandran, A. (2020). Novel Therapeutic Approaches Against Acetaminophen-induced Liver Injury and Acute Liver Failure. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 174(2), 159–167. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa002>

- Jaeschke, H., y Ramachandran, A. (2020). The Role of Oxidant Stress in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Current opinion in toxicology*, 20-21, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.03.003>
- Jiang, N., Leach, L. J., Hu, X., Potokina, E., Jia, T., Druka, A., Waugh, R., Kearsey, M. J., y Luo, Z. W. (2008). Methods for evaluating gene expression from Affymetrix microarray datasets. *BMC bioinformatics*, 9, 284. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-284>
- Lee W. M. (2017). Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away?. *Journal of hepatology*, 67(6), 1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.07.005>
- McGill, M. R., y Hinson, J. A. (2020). The development and hepatotoxicity of acetaminophen: reviewing over a century of progress. *Drug metabolism reviews*, 52(4), 472–500. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1832112>
- Moffit, J. S., Koza-Taylor, P. H., Holland, R. D., Thibodeau, M. S., Beger, R. D., Lawton, M. P., y Manautou, J. E. (2007). Differential gene expression in mouse liver associated with the hepatoprotective effect of clofibrate. *Toxicology and applied pharmacology*, 222(2), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.04.008>
- Oglietti, G. E. (2020). *Panorama de la Salud: Latinoamérica y el Caribe 2020: Latinoamérica y el Caribe 2020*. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). <https://doi.org/10.1787/740f9640-es99>
- Owumi, S. E., Andrus, J. P., Herzenberg, L. A., y Herzenberg, L. A. (2015). Co-administration of N-Acetylcysteine and Acetaminophen Efficiently Blocks Acetaminophen Toxicity. *Drug development research*, 76(5), 251–258. <https://doi.org/10.1002/ddr.21262>
- Priyadarsiny, P., Khattar, S. K., Malik, R., Udupa, V., Seshaiyah, A., Rahman, S., Shingatgeri, V. M., Bora, R. S., y Saini, K. S. (2008). Differential gene expression analysis of a known hepatotoxin, N-acetyl-p-amino-phenol (APAP) as compared to its non-toxic analog, N-acetyl-m-amino-phenol (AMAP) in mouse liver. *The Journal of toxicological sciences*, 33(2), 163–173. <https://doi.org/10.2131/jts.33.163>
- Ramachandran, A., y Jaeschke, H. (2017). Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *Journal of clinical and translational research*, 3(Suppl 1), 157–169. <https://doi.org/10.18053/jctres.03.2017S1.002>
- Ramachandran, A., y Jaeschke, H. (2019). Acetaminophen Hepatotoxicity. *Seminars in liver disease*, 39(2), 221–234. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1679919>
- Xie, Q., Zhang, X., Peng, S., Sun, J., Chen, X., Deng, Y., y Yi, L. (2020). Identification of novel biomarkers in ischemic stroke: a genome-wide integrated analysis. *BMC medical genetics*, 21(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12881-020-00994-3>
- Yan, M., Huo, Y., Yin, S., y Hu, H. (2018). Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. *Redox biology*, 17, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.019>

Yang, X., Zhan, Y., Sun, Q., Xu, X., Kong, Y., y Zhang, J. (2017). Adenosine 5'-monophosphate blocks acetaminophen toxicity by increasing ubiquitination-mediated ASK1 degradation. *Oncotarget*, 8(4), 6273–6282. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14059>

Zhou, R., Liu, D., Zhu, J., y Zhang, T. (2020). Common gene signatures and key pathways in hypopharyngeal and esophageal squamous cell carcinoma: Evidence from bioinformatic analysis. *Medicine*, 99(42), e22434. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022434>