

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Relevancia de la vía de señalización de EGFR en la regulación
de la expansión y destino de las células ovas durante el daño
hepático crónico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nerea Lazcanoiturburu Ferreira

DIRECTOR

Aránzazu Sánchez Muñoz
Blanca Herrera González

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



TESIS DOCTORAL

**Relevancia de la vía de señalización de EGFR en la regulación de
la expansión y destino de las células ovas durante el daño
hepático crónico**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Nerea Lazcanoiturburu Ferreira

Directoras

Aránzazu Sánchez Muñoz
Blanca Herrera González

Madrid 2021

***A mi familia,
A Beñat***

***“En algún lugar, algo increíble está
esperando a ser descubierto”***

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

Hoy que me dispongo a escribir estas páginas de agradecimientos, echo la vista atrás y me doy cuenta de lo rápido que pasa el tiempo y lo difícil que es resumir en tan poco espacio todo lo vivido en esta etapa. Y es que esta Tesis Doctoral no hubiese sido posible sin toda esa gente que me ha ido acompañando durante estos cinco años en el laboratorio y ha formado parte de esta experiencia en la cual he disfrutado aprendiendo. Por ello, a todos vosotros me gustaría daros las gracias.

En primer lugar, me gustaría empezar agradeciendo a mis directoras de tesis, Arancha y Blanca, el haberme dado la oportunidad de formar parte de vuestro equipo cuando pisé por primera vez el departamento. Gracias por haber confiado en mí y por haberme hecho crecer tanto profesional como personalmente. Gracias por vuestra dedicación, entrega, cariño y cercanía, porque aunque haya habido obstáculos en el camino siempre me habéis hecho sentirme como en casa y me habéis ayudado a seguir adelante. Por todo ello, gracias.

No me puedo olvidar tampoco de agradecer al resto del grupo hígado la ayuda que me habéis ofrecido durante estos años. Gracias César por tu paciencia y predisposición a la hora de resolver mis dudas. Gracias Marga, porque aunque no hayamos podido coincidir durante todo el camino siempre has tenido unas palabras de ánimo y has venido a preguntarme qué tal estaba cada vez que volvías al departamento.

Gracias Laura por haber sido la mejor profesora que haya podido tener a mi lado. Gracias por la paciencia que has tenido conmigo, por tu ayuda y generosidad. Porque son incontables los momentos que hemos vivido juntas, tanto buenos como malos, y eso es algo que siempre llevaré conmigo. Gracias por haber sido una gran compañera, pero sobre todo, gracias por haber sido una gran amiga. Sé que te espera un gran futuro, y lo mejor de todo es que sé que, de una forma u otra, yo voy a seguir estando él. Gracias también a Annalisa, por haber formado parte de mis comienzos en la ciencia, por haberme enseñado que con trabajo y esfuerzo todo se puede conseguir. Tampoco me puedo olvidar de ti, Carlos. Aunque haya sido poco el tiempo que hemos coincidido en el laboratorio, gracias por haber hecho que los últimos meses no hayan sido tan duros, por haberme animado cuando lo he necesitado y por haberme ayudado en todo momento.

También me gustaría agradecer a todas esas personas que han ido pasando por el laboratorio y con las cuales he ido aprendiendo día a día. Gracias

Esti, Ceci, Diana, Sergio, Rebeca, Paula, María, Álvaro, Elena... Gracias por haber sido unos buenos compañeros y alumnos, aunque a veces haya tenido que ejercer de mami y os haya tenido que llamar la atención. Pero, sobre todo, gracias porque siempre habéis estado dispuestos a ayudarme y habéis hecho que las cosas sean más fáciles. Sé que llegareis tan lejos como queráis y que lograréis lo que os propongáis. I would also like to thank Sara Baak, because it was a great experience to work with her and she helped me a lot. I am sure we will meet again soon.

No podía faltar tampoco el agradecimiento al grupo de Almudena Porras. Gracias Almudena por tu ayuda y por ser un pilar fundamental en el departamento. Gracias Álvaro y Paloma, por haberme ayudado desinteresadamente y haberos convertido en un apoyo importante. Qué decir de vosotras, chicas. Celia, Sara, Nerea, Cris, Noelia, sin vosotras nada hubiese sido lo mismo. Gracias por hacer que los días hayan sido más amenos y por haberos convertido en mi familia madrileña. Gracias por vuestro apoyo incondicional, porque siempre habéis estado a mi lado. Voy a echar mucho de menos las largas jornadas de trabajo juntas, así como los cotilleos, risas, lloros, bailes y conciertos que hemos compartido. Como dice la canción, aunque vuele lejos, tan alto que no pueda veros, sé que me esperareis y siempre tendré un techo.

Gracias al resto de las personas que formáis parte del departamento por haber compartido esta etapa conmigo y por haberme acogido tan bien. Especialmente me gustaría agradecer a Mariola, Óscar, Almudena Gómez, Elisa y Tamara, han sido muchas las veces que os habéis preocupado por mí y me habéis ayudado. Por ello, gracias. Por supuesto, gracias Beatriz, por haber sabido escucharme y aconsejarme y, sobre todo, por no haber dudado en ayudarme cada vez que lo he necesitado. Estoy segura de que antes o después volveremos a vernos.

Tampoco puedo dejar de agradecer a todas esas personas que han aportado su granito de arena a este trabajo. Gracias Dani, Nerea Deleyto, María García Álvaro, María García Bravo, José Carlos Segovia, Julián Sanz, Adoración Martínez-Palacián, Isabel Fabregat, y al resto de personas implicadas, ya que sin todas ellas nada de lo que hay escrito hubiese sido posible.

Gracias a mis amigos, los de siempre, los de toda la vida. A los que os conozco desde que éramos txikis e íbamos juntos a la ikastola, y a los que habéis ido apareciendo a lo largo de los años. No sé qué hubiese sido de mí sin vuestras visitas constantes a Madrid, sin esos planes improvisados, sin esas escapadas llenas de locura. Gracias también a mis pisonys favoritas, con las que he podido compartir parte de esta experiencia. Convivir con vosotras ha sido un regalo. En

definitiva, gracias a esta pequeña gran familia, soy muy afortunada de teneros en mi vida.

Para ir terminando, aita y ama me gustaría agradeceros el enorme esfuerzo que habéis hecho para que yo haya podido llegar hasta aquí. Sé que para vosotros tampoco ha sido fácil el tenerme lejos durante todos estos años. Gracias por haberme impulsado cuando lo he necesitado y por hacerme ver que nada es imposible. Gracias por haberme guiado y acompañado durante toda mi vida y por haberme dado lo mejor de vosotros. Esta Tesis también es vuestra. Gracias tío Esteban, Mikel, Yasmin por hacerme sentir tan querida y demostrarme que siempre estáis ahí. Al resto de mi familia, gracias.

Finalmente, eskerrik asko Beñat. Gracias por haber aparecido cuando menos lo esperaba y por haber seguido a mi lado sin dudarlo. Porque aunque la distancia no nos lo haya puesto fácil, siempre me has apoyado y me has animado a seguir adelante. Gracias por aguantarme en mis días malos, en los que siempre has conseguido sacarme una sonrisa. Gran parte de esta Tesis es gracias a ti. Gracias por ser mi compañero de vida y por hacerme feliz.

ÍNDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. RESUMEN	7
3. ABREVIATURAS.....	13
4. INTRODUCCIÓN	19
1. El hígado	21
1.1 Función y estructura.....	21
1.2 Regeneración hepática.....	22
2. Enfermedades hepáticas crónicas (CLD).....	23
2.1 Progresión de las CLD.....	24
2.2 Causas de las CLD	25
2.2.1 Enfermedades colestásicas crónicas	26
2.3 Fibrosis hepática.....	27
2.4 Inflamación hepática.....	29
2.5 Cirrosis y HCC	33
2.6 Modelos animales para estudiar las CLD	33
2.6.1 Dieta 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (DDC)	34
2.7 Terapia y tratamiento de las CLD	35
3. Células progenitoras hepáticas (HPC)/células ovasales	36
3.1 Generalidades	36
3.2 Origen	37
3.3 Marcadores	38
3.4 Respuesta de las HPC/células ovasales	38
3.5 Las HPC/células ovasales en terapia.....	41
3.6 Las HPC/células ovasales en fibrosis hepática y HCC	42
4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	43
4.1 Familia EGFR/ErbB.....	43

4.2 Vía de señalización del EGFR.....	46
4.3 Interacción cruzada (crosstalk) de los receptores de la familia EGFR/ErbB	49
4.4 Regulación de la señalización del EGFR	52
4.4.1 Endocitosis del receptor inducida por ligando.....	52
4.4.2 Regulación por retroalimentación positiva.....	54
4.4.3 Regulación por moduladores negativos.....	54
4.4.4 Otros mecanismos de regulación.....	55
4.5 Vía de señalización del EGFR en el hígado	55
4.6 Vía de señalización del EGFR en las HPC/células ovasales	58
4.7 Vía de señalización del EGFR en fibrosis hepática y HCC.....	59
5. ANTECEDENTES	61
1. Papel del EGFR en regeneración hepática	63
2. Efectos reguladores de los RTKs c-MET y EGFR en las HPC/células ovasales	67
6. OBJETIVOS.....	71
7. MATERIALES Y MÉTODOS	75
1. Experimentación animal	77
1.1 Declaración ética.....	77
1.2 Generación de ratones transgénicos Δ EGFR.....	77
1.3 Modelo de daño hepático inducido por la dieta DDC.....	78
1.4 Proceso de recogida de muestras	79
1.5 Cálculo de la relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo	79
1.6 Análisis de marcadores séricos	80
1.7 Análisis morfométrico cuantitativo de la expansión de HPC/células ovasales	80
1.8 Análisis histopatológico.....	80
2. Cultivo de las líneas celulares	80
2.1 Modelos celulares	80

2.2 Condiciones de cultivo celular	82
2.3 Factores de crecimiento y ácidos biliares	83
3. Modificación genética de las HPC/células ovas	84
3.1 Deleción del <i>EGFR</i> mediante la tecnología CRISPR/Cas9	84
3.2 Generación de plásmidos y virus para la deleción del <i>EGFR</i> utilizando la tecnología CRISPR/Cas9	86
3.2.1 Diseño de los sgRNAs y producción de los plásmidos plentiGuide- Puro-EGFR-KO	86
3.2.2 Generación de virus para experimentos CRISPR/Cas9	88
4. Análisis de DNA	89
4.1 Aislamiento de DNA genómico	89
4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	90
5. Análisis de la expresión génica	91
5.1 Aislamiento de RNA total	91
5.2 Síntesis de cDNA (RT, retrotranscripción)	92
5.3 RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	92
6. Análisis de la expresión de proteínas	93
6.1 Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot	93
6.1.1 Obtención de extractos proteicos celulares	93
6.1.2 Obtención de extractos proteicos a partir de tejido hepático	94
6.1.3 Cuantificación de proteínas	94
6.1.4 Electroforesis de proteínas	94
6.1.5 Transferencia de proteínas	95
6.1.6 Inmunodetección de las proteínas	95
6.2 Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo	97
6.2.1 Análisis de A6	97
6.2.2 Análisis de EPCAM	97
6.3 Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunocitoquímica	98
6.3.1 Análisis de ALBÚMINA	98

6.3.2 Análisis de CK19	98
6.4 Análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y tinción Sirius Red en tejidos hepáticos	99
6.4.1 Tinción inmunohistoquímica de CK19 a partir de cortes histológicos embebidos en parafina	99
6.4.2 Detección de células Ki67/CK19 dobles positivas mediante inmunofluorescencia a partir de cortes histológicos embebidos en parafina	101
6.4.3 Detección de fibras de colágeno tipo I y III mediante la tinción Sirius Red a partir de cortes histológicos embebidos en parafina.....	101
7. Análisis de la viabilidad y proliferación celular	103
7.1 Contaje celular	103
7.2 Tinción con cristal violeta.....	103
7.3 Ensayo de MTT	103
8. Análisis de la apoptosis por tinción con yoduro de propidio (PI)	104
9. Estudio estadístico	104
8. RESULTADOS	107
1. La expresión de un EGFR sin actividad catalítica en hepatocitos conduce a una mayor expansión de HPC/células ovals en un modelo de enfermedad hepática colestásica	109
1.1 La vía de señalización del EGFR está disminuida en el daño hepático inducido por la dieta DDC	109
1.2 La inactivación del EGFR en hepatocitos aminora el daño hepático inducido por la dieta DDC	113
1.3 Reacción ductular amplificada y aumento de marcadores de HPC/células ovals en respuesta a la dieta DDC en los hígados de los ratones Δ EGFR.....	120
1.4 Respuesta inflamatoria exacerbada en los hígados de los ratones Δ EGFR en respuesta a la dieta DDC.....	127
1.5 Activación más potente de vías mitogénicas y de supervivencia en los hígados de los ratones Δ EGFR en respuesta a la dieta DDC..	130

2. Estudio de la relevancia de la vía de señalización del EGFR en HPC/células ovals usando un modelo <i>in vitro</i> de daño colestásico	133
2.1 Establecimiento y validación de un modelo <i>in vitro</i> de daño colestásico en HPC/células ovals.....	133
2.2 Estudio de la vía del EGFR en HPC/células ovals sometidas a tratamiento con sales biliares	135
3. Generación y caracterización de modelos <i>in vitro</i> de HPC/células ovals con la vía del EGFR inactivada o silenciada .	137
3.1 Caracterización genotípica y fenotípica de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC.....	138
3.2 Caracterización funcional de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC: análisis de la respuesta al EGF.....	141
3.3 Caracterización funcional de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC: respuesta a TGF- β , HGF y suero	143
3.4 Generación y caracterización de las HPC/células ovals deficientes en EGFR mediante la tecnología CRISPR/Cas9	147
9. DISCUSIÓN	151
1. La expresión de un EGFR sin actividad catalítica en hepatocitos conduce a una mayor expansión de HPC/células ovals en un modelo de enfermedad hepática colestásica	153
2. Estudio de la relevancia de la vía de señalización del EGFR en HPC/células ovals usando un modelo <i>in vitro</i> de daño colestásico	161
3. Discusión general	166
10. CONCLUSIONES	169
11. BIBLIOGRAFÍA.....	173

1. ABSTRACT

RELEVANCE OF THE EGFR SIGNALING PATHWAY IN THE REGULATION OF OVAL CELL EXPANSION AND FATE DURING CHRONIC LIVER DAMAGE

Introduction

Chronic liver damage leads to fibrosis and ultimately cirrhosis, constituting a major global health problem. In fact, chronic liver diseases (CLD) are among the leading causes of morbidity and mortality worldwide, with an increasing incidence. In chronic liver damage, where the regenerative capacity of hepatocytes or cholangiocytes is compromised, hepatic progenitor cells (HPC), also called oval cells (OC) in rodents, are activated to promote regeneration and restore liver function. Upon activation, HPC/oval cells expand, proliferate and migrate into liver parenchyma where they finally differentiate into hepatocytes and/or cholangiocytes due to their bipotential nature, compensating the cellular loss and helping to maintain liver homeostasis. However, there is evidence that supports a direct correlation between HPC/oval cells expansion and the degree of fibrosis, and in some contexts they could act as tumor-initiating cells. Therefore, it is necessary to deep in the study of the regulation of HPC/oval cell biology and function, particularly, how different growth factors and signaling mechanisms regulate HPC/oval cells, to understand their role in liver physiopathology and to be able to modulate their response for therapeutic purposes.

The EGF receptor (EGFR) signaling pathway promotes cell proliferation and survival in hepatocytes and HPC/oval cells and has been shown to play an important role in liver regeneration after partial hepatectomy (PH), since its deletion or inactivation causes a delay or suppression of the regenerative process. However, its role in cholestatic liver diseases is not clearly defined, since EGF has been linked both to protective effects and to promotion of fibrogenesis and cholestatic damage. It should also be noted that there are hardly any previous studies on the effect of EGFR pathway inhibition on HPC/oval cell activation, expansion and/or fate in models of liver damage. These cells play a crucial role in the context of chronic liver disease, such as cholestatic liver diseases, which is decisive for disease progression.

Aims

On this basis, the general objective of this work has been to study the relevance of the EGFR pathway in HPC/oval cell biology and function in a context of chronic liver damage, using a transgenic mouse model that expresses in hepatocytes a truncated form of the human EGFR, lacking tyrosine kinase activity, as well as HPC/oval cells lacking EGFR generated using different strategies.

To achieve this objective, we set the following specific objectives:

1. To analyze *in vivo* how the absence of EGFR tyrosine kinase activity affects the liver regenerative response to 3,5 diethoxycarbonyl-1,4 dihydrocollidine (DDC) diet-induced cholestatic chronic damage, with a special focus on the effect on HPC/oval cells.

2. To study *in vitro* the role of EGFR in HPC/oval cells in the context of cholestatic disease, after setting up an *in vitro* model of cholestatic damage based on treatment with bile salts.

3. To generate, validate and characterize *in vitro* models of HPC/oval cells with an inactivated or silenced EGFR pathway.

Results

Our results show that absence of the EGFR catalytic activity in hepatocytes has a beneficial effect on the regenerative process associated with the DDC diet-induced damage, as evidenced by an increased liver to body weight ratio, a reduced or delayed liver damage, with lower levels of serum markers of liver damage (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and total bilirubin), a decreased expression of fibrogenic and apoptosis markers, and a reduced compensatory proliferative response by hepatocytes. All this is accompanied by a greater expansion of HPC/oval cell population. Furthermore, both histopathological and inflammatory markers analysis revealed an increased inflammatory response in Δ EGFR mice after DDC diet treatment, with increased expression of proinflammatory cytokines such as *IL6*, *IL1 β* , *IL12 β* , *IL17*, *CXCL1* and *CCL2* and decreased expression of antiinflammatory cytokines such as *IL4*. Altogether, these data indicate that the absence of the EGFR catalytic activity in hepatocytes leads to a better recovery of liver functionality and to a more efficient regeneration in response to DDC diet-induced damage, likely due to the activation of compensatory pathways leading to the reversion of damage. In support of this, EGFR animals show increased expression of *HGF* and *c-MET*, as well as a more intense and/or sustained activation of mitogenic and survival pathways like ERK1/2-MAPK and PI3K/AKT.

On the other hand, we have established an *in vitro* model that mimics cholestatic liver damage based on the treatment with sodium glycochenodeoxycholate (GCDC) and sodium taurocholate (TCA) bile salts. We have shown for the first time that these bile salts reduce HPC/oval cell viability, although at concentrations higher than those showing cytotoxic effects in

hepatocytes. Additionally, we have demonstrated not only a direct involvement of HPC/oval cells in the inflammatory response in a context of cholestatic damage, but an important role for the EGFR pathway at this level as well. Furthermore, we have generated HPC/oval cell lines with an inactive (Δ EGFR-OC cells) or silenced (EGFR-deficient HPC/oval cells) EGFR pathway. These cellular models will hopefully be a valuable tool to further study the role of the EGFR pathway in HPC/oval cells in response to cholestatic damage.

Conclusions

1. The absence of the EGFR tyrosine kinase activity in hepatocytes leads to a reduced or delayed liver damage and a more efficient regeneration in response to DDC diet.
2. The improved hepatic regenerative response seen in Δ EGFR mice under DDC diet is accompanied by an enhanced expansion of HPC/oval cells and an exacerbated and altered inflammatory response.
3. Bile salts induce in HPC/oval cells *in vitro* a cytotoxic response that is not counteracted by treatment with EGFR ligands, EGF and HB-EGF. Moreover, in the presence of bile salts, EGF- and HB-EGF-induced mitogenic effect is lost.
4. Bile salts promote chemokines and cytokines secretion by HPC/oval cells, an effect that is enhanced by EGF treatment.
5. Two models of HPC/oval cells with the EGFR pathway inactivated (Δ EGFR-OC cells) or silenced (EGFR-deficient HPC/oval cells generated using CRISPR/Cas9 technology) have been generated, validated and characterized, as a tool to clarify the role of the EGFR pathway in the regulation of HPC/oval cells in a context of cholestatic damage.

2. RESUMEN

RELEVANCIA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE EGFR EN LA REGULACIÓN DE LA EXPANSIÓN Y DESTINO DE LAS CÉLULAS OVALES DURANTE EL DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO

Introducción

El daño hepático crónico conduce a fibrosis y en último término cirrosis, constituyendo un grave problema de salud a nivel global. De hecho, las enfermedades hepáticas crónicas (CLD) se encuentran entre las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, con una incidencia en aumento. En un daño hepático crónico, donde la capacidad regenerativa de los hepatocitos o los colangiocitos se ve comprometida, son las células progenitoras hepáticas (HPC), también denominadas células ovas (OC) en roedores, las que se activan para promover la regeneración y restablecer la función hepática. Tras su activación, se expanden, proliferan y migran al parénquima hepático donde finalmente se diferencian a hepatocitos y/o colangiocitos gracias a su naturaleza bipotencial, compensando la pérdida celular y ayudando a mantener la homeostasis del hígado. Sin embargo, existen evidencias que señalan la existencia de una correlación directa entre la expansión de las HPC/células ovas y el grado de fibrosis, y en determinados contextos podrían ser susceptibles de actuar como células iniciadoras de tumores. Por todo ello, es necesario profundizar en el estudio de la regulación de la biología y función de las HPC/células ovas, en concreto, cómo actúan los distintos factores de crecimiento y los mecanismos de señalización disparados, para entender el papel de las HPC/células ovas en la fisiopatología hepática y poder modular su respuesta con objetivos terapéuticos.

La vía de señalización del receptor de EGF (EGFR) promueve la proliferación y la supervivencia celular en hepatocitos y HPC/células ovas y se ha demostrado que juega un papel importante en la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial (PH), ya que su delección o inactivación provoca el retraso o la supresión de dicho proceso. Sin embargo, su papel en las enfermedades hepáticas colestásicas no está claramente definido, ya que el EGF ha sido relacionado tanto con efectos protectores, como con el desarrollo de fibrosis y el daño colestásico. Asimismo, cabe destacar que apenas hay estudios previos sobre el efecto de la inhibición de la vía del EGFR en la activación, expansión y/o destino de HPC/células ovas en modelos de daño hepático, células que juegan un papel crucial en el contexto de la enfermedad hepática crónica, como es el caso de las enfermedades hepáticas colestásicas, siendo determinante para la progresión de la enfermedad.

Objetivos

Con estos antecedentes, el objetivo general de este trabajo ha sido estudiar la relevancia de la vía del EGFR en la biología y función de las HPC/células ovals en un contexto de daño hepático crónico, utilizando un modelo de ratón transgénico que expresa en hepatocitos una forma truncada del receptor humano EGFR, carente de actividad tirosina quinasa; así como HPC/células ovals carentes de EGFR generadas utilizando diferentes estrategias.

Para lograr este objetivo planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar *in vivo* el efecto de la ausencia de la actividad tirosina quinasa del EGFR en la respuesta regenerativa del hígado ante el daño colestásico crónico inducido por la dieta 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (DDC), con especial atención en el efecto sobre las HPC/células ovals.

2. Estudiar *in vitro* el papel del EGFR en las HPC/células ovals en el contexto de la enfermedad colestásica, previa puesta a punto de un modelo *in vitro* de daño colestásico por tratamiento con sales biliares.

3. Generar, validar y caracterizar modelos *in vitro* de HPC/células ovals con la vía del EGFR inactivada o silenciada.

Resultados

Nuestros resultados muestran que la ausencia de la actividad catalítica del EGFR en hepatocitos tiene un efecto beneficioso en el proceso regenerativo asociado al daño inducido por la dieta DDC, como se evidencia por una mayor relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo, un daño hepático aminorado o retrasado, con niveles menores de marcadores de daño hepático en suero (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina total), la expresión aminorada de marcadores fibrogénicos y de apoptosis, y la menor respuesta proliferativa compensatoria por parte de los hepatocitos; todo ello acompañado de una mayor expansión de la población de HPC/células ovals en los animales Δ EGFR. Además, tanto el análisis histopatológico como el análisis de marcadores inflamatorios revela una mayor respuesta inflamatoria en los ratones Δ EGFR tras el tratamiento con la dieta DDC, con un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias como *IL6*, *IL18*, *IL12 β* , *IL17*, *CXCL1* y *CCL2* y una menor expresión de citoquinas antiinflamatorias como *IL4*. En conjunto, estos datos indican que la ausencia de la actividad catalítica del EGFR en hepatocitos da lugar a una mejor

recuperación de la funcionalidad hepática y a una regeneración más eficiente en respuesta al daño inducido por la dieta DDC, lo cual podría deberse a la activación de vías compensatorias que dan lugar a la reversión de la situación, ya que en los animales Δ EGFR se observa un aumento de la expresión de *HGF* y de *c-MET*, así como una activación más intensa y/o sostenida de vías mitogénicas y de supervivencia como ERK1/2-MAPK y PI3K/AKT.

Por otro lado, hemos puesto a punto un modelo *in vitro* de daño colestásico basado en el tratamiento con las sales biliares glicocinodesoxicolato de sodio (GCDC) y taurocolato de sodio (TCA), y hemos demostrado por primera vez que estas sales reducen la viabilidad de las HPC/células ovals, aunque se requieren dosis superiores a las dosis citotóxicas en hepatocitos. Asimismo, hemos demostrado no solo la implicación directa de las HPC/células ovals en la respuesta inflamatoria en un contexto de daño colestásico, sino también un efecto de la vía del EGFR a este nivel. Además, hemos generado líneas celulares con la vía del EGFR inactivada (Δ EGFR-OC) o silenciada (HPC/células ovals deficientes en EGFR). Se espera que estos modelos celulares sean una herramienta muy valiosa para ahondar en el estudio del papel de la vía del EGFR en las HPC/células ovals en respuesta al daño colestásico.

Conclusiones

1. La ausencia de actividad tirosina quinasa del EGFR en hepatocitos conduce a un daño hepático aminorado o retrasado y una regeneración más eficiente en respuesta a la dieta DDC.
2. La respuesta regenerativa hepática mejorada observada en ratones Δ EGFR sometidos a daño por DDC está acompañada de una mayor expansión de las HPC/células ovals y una respuesta inflamatoria hepática exacerbada y alterada.
3. Las sales biliares inducen en HPC/células ovals *in vitro* una respuesta citotóxica que no es contrarrestada por tratamiento con los ligandos del EGFR, EGF y HB-EGF. Además, en presencia de sales biliares, se pierde el efecto mitogénico de estos ligandos.
4. Las sales biliares promueven la secreción de quimioquinas y citoquinas por parte de las HPC/células ovals, efecto que es potenciado por el tratamiento con EGF.
5. Se han generado, validado y caracterizado dos modelos de HPC/células ovals con la vía del EGFR inactivada (células Δ EGFR-OC) o silenciada

(HPC/células ovals deficientes en EGFR generadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9), como herramienta para clarificar el papel de la vía del EGFR en la regulación de las HPC/células ovals en un contexto de daño colestásico.

3. ABREVIATURAS

2-AAF	2-Acetylaminofluorene
ACTA-2	Actin alpha 2
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease
AFL	Alcoholic Fatty Liver
AFP	Alpha-Fetoprotein
AIH	Autoimmune Hepatitis
AKT	AK strain Transforming
ALB	Albumin
ALD	Alcoholic Liver Disease
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine Aminotransferase
ANIT	Alpha-Naphthylisothiocyanate
ANOVA	Analysis Of Variance
AR	Amphiregulin
ASH	Alcoholic Steatohepatitis
AST	Aspartate Aminotransferase
ATP	Adenosine Triphosphate
BA	Bile Acid
BAAT	Bile Acid-CoA:amino Acid N-acyltransferase
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BDL	Bile Duct Ligation
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
BTC	Betacellulin
BW	Body Weight
CA	Cholic Acid
CAS9	CRISPR Associated Protein 9
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma Oncogene
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CCL₄	Carbon Tetrachloride
CDCA	Chenodeoxycholic Acid
CDE	Cholin-Deficient, Ethionine-Supplemented
cDNA	Complementary DNA
CD34	Cluster of Differentiation 34
CK	Cytokeratin
CLD	Chronic Liver Disease
CME	Clathrin-Mediated Endocytosis
COL1A1	Collagen Type I alpha 1
CPM	Counts Per Minute
CT	Cycle Threshold
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAPI	4',6-Diamidino-2-PhenylIndole
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydro-Collidine
DEN	Diethyl-Nitrosamine

DILI	Drug-induced Liver Injury
DLK1	Delta-Like Protein 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMN	Dimethyl-Nitrosamine
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DR	Ductular Reaction
DTT	Dithiothreitol
DUSP	Dual-Specificity Phosphatase
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EPG	Epigen
EPS15	EGFR Pathway Substrate 15
EREG	Epiregulin
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GAB1	GRB2-Associated-Binding Protein 1
GCA	Glycocholic Acid
GCDCA	Glycochenodeoxycholic Acid
GCDC	Sodium Glycochenodeoxycholate
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
GRB2	Growth Factor Receptor Bound protein 2
GUSB	β -Glucuronidase
HAV	Hepatitis A Virus
HB-EGF	Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
H&E	Hematoxylin and Eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic Acid
hESC	Human Embryonic Stem Cells
HEV	Hepatitis E Virus
HGF	Hepatocyte Growth Factor
H₂O₂	Hydrogen Peroxide
HPC	Hepatic Progenitor Cell
HV	Hepatitis Virus
IFN-γ	Interferon Gamma
IGF1R	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase

IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphate
ITS	Insulin Transferrin Selenium
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
LAPTM4B	Lysosomal-Associated Transmembrane Protein 4B
LB	Lysogeny Broth
LCA	Lithocholic Acid
LRIG1	Leucine-Rich and Immunoglobulin-Like Domains Protein 1
LW	Liver Weight
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCD	Methionine-Choline Deficient
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MHC-II	Major Histocompatibility Complex II
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
miRNA	MicroRNA
MMP	Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Sodium Chloride
NaF	Sodium Fluoride
NAFL	Non-Alcoholic Fatty Liver
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NaHCO₃	Sodium Bicarbonate
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
Na₃VO₄	Sodium Orthovanadate
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NRG	Neuregulin
NTC	Non-Target Control
OC	Oval Cell
OV6	Oval Cell Antigen 6
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBC	Primary Biliary Cirrhosis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimine
PH	Partial Hepatectomy
PI	Propidium Iodide
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC	Protein kinase C
PLCγ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride

PROM1	Prominin1
PSC	Primary Sclerosing Cholangitis
PTB	Phospho-Tyrosin-Binding
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
PUMA	p53 Upregulated Modulator Of Apoptosis
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RALT	Receptor-Associated Late Transducer
RNA	Ribonucleic Acid
mRNA	Messenger RNA
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SCA-1	Stem Cell Antigen 1
S.D	Standard Deviation
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
S.E.M	Standard Error of the Mean
SGLT1	Sodium-Glucose Linked Transporter 1
sgRNA	Single Guide Ribonucleic Acid
SH2	Src Homology 2
SHC	Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein
SHP	Src Homology 2 Domain Containing Protein Tyrosine Phosphatase
shRNA	Short Hairpin RNA
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signalling
SOS	Son Of Sevenless
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAA	Thioacetamide
TACE	TNF- α Converting Enzyme
TAE buffer	Tris Acetate EDTA buffer
TBS	Tris-Buffered Saline
TCA	Taurocholic Acid
TCDC	Taurochenodeoxycholic Acid
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TGF-α	Transforming Growth Factor
TGF-β1	Transforming Growth Factor-beta 1
TGF-β2	Transforming Growth Factor-beta 2
Thy-1	Thymocyte Differentiation Antigen
TIMP	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase
TLR	Toll-Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TTBS	Tween 20-Tris-Buffered Saline
TWEAK	Tumor Necrosis Factor-like Weak Inducer of Apoptosis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wild-Type
α-SMA	alpha-Smooth Muscle Actin

4. INTRODUCCIÓN

1. El hígado

1.1 Función y estructura

El hígado es el órgano interno de mayor tamaño, representando aproximadamente del 2% al 3% del peso corporal promedio. El hígado se encuentra dividido en dos lóbulos, el derecho y el izquierdo, los cuales están separados por el ligamento falciforme. El lóbulo derecho es el de mayor tamaño y se encuentra dividido a su vez en dos lóbulos más pequeños: el caudado y el cuadrado (**Abdel-Misih & Bloomston, 2010**). Se trata de un órgano central en la fisiología que está implicado en el mantenimiento de la homeostasis del organismo ya que lleva a cabo numerosas funciones. Entre éstas se incluyen el metabolismo, síntesis, almacenamiento y redistribución de nutrientes, carbohidratos, grasas y vitaminas. El hígado recibe el flujo sanguíneo del intestino delgado y la mayor parte del intestino grueso, así como del bazo y del páncreas, a través de la vena porta y la arteria hepática. Cabe destacar también que es el órgano con mayor actividad detoxificante del cuerpo, ya que elimina los desechos y los xenobióticos mediante la conversión metabólica y la excreción biliar (**Hata et al., 2007**). Por consiguiente, el hígado puede considerarse como el filtro o la barrera primaria del cuerpo frente a toxinas, drogas y xenobióticos estando constantemente expuesto a estas sustancias tóxicas. Por otro lado, la existencia de virus hepatotropos y la existencia de patologías de orden metabólico, genético o inmune son causas de daño hepático relativamente frecuentes. Por ello, para hacer frente a estos daños potenciales y ejercer adecuadamente sus funciones, este órgano tiene una alta capacidad regenerativa (**Itoh & Miyajima, 2014**).

El hígado adulto está compuesto por numerosos tipos de células que se pueden clasificar en células parenquimáticas o hepatocitos y células no parenquimáticas. Los hepatocitos son el tipo de célula epitelial más abundante del hígado, ya que constituyen en torno a un 60% de la masa celular hepática y un 80% del volumen del órgano, y son responsables de llevar a cabo la mayoría de las funciones esenciales (**Spear et al., 2006**). El 40% restante de la masa celular está compuesta por colangiocitos (células epiteliales biliares), células de Kupffer (macrófagos residentes), células estrelladas hepáticas o células de Ito, células endoteliales sinusoidales y linfocitos, entre otras (**Malarkey et al., 2005; Racanelli & Rehmann, 2006**). Las células no parenquimáticas desempeñan importantes funciones en el transporte de nutrientes, el metabolismo, la respuesta inflamatoria y la síntesis de diferentes factores de crecimiento y, por lo tanto, participan en los procesos fisiopatológicos del hígado (**Malarkey et al., 2005**).

La unidad funcional primaria del hígado son los lobulillos hepáticos (**Figura 1A**), estructuras que contienen filas de hepatocitos (**Fausto & Campbell, 2003**) y que están organizadas como un hexágono, con una tríada portal en cada esquina y una vena central en el medio, que desemboca en las venas hepáticas y éstas a su vez en la vena cava inferior. Cada tríada portal consiste en una vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar (**Figura 1B**). La sangre entra en el hígado por la vena porta y la arteria hepática, y fluye a través de los sinusoides hepáticos hacia la vena central. La fila de hepatocitos está delimitada por el endotelio formando los sinusoides, lo cual facilita la interacción entre la sangre y la superficie celular de los hepatocitos. La bilis secretada por los hepatocitos se recoge en el canalículo biliar, que finalmente se conecta con los conductos biliares formados por los colangiocitos a través del canal de Hering (**Duncan et al., 2009**).

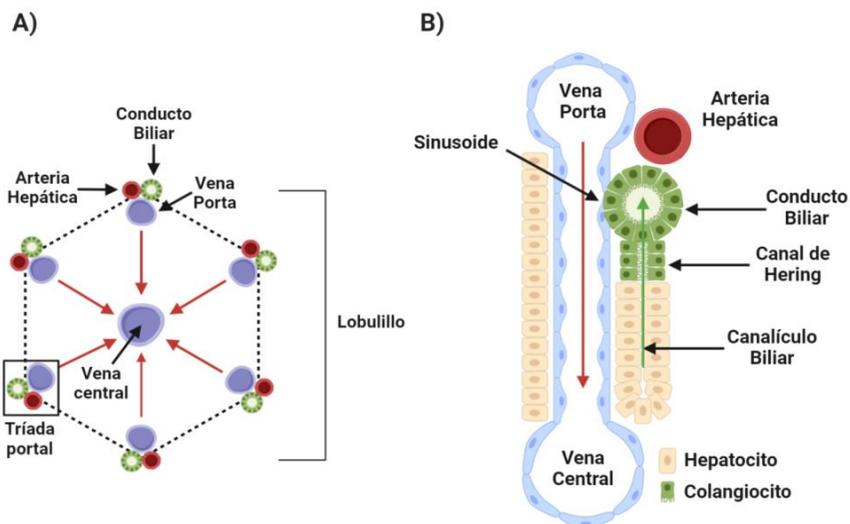


Figura 1. Estructura del lobulillo hepático. **A)** Cada lobulillo hepático consiste en una vena central y seis tríadas portales. **B)** La tríada portal consiste en una vena porta, una arteria hepática y un conducto biliar. La sangre de la arteria hepática y la vena porta pasa por los hepatocitos a través de los sinusoides, que están delimitados por células endoteliales fenestradas, hasta la vena central. La bilis es secretada por los hepatocitos y fluye a través de los canalículos hacia los conductos biliares formados por los colangiocitos. La unión entre el canalículo biliar y el conducto biliar es el canal de Hering. Adaptado de **Duncan et al., 2009**.

1.2 Regeneración hepática

El hígado tiene una capacidad única para regular con precisión su crecimiento y masa, lo que es particularmente notable debido a que los hepatocitos son células quiescentes y rara vez se dividen en condiciones normales, permanecen en la fase G0 del ciclo celular y son mitóticamente inactivos (**Tao et al., 2017**). En condiciones fisiológicas, el hígado mantiene un equilibrio entre la pérdida y la ganancia del número de células a través de la

división de los hepatocitos maduros y los colangiocitos (**Grompe, 2005; Knight et al., 2005a**). Además, esas células conservan su capacidad de proliferar y regenerar el tejido dañado para satisfacer las demandas de reemplazo celular cuando la pérdida del número de células es alta. Específicamente, la regeneración hepática puede definirse más correctamente como una hiperplasia compensatoria en lugar de una verdadera restauración de la anatomía y arquitectura original del hígado. Esta capacidad del hígado para recuperar su tamaño original, medida como la relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo, es necesaria para mantener la homeostasis (**Rmilah et al., 2019; Bangru & Kalsotra, 2020**).

Se han propuesto varios modelos para el estudio de la regeneración hepática, pero el más utilizado es la hepatectomía parcial (PH) del hígado en roedores, modelo del que fueron pioneros Higgings y Anderson en 1931. En este modelo, dos terceras partes, es decir, el 70% del hígado de los roedores se extirpa quirúrgicamente. En respuesta a este daño agudo, los hepatocitos que se encuentran quiescentes abandonan la fase G0 y entran de nuevo en ciclo, de manera que los lóbulos hepáticos residuales restauran la masa hepática original en aproximadamente una semana tras la cirugía, aunque los lóbulos extirpados nunca vuelven a crecer (**Michalopoulos, 2010; Mao et al., 2014; Michalopoulos, 2014; Forbes & Newsome, 2016**). Este proceso también tiene lugar en humanos en el trasplante hepático de donante vivo: después de la operación quirúrgica ambas partes del hígado del donante (la que queda en el cuerpo del donante y la trasplantada) crecen para restablecer el tamaño normal del órgano y servir tanto al donante como al receptor (**Kholodenko & Yarygin, 2017**).

Sin embargo, si el daño hepático es severo y persiste, y se sobrepasa la capacidad regenerativa de los hepatocitos, como ocurre durante las enfermedades hepáticas crónicas (CLD), la renovación normal de las células epiteliales (hepatocitos y colangiocitos) maduras se ve impedida. En estas situaciones se activa una vía alternativa en la que los actores principales son las células madre/progenitoras hepáticas adultas, denominadas células progenitoras hepáticas (HPC) en humanos y células ovas (OC) en roedores, las cuales actúan como una segunda línea de defensa contra el fallo hepático (**Itoh, 2016; Chen et al., 2017**). Estas células se explicarán con más detalle en siguientes secciones.

2. Enfermedades hepáticas crónicas (CLD)

Las CLD representan un grave problema de salud a nivel mundial, estimándose que 844 millones de personas padecen diferentes tipos de CLD, con una tasa de mortalidad de 2 millones de muertes por año, de las cuales la mitad son debidas a complicaciones de la cirrosis, y el 50% restante, a hepatitis

víricas y carcinoma hepatocelular (HCC) (Byass, 2014). La cirrosis es actualmente la undécima causa de muerte más frecuente a nivel mundial y el cáncer hepático la decimosexta causa principal de muerte, de manera que, combinados, representan el 3,5% de todas las muertes en el mundo (Asrani et al., 2019). El gran número de personas afectadas en todo el mundo y la falta de un tratamiento antifibrótico eficaz hacen que sea un requisito absoluto comprender más profundamente los mecanismos que subyacen a las CLD para poder ofrecer terapias novedosas y más efectivas.

2.1 Progresión de las CLD

Las CLD son el resultado de ciclos continuos de destrucción y regeneración del parénquima hepático, que conducen a la fibrosis y la cirrosis. La progresión de las CLD se sustenta en un círculo vicioso en el que se produce un daño crónico persistente, que origina un proceso inflamatorio crónico, la muerte de células parenquimáticas, y que conlleva la descompensación entre formación y degradación de la matriz extracelular (ECM), lo cual conduce progresivamente a la fibrosis. Si la causa de la fibrosis es eliminada puede producirse la resolución de la fibrosis hepática temprana, es decir, la reversión completa a una arquitectura hepática casi normal. Sin embargo, si la causa de la fibrosis no es eliminada y la inflamación y el daño persisten, finalmente se produce cirrosis, una condición caracterizada por una arquitectura del tejido alterada, degeneración y necrosis de hepatocitos, reemplazo del parénquima hepático por extensas lesiones fibrosas que rodean nódulos de hepatocitos en regeneración y pérdida de la función hepática. Esto, a su vez, conduce a menudo a la hipertensión portal y a la insuficiencia hepática. Cabe destacar que la progresión de la cirrosis es muy variable y puede ocurrir a lo largo de muchos años. Además, en esta etapa, aunque la resolución no es posible, la regresión de la fibrosis, es decir, la mejora pero no la reversión, mejora el pronóstico clínico (Pellicoro et al., 2014; Zhou et al., 2014; Ebrahimi et al., 2016). Por ejemplo, se ha descrito esta regresión en pacientes con cirrosis alcohólica que se abstuvieron del alcohol o en pacientes con infección por el virus de la hepatitis C (HCV) que se sometieron a una terapia antiviral, entre otros (Ellis & Mann, 2012). Sin embargo, cuando esta regresión no ocurre en muchos casos la cirrosis va seguida de la formación de nódulos pre-neoplásicos y el desarrollo de HCC, la etapa final de la patología hepática en la que el trasplante de hígado es la única terapia disponible (Figura 2) (Pellicoro et al., 2014).

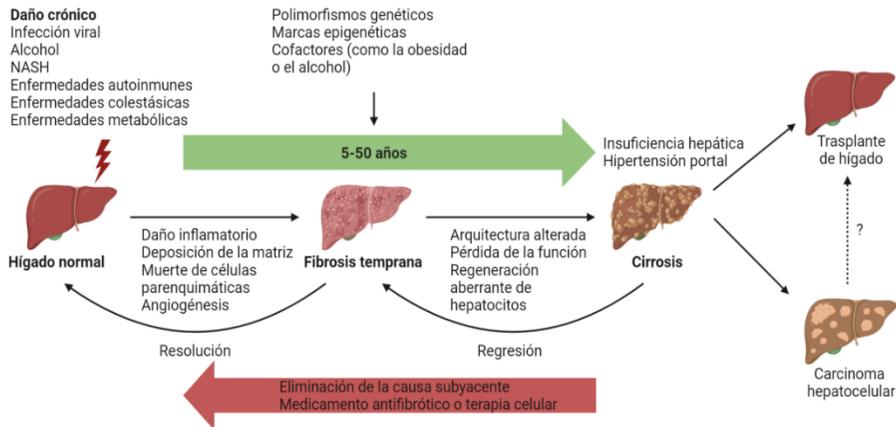


Figura 2. Progresión de las CLD. La fibrosis hepática es la primera consecuencia del daño hepático y la primera etapa de las CLD. Si la causa de la fibrosis es eliminada, se produce la resolución de la fibrosis temprana. Sin embargo, tras una continua lesión hepática, daño inflamatorio, deposición de la matriz y muerte de las células parenquimáticas, la fibrosis acaba dando lugar a la cirrosis, que puede conducir a HCC. En esta etapa final de la patología hepática la única terapia disponible es el trasplante de hígado. Adaptado de **Pellicoro et al., 2014**.

2.2 Causas de las CLD

Las principales causas de las CLD incluyen: la enfermedad hepática alcohólica (ALD); la enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH); las infecciones virales crónicas; causas genéticas como la enfermedad de Wilson o la hemocromatosis hereditaria; enfermedades autoinmunes como la cirrosis biliar primaria (PBC), la colangitis esclerosante primaria (PSC) o la hepatitis autoinmune (AIH); y otras causas entre las que se incluyen el daño hepático inducido por fármacos (DILI), alteraciones vasculares y causas idiopáticas (**Liu et al., 2013; Asrani et al., 2019; Sharma & Nagalli, 2020**). La incidencia y prevalencia mundial estimada de las CLD varía en gran medida dependiendo de la etiología específica, el área geográfica y otros factores como el sexo, la raza o el estatus socioeconómico (**Marcellin & Kutala, 2018**).

El consumo excesivo de alcohol es un problema de salud mundial y es un factor de riesgo importante para las CLD. La ALD sigue un patrón bien conocido de progresión de la enfermedad, que comienza con un hígado graso alcohólico (AFL), que está caracterizado por la esteatosis hepática (una acumulación de triglicéridos en los hepatocitos). Algunos individuos progresarán y desarrollarán inflamación hepática y lesión de hepatocitos, lo cual se define histológicamente como esteatohepatitis alcohólica (ASH). La ASH puede progresar lentamente, y cuando se vuelve crónica, puede conducir a fibrosis y cirrosis, y en algunos casos además a HCC. Además de esta progresión crónica

lenta, los individuos con ALD (con o sin cirrosis) que tienen una rápida progresión hacia ASH pueden presentar un síndrome clínico agudo llamado hepatitis alcohólica, el cual se asocia con un mal pronóstico y una alta mortalidad (**Park et al., 2014; Osna et al., 2017; Seitz et al., 2018**).

NAFLD es un término general que abarca desde el simple depósito de tejido adiposo en el hígado hasta una esteatosis más severa que tiene asociada hepatitis, fibrosis, cirrosis y, en algunos casos, HCC. Esta enfermedad se subdivide, a su vez, en hígado graso no alcohólico (NAFL) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La NAFL se caracteriza por la esteatosis del hígado, que afecta a más del 5% del parénquima, sin que haya indicios de lesión en los hepatocitos ni inflamación. Sin embargo, NASH se define en términos histológicos como un proceso necroinflamatorio por el cual se dañan las células hepáticas en un entorno en el que también hay esteatosis (**Bellentani, 2017; Benedict & Zhang, 2017**). Cabe destacar que NAFLD se considera una manifestación hepática del síndrome metabólico que está asociada al sedentarismo y a unos hábitos alimenticios no saludables, y cuya incidencia está aumentando rápidamente en todo el mundo (**Takahashi et al., 2015**).

Los virus de la hepatitis (HV) tienen una afinidad por los hepatocitos causando enfermedades hepáticas tanto agudas como crónicas. Aunque existen cinco tipos diferentes de virus de la hepatitis (HAV-HEV), son los virus de la hepatitis B y C los que causan predominantemente las CLD y HCC (**Chatterjee & Mitra, 2015**). Ambas infecciones se caracterizan por una inflamación hepática persistente, lo que constituye un factor importante para el establecimiento de la fibrosis y la cirrosis. No obstante, las estrategias de tratamiento antiviral y la introducción general de una vacuna eficaz contra la hepatitis B han reducido su impacto, y por otro lado, la introducción de agentes antivirales directos contra el virus de la hepatitis C ofrece la opción de curar la enfermedad en todo el mundo (**Weiskirchen et al., 2018**).

2.2.1 Enfermedades colestásicas crónicas

Dentro de las enfermedades colestásicas crónicas destacan la PBC y la PSC, enfermedades cuya etiología y fisiopatología solo son parcialmente conocidas, pero que se suelen considerar enfermedades autoinmunes o con un componente autoinmune. Cabe destacar que, en desproporción a su incidencia y prevalencia, siguen siendo causas muy importantes de morbilidad y mortalidad para los pacientes con enfermedades hepáticas (**Trivedi et al., 2016**). La colestasis es un síndrome clínico que se caracteriza por el bloqueo funcional de la formación de bilis a nivel de los hepatocitos, o la secreción biliar impedida a nivel de los colangiocitos o por la obstrucción del flujo biliar debido a cálculos a nivel de la vesícula biliar (colecistitis). Por tanto, la colestasis puede ser intra o

extrahepática en su etiología. (Samant et al., 2019). Se produce así una retención y acumulación de ácidos biliares (BAs) anfipáticos a nivel hepático, que cuando alcanzan concentraciones localmente altas resultan tóxicas y provocan daño hepatocelular (Jansen et al., 2017; Cai et al., 2020).

Los BAs son un grupo de moléculas estructuralmente similares derivadas del colesterol, generados en un proceso de múltiples pasos catalizados por diferentes enzimas, en la que juega un papel central la enzima CYP7A1. De esta forma se producen los dos BAs primarios, que son el ácido cólico (CA) y el ácido quenodesoxicólico (CDCA). La mayoría de los ácidos biliares primarios circulantes no existen como CA o CDCA, sino que se conjugan con glicina o taurina por medio de la enzima ácido biliar-CoA:aminoácido N-aciltransferasa (BAAT) para proporcionarles un carácter hidrofílico, que incrementa su solubilidad y reduce su toxicidad. El ácido taurocólico o tauroquenodesoxicólico (TCA/TCDC) y el ácido glicólico o glicokenodesoxicólico (GCA/GCDCA) son los BAs conjugados más comunes, aunque existen diferencias entre especies en cuanto al uso preferencial de la glicina o la taurina para la conjugación. Las especies de mamíferos como ratones, ratas y perros contienen predominantemente conjugados de taurina, mientras que los seres humanos, hámsteres y conejos contienen alrededor de dos tercios o más de conjugados de glicina, y el resto son conjugados de taurina. Los BAs conjugados con taurina son menos tóxicos que sus correspondientes ácidos biliares conjugados y no conjugados con glicina (Li & Chiang, 2020; Woolbright & Jaeschke, 2019).

Cabe destacar que las enfermedades colestásicas presentan una fisiopatología que también incluye inflamación, aumento sérico de fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) indicativas de daño hepático y una fibrosis sustancial que eventualmente progresa a cirrosis y fallo hepático. La limitación del daño hepático, la reducción de la fibrosis y el aumento de la coléresis para eliminar los niveles excesivos de ácidos biliares son los puntos más adecuados para ser modulados terapéuticamente y controlar la enfermedad. Sin embargo, se requiere una mayor comprensión de los mecanismos a través de los cuales la colestasis causa lesiones hepáticas para el desarrollo de nuevas terapias (Woolbright & Jaeschke, 2019).

2.3 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática es una fase del daño hepático que se produce en todas las CLD y que se caracteriza por un desequilibrio entre la síntesis y degradación de la ECM en favor de la deposición de las proteínas de la ECM, como son las fibras de colágeno de tipo I y III. En las primeras etapas del daño

hepático, la fibrosis hepática trata de encapsular la lesión en un intento de limitar sus consecuencias y se considera un proceso reversible (**Mallat & Lotersztajn, 2013; Ebrahimi et al., 2016**). Si no se trata, la fibrosis hepática evoluciona a cirrosis y da lugar a una pérdida progresiva de la función hepática normal, que puede conducir a la insuficiencia hepática, así como a las diferentes complicaciones que se han mencionado anteriormente, y finalmente a la muerte (**Böttcher & Pinzani, 2017**). Los mecanismos que subyacen a la fibrogénesis hepática han revelado sorprendentes similitudes con los procesos fibróticos que se producen con el daño crónico en otros tejidos, como la piel, el pulmón y el riñón (**Mallat & Lotersztajn, 2013**).

La principal fuente de acumulación de ECM y los principales mediadores de la fibrogénesis son los miofibroblastos. Se han descrito diferentes células que pueden originar estos miofibroblastos: fibroblastos residentes, fibrocitos (una célula circulante derivada de la médula ósea), células epiteliales que sufren una transición epitelio-mesénquima (EMT), células de músculo liso vascular y pericitos (células murales vasculares). Sin embargo, es la activación de las células estrelladas hepáticas y de los fibroblastos portales lo que constituye la mayor fuente de miofibroblastos (**Iwaisako et al., 2014**).

Las células estrelladas hepáticas son células no parenquimáticas que se encuentran cerca de los sinusoides, en el espacio de Disse, almacenan vitamina A y en el hígado normal muestran un fenotipo quiescente. Expresan filamentos intermedios (como vimentina y desmina) y marcadores neurales, de acuerdo con su origen neuroendocrino, tales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o la molécula de adhesión celular neural (N-CAM), entre otros. Cuando ocurre un daño hepático agudo o crónico, una compleja red de señales autocrinas y/o paracrinas promueve la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas quiescentes a un fenotipo miofibroblástico. Estas señales fibrogénicas incluyen citoquinas como la interleuquina 1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), quimioquinas, factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), mediadores lipídicos y especies reactivas de oxígeno (ROS) que son producidas por diferentes poblaciones hepáticas: hepatocitos y colangiocitos, las células endoteliales y las células del sistema inmune (macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T). Además, factores liberados por los hepatocitos necróticos y los cuerpos apoptóticos de los hepatocitos dañados también pueden promover la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas a miofibroblastos, favoreciendo así el proceso fibrogénico (**Mallat & Lotersztajn, 2013; Czaja, 2014; Ebrahimi et al., 2016; Roehlen et al., 2020**).

La transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas a miofibroblastos se caracteriza por la expresión de la proteína alfa actina del

músculo liso (α -SMA), una pérdida paralela de retinoides y gotas lipídicas y la expresión *de novo* de los receptores de los factores fibrogénicos, quimiotácticos y mitogénicos. Todo ello da lugar a una mayor proliferación, supervivencia, migración y capacidad de contracción, así como a una mayor secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, junto con una mayor síntesis de proteínas de la ECM (predominantemente colágenos fibrilares) e inhibidores de la degradación de la matriz (TIMPs) (Mallat & Lotersztajn, 2013; Czaja, 2014; Ebrahimi et al., 2016).

2.4 Inflamación hepática

La inflamación juega también un papel esencial en la enfermedad hepática. La inflamación aguda como defensa frente a estímulos nocivos es importante para el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Sin embargo, en un daño hepático sostenido, la respuesta inflamatoria persistente se considera una de las principales fuerzas impulsoras que sostienen la fibrogénesis, ya que precede y acompaña a la fibrosis hepática (Forbes & Parola, 2011).

La inflamación es un proceso que se inicia por el reclutamiento de células inmunes al hígado tras un daño hepático, que se unen a las células inmunes residentes en el tejido como son las células de Kupffer. Su activación se puede producir por los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) liberados durante la muerte de los hepatocitos o colangiocitos, por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) procedentes de diversos patógenos invasores o por las células estrelladas que también responden a señales de peligro (Marra & Tacke, 2014; Roehlen et al., 2020). La activación de las células de Kupffer resulta en un aumento de la transcripción de diferentes citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 α/β , IL-6, IL-12, IL-18, entre otras), quimioquinas y la producción de ROS. Esta producción de factores, mediante una comunicación paracrina, contribuye al daño hepático global, a la activación de las células estrelladas hepáticas y desencadena la infiltración de las células inmunes periféricas, que son responsables de una respuesta inflamatoria persistente. Además, como ya se ha comentado previamente, otras poblaciones celulares hepáticas, tanto parenquimáticas como no parenquimáticas, liberan citoquinas profibrogénicas como el TGF- β , PDGF o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), contribuyendo al mantenimiento del estado inflamatorio y a la activación de las células estrelladas hepáticas (Weiskirchen & Tacke, 2016; Fernández-Iglesias & Gracia-Sancho, 2017). Por tanto, la inflamación hepática durante las CLD depende de una compleja red de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas secretadas por diferentes poblaciones celulares hepáticas que repercute directamente sobre la fibrogénesis (Zhou et al., 2014) (Figura 3).

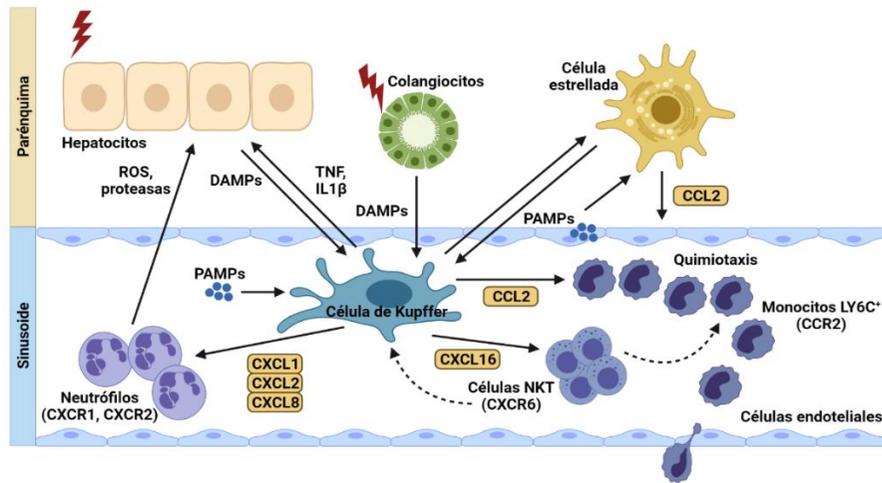


Figura 3. Representación esquemática del inicio del proceso de la inflamación hepática. Las células de Kupffer (macrófagos hepáticos residentes) son un importante sensor de las lesiones tisulares. Se activan a través de PAMPs procedentes de diversos patógenos invasores, por DAMPs liberados durante la muerte de los hepatocitos o colangiocitos y por las células estrelladas que también responden a señales de peligro. Al activarse, las células de Kupffer liberan citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β) y quimioquinas (CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL16, CCL2), que inician la respuesta de la fase aguda, atraen a los neutrófilos (a través de CXCR1/CXCR2) que liberan ROS y proteasas que afectan a los hepatocitos, células NKT (a través de CXCR6) que a su vez perpetúan las respuestas inflamatorias, y monocitos inflamatorios (a través de CCR2) que se diferencian en macrófagos hepáticos proinflamatorios. Adaptado de **Marra & Tacke, 2014**.

TNF- α es una citoquina proinflamatoria producida por una variedad de células como los monocitos, macrófagos, células estrelladas hepáticas y células de Kupffer. Los efectos de TNF- α son diversos ya que contribuye a la apoptosis de los hepatocitos, induce la síntesis de otras citoquinas proinflamatorias, recluta neutrófilos y macrófagos proinflamatorios y en la fibrosis hepática juega un papel importante en la activación de las células estrelladas hepáticas y en la síntesis de la ECM (**Crespo et al., 2002; Connolly et al., 2009; Seki & Schwabe, 2015; Wree et al., 2018; Roehlen et al., 2020**).

Las interleuquinas son un grupo de citoquinas que en principio se encontraron expresadas por leucocitos, pero más tarde se demostró que eran producidas por una amplia variedad de células como los linfocitos T CD4, los monocitos, los macrófagos y las células endoteliales. Cabe destacar que las interleuquinas tienen un papel complejo en la respuesta inmune, la inflamación y la fibrogénesis hepática. Tanto las células de Kupffer como las células endoteliales sinusoidales producen interleuquinas en respuesta al daño hepático, y éstas pueden ser tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (**Zhou et al., 2014**). Entre las interleuquinas proinflamatorias se encuentran la IL-1, que puede activar directamente a las células estrelladas hepáticas (**Gielsing**

et al., 2009) o la IL-17, cuyos niveles de expresión aumentan con el grado de fibrosis hepática, lo que indica que puede estar implicada en la progresión de la enfermedad (**Du et al., 2013; Hara et al., 2013**). Además, la IL-12 es una citoquina proinflamatoria que causa esteatosis en el hígado (**Kaneda et al., 2003**) y cuyos niveles séricos se han asociado con la infección por HCV en la enfermedad hepática crónica (**El-Emshty et al., 2015**), así como con la severidad de NAFLD (**Darmadi & Ruslie, 2021**). También se ha observado que la expresión transitoria de IL-12 transgénica en ratones desencadena fibrosis hepática y una inflamación persistente que imita la hepatitis autoinmune humana (**Gil-Farina et al., 2016**).

Por otro lado, la IL-10 regula negativamente la respuesta inflamatoria y tiene un efecto modulador en la fibrogénesis hepática, inhibiendo la actividad de las células estrelladas hepáticas (**Nelson et al., 2000; Chou et al., 2006; Huang et al., 2006a; Zhang et al., 2007a**). Por su parte, la IL-22 también ha demostrado restringir la fibrosis hepática y acelerar su resolución mediante la inducción de la senescencia de las células estrelladas hepáticas (**Kong et al., 2012**). Por otro lado, se ha descrito que la IL-4 puede tener propiedades antiinflamatorias, ya que es capaz de suprimir la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 por parte de los monocitos (**Hart et al., 1989; Woodward et al., 2010**). No obstante, también se ha descrito que puede tener un papel proinflamatorio en la patogénesis del daño hepático experimental inducido por fármacos (DILI) (**Njoku, 2010**), de manera que esta citoquina tiene un papel dual dependiendo del contexto.

Una citoquina particularmente interesante es la IL-6, para la cual se han descrito actividades tanto pro como antiinflamatorias (**Zhou et al., 2014**). Clásicamente, se asociaban estas actividades con el hecho de que el daño inflamatorio fuera crónico o agudo, respectivamente. Sin embargo, en el daño hepático su papel es más complejo. Por un lado, estudios experimentales en HCC inducido químicamente en ratones han mostrado una correlación entre los niveles de IL-6 y la hepatocarcinogénesis (**Naugler et al., 2007; Yeh & Chen, 2010**). Por otro lado, también se ha observado un incremento en los niveles de expresión de IL-6 en los pacientes con NASH, estableciéndose una correlación directa entre los niveles de IL-6 hepáticos, el grado de inflamación y el estadio de fibrosis. En este estudio también se ha correlacionado positivamente la expresión de IL-6 en el hígado con sus niveles plasmáticos y el grado de resistencia sistémica a la insulina (**Wieckowska et al., 2008**). Asimismo, también se ha encontrado un aumento en los niveles de IL-6 en sangre en pacientes con NAFLD, esto junto a evidencias que apuntan a que la IL-6 podría inducir resistencia a la insulina e inflamación en el hígado, sugiere que podría desempeñar un papel en el desarrollo de NAFLD (**Tarantino et al., 2009; Tarantino et al., 2010**). Por otro lado, las células estrelladas hepáticas activadas

pueden producir IL-6 y otras citoquinas para perpetuar la actividad profibrogénica de los macrófagos (Roehlen et al., 2020). Los mecanismos moleculares subyacentes al papel profibrogénico de la IL-6 no están claros, pero estudios *in vitro* en fibroblastos dérmicos han asociado la IL-6 con una hiperactivación de la señalización del TGF- β /Smad3 (O'Reilly et al., 2014).

En contraposición a su papel patogénico, la IL-6 se ha asociado con funciones protectoras durante la fibrogénesis hepática. Así, se ha visto que la IL-6 reduce tanto el daño hepático agudo y crónico, como la fibrosis, inducidos por el tetracloruro de carbono (CCL₄) (Kovalovich et al., 2000). Por otro lado, el pretratamiento con IL-6 de un hígado fibrótico inducido por CCL₄, mejora el microambiente hepático y lo prepara para el trasplante de células madre mesenquimales, lo cual da lugar a una mejora del daño hepático tras la fibrosis (Nasir et al., 2013). Además, la IL-6 es importante para la capacidad regenerativa del hígado, ya que se ha observado que ratones que carecen de IL-6 presentan un menor número de HPC/células ovals regenerativas y una menor regeneración (Yeoh et al., 2007; Ji et al., 2016; Naseem et al., 2018). Por tanto, queda demostrado que la IL-6 tiene un papel dual dependiendo del contexto.

Es importante mencionar también que las quimioquinas, una familia de citoquinas pequeñas, y sus correspondientes receptores, juegan un papel importante en dirigir la infiltración de las células inmunes hacia los tejidos dañados impulsando las respuestas inflamatorias. Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular (8-13 kDa) que se clasifican en cuatro familias diferentes (CC, CXC, CX3C, C) basándose en la presencia de motivos de cisteína NH₂-terminal. En total, el sistema de quimioquinas comprende genes que codifican 50 ligandos de quimioquinas y 20 receptores afines, varios de los cuales se ha visto que son relevantes en el contexto de las enfermedades hepáticas. Una de las quimioquinas mejor caracterizadas durante la fibrogénesis hepática es CCL2, cuya expresión está asociada a la infiltración de monocitos, que expresan el receptor CCR2. La relevancia funcional de la vía CCL2-CCR2 ha sido ampliamente confirmada en varios modelos experimentales de fibrosis hepática utilizando ratones deficientes en CCL2 o CCR2 (Marra & Tacke, 2014). Se ha observado que ratones deficientes en CCR2 presentan una reducción de la fibrosis hepática inducida por CCL₄ y la ligadura del conducto biliar (BDL) (Seki et al., 2009). Otra quimioquina importante en la fibrosis hepática es CCL3, ya que se ha observado que ratones deficientes en CCL3 presentan una menor fibrosis hepática y, además, esta quimioquina lleva a una mayor proliferación y migración de las células estrelladas hepáticas *in vitro* (Heinrichs et al., 2013).

2.5 Cirrosis y HCC

Como ya se ha comentado anteriormente, la cirrosis hepática es el resultado patológico final de las CLD que se caracteriza por una degeneración y necrosis de hepatocitos, presencia de nódulos regenerativos rodeados por tejido fibroso denso y pérdida de la función hepática. Además, también se producen cambios significativos en la arquitectura vascular, de manera que la cirrosis conduce a menudo a la hipertensión portal y a complicaciones relacionadas como las hemorragias variceales, encefalopatía hepática, ascitis o síndrome hepatorenal (Zhou et al., 2014; Parola & Pinzani, 2019). Cuando la cirrosis progresa puede dar lugar al desarrollo de HCC, que representa alrededor del 90% de los cánceres primarios de hígado y es una de las principales causas de muerte por cáncer en todo el mundo. La cirrosis hepática sigue siendo uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de HCC (Balogh et al., 2016).

2.6 Modelos animales para estudiar las CLD

Teniendo en cuenta todo lo anterior, queda demostrada la necesidad de mejorar nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares que contribuyen al desarrollo y progresión de las CLD, con el fin de poder desarrollar nuevas herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas. Para ello, los investigadores utilizan normalmente modelos experimentales de ratones debido a su pequeño tamaño y corto periodo de gestación, lo cual hace que sean fáciles de mantener y criar. Además, la notable similitud genética de los ratones con los humanos, combinada con la posibilidad de la manipulación genética, también explica que los ratones sean a menudo los animales de experimentación preferidos para imitar las enfermedades humanas. Cabe destacar que estos modelos animales permiten a los investigadores estudiar la biología celular en un sistema complejo, que incluye órganos enteros y organismos vivos. Por tanto, estos modelos animales ofrecen oportunidades para estudiar las características biológicas, patológicas e histológicas de las CLD humanas y constituyen una plataforma útil para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos y probar nuevos medicamentos (Liu et al., 2013).

Existen distintos modelos animales experimentales para estudiar las CLD. Por un lado, existen modelos en los que la fibrosis hepática es inducida químicamente por hepatotoxinas, como es el caso del CCL₄, la tioacetamida (TAA) y el dietil o dimetil nitrosamina (DMN y DEN). Por otro lado, también existen modelos animales de fibrosis biliar, como por ejemplo, modelos en los que se realiza BDL o modelos que imitan enfermedades colestásicas como PBC o PSC. Entre estos últimos podemos encontrar regímenes dietéticos como la dieta suplementada con 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (DDC), que se detallará

a continuación. Además, también existen modelos de ratones genéticamente modificados (transgénicos o knockout, como son los ratones *Mdr2^{-/-}*) que afectan a diferentes componentes fibrogénicos clave o alteran la función de los hepatocitos y causan espontáneamente fibrosis hepática. Otros modelos imitan la hepatitis autoinmune, la infección viral crónica, NAFLD y ALD (**Delire et al., 2015**).

Sin embargo, cabe destacar que hasta la fecha ningún modelo animal exhibe todos los atributos de las enfermedades hepáticas humanas, de manera que la mayoría de estos modelos imitan solo características particulares de las enfermedades humanas, y solo son útiles para responder a preguntas específicas. Además, hay que tener siempre en cuenta que existen diferencias de especie entre los humanos y los animales y, por ello, trasladar los resultados obtenidos en los animales a los ensayos clínicos puede ser un desafío (**Liu et al., 2013**). Por ello, las limitaciones de los modelos animales han propiciado el desarrollo de sistemas avanzados complementarios de cultivo celular humano *in vitro* en 3D. Éstos permiten estudiar la función y la regulación de las células, así como la eficacia y la toxicidad de los medicamentos, en un entorno controlado y restringido, pero más cercano al contexto tisular hepático *in vivo* (**Nevezorova et al., 2020**), siendo estas aproximaciones complementarias a los modelos *in vivo*.

2.6.1 Dieta 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (DDC)

El modelo DDC consiste en una administración *ad libitum* de agua y de una dieta suplementada con un 0,1% de la hepatotoxina porfirinogénica DDC. Esta dieta provoca la inhibición de la enzima mitocondrial ferroquelatasa, dando lugar a la acumulación de protoporfirina. Este pigmento se acumula en el citoplasma de las células parenquimáticas en la región periportal y, debido a su naturaleza hidrofóbica, el exceso de protoporfirina solo puede salir del hígado a través de la secreción biliar, dando lugar a la precipitación y formación de cristales en los canalículos y conductos biliares, lo cual obstruye el árbol biliar. Por tanto, el tejido responde con una reacción ductular, pericolangitis, fibrosis periductal y fibrosis portal-portal tras 4-8 semanas de tratamiento, lo cual se asemeja a la enfermedad colestásica humana PSC. Además, los marcadores séricos colestásicos como la ALP y la bilirrubina, así como la ALT, son inducidos significativamente en estos ratones a partir de una semana de tratamiento. Cabe destacar que este modelo es útil para investigar los mecanismos de las colangiopatías crónicas y sus consecuencias, incluida la fibrosis biliar (**Fickert et al., 2007; Delire et al., 2015**). Además, este modelo es uno de los más eficientes para estudiar la expansión de HPC/células ovals en modelos murinos de daño hepático (**Yamazaki et al., 2011**).

2.7 Terapia y tratamiento de las CLD

Como ya se ha mencionado anteriormente, las CLD representan una gran amenaza para la salud pública mundial. Siendo la fibrosis el elemento más prominente de las diferentes CLD, sería la diana más adecuada para enfrentar estas enfermedades. Sin embargo, hasta la fecha todavía no hay medicamentos aprobados para el tratamiento de la fibrosis o la cirrosis hepática, y la única opción terapéutica es el trasplante de hígado para pacientes con enfermedad hepática en fase terminal, así como para algunos pacientes con HCC (**Lemoinne & Friedman, 2019**). No obstante, los estudios realizados en las dos últimas décadas están permitiendo descifrar los mecanismos celulares y moleculares de la fibrosis hepática, facilitando la comprensión de las bases de las posibles estrategias antifibróticas (**Lee et al., 2015**).

Por un lado, la terapia de la fibrosis hepática debería incluir idealmente el tratamiento de la causa subyacente de la enfermedad. Así, la supresión o la cura del virus de la hepatitis B y C, respectivamente, podrían conducir a la regresión de la fibrosis hepática e incluso de la cirrosis (**D'Ambrosio et al., 2012; Marcellin et al., 2013**). De forma similar, la pérdida de peso, lograda ya sea por la modificación del estilo de vida o por cirugía, puede reducir las características histológicas de NASH (esteatosis o inflamación), y en consecuencia, la fibrosis hepática (**Vilar-Gomez et al., 2015; Lee et al., 2019**). Sin embargo, el tratamiento de la causa subyacente de la enfermedad no siempre es posible, en particular en el caso de las enfermedades colestásicas, para las que no existen tratamientos específicos.

Por ello, los avances en el conocimiento de los mecanismos de las CLD están permitiendo el estudio y la propuesta de nuevos tratamientos centrados en la inhibición de las células estrelladas hepáticas, la inhibición de la síntesis de colágeno, la promoción de la degradación de la ECM, el bloqueo de la acción del TGF- β o el control de la respuesta inflamatoria, entre otros. Las expectativas son que la reducción de la fibrosis hepática para retrasar el desarrollo de la cirrosis tenga un notable impacto en la salud mundial y pueda también reducir la creciente incidencia del HCC. Cabe destacar que, lamentablemente, aunque algunas de estas estrategias funcionan bien en los modelos preclínicos, ninguna de ellas se ha traducido en terapias efectivas en humanos hasta la fecha (**Cheng & Wong, 2017; Weiskirchen et al., 2018; Lemoinne & Friedman, 2019**).

3. Células progenitoras hepáticas (HPC)/células ovales

3.1 Generalidades

Como ya se ha mencionado anteriormente, en situaciones en las que la capacidad regenerativa de los hepatocitos o los colangiocitos se ve comprometida, se produce la activación de las HPC/células ovales para llevar a cabo el proceso regenerativo (Bria et al., 2017; Chen et al., 2017). Estas células fueron identificadas por primera vez en el año 1937 por Kinoshita, pero fue en 1956 con E. Farber cuando se les dio el nombre de células ovales. Son células pequeñas de aproximadamente 7-10 μm de diámetro, basófilas, con una alta relación núcleo/citoplasma y este gran núcleo presenta una forma ovalada (de ahí su nombre). Estas células tienen naturaleza bipotencial, es decir, pueden diferenciarse tanto a hepatocitos como a células del epitelio biliar en respuesta a un daño hepático (Köhn-Gaone et al., 2016). Es interesante mencionar que, aparte de su naturaleza bipotencial, estas células pueden diferenciarse a linajes celulares no hepáticos, generando células de otros órganos, como por ejemplo células pancreáticas, cuando se colocan en el microentorno adecuado, lo cual evidenciaría su carácter multipotencial (Cardinale et al., 2011).

El proceso regenerativo mediado por las HPC/células ovales suele denominarse "respuesta de células ovales" o "reacción ductular (DR)" debido a que las HPC/células ovales que proliferan se organizan en estructuras ductales o ductos (Bria et al., 2017). Cabe destacar que la DR se identifica comúnmente en las enfermedades colestásicas como la PBC, PSC o la atresia biliar, aunque también puede ser identificada en otras enfermedades hepáticas como la hepatitis alcohólica, NAFLD, NASH, infección viral crónica o HCC. La DR va más allá de solo la proliferación ductal ya que abarca una respuesta celular compleja en la que participan células del estroma, células inflamatorias y células infiltradas en el hígado, incluidos los macrófagos derivados de la médula ósea. Se cree que hay distintos tipos de DR en las CLD, de forma que los mecanismos subyacentes, los tipos celulares implicados y las reacciones asociadas, difieren dependiendo de la patología o el contexto particular. De hecho, se piensa que esta reacción puede ser dirigida por los colangiocitos y las HPC/células ovales, pero también por los hepatocitos que pueden transdiferenciarse a colangiocitos o células con características de células biliares. En algunos casos, la DR se asocia con la fibrosis hepática y su extensión es proporcional a la severidad del daño, llegando a asociarse a la mortalidad de los pacientes. Sin embargo, la DR también es un factor importante para la regeneración hepática durante el daño de los hepatocitos y los colangiocitos. Por tanto, se necesitan más estudios para dilucidar los mecanismos detallados y su papel específico en las enfermedades hepáticas, ya que aún no está claro si la DR promueve la fibrosis hepática o si

por el contrario protege al hígado al mejorar la regeneración hepática (Sato et al., 2019).

Se han utilizado diferentes modelos de daño hepático en roedores para estudiar la activación y expansión de las HPC/células ovas (Verhulst et al., 2015). La activación y expansión de estas células generalmente se induce mediante la exposición a diferentes agentes químicos y carcinogénicos. Entre los modelos más utilizados en ratones se encuentran una dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (dieta CDE) (Akhurst et al., 2001), una dieta suplementada con DDC (Preisegger et al., 1999; Fickert et al., 2007) o una dieta deficiente en metionina y colina (MCD) (Rinella et al., 2008). En ratas, el modelo más utilizado y conocido para el estudio de las HPC/células ovas es la combinación de PH con tratamiento con 2-acetilaminofluoreno (2-AAF). Otra opción empleada en ratas para observar la respuesta de las HPC/células ovas es el tratamiento con D-galactosamina, agente que bloquea la síntesis de RNA y proteínas en hepatocitos. El tratamiento con CCL₄ induce preferentemente la proliferación de hepatocitos y por ello es frecuente utilizar la combinación de CCL₄ con 2-AAF para observar la expansión de las HPC/células ovas (Santoni-Rugiu et al., 2005; Tan et al., 2015).

3.2 Origen

Se sabe que durante la regeneración mediada por las HPC/células ovas, éstas emergen de la zona periportal del hígado. Sin embargo, el origen celular sigue siendo controvertido y siguen surgiendo diferentes teorías. Desde su caracterización inicial, el parecido fenotípico entre las HPC/células ovas y las células epiteliales biliares ha sugerido que presumiblemente se originan en el árbol biliar. Por ello, la teoría clásica sostiene que las HPC/células ovas derivan de las células madre quiescentes ubicadas en el Canal de Hering, que es la estructura que conecta los canalículos biliares formados por hepatocitos con los conductos biliares revestidos por colangiocitos en la tríada portal, y que se considera el nicho para dichos precursores de las HPC/células ovas (Fausto & Campbell, 2003; Itoh & Miyajima, 2014; Lukacs-Kornek & Lammert, 2017). Otro modelo propone la existencia de una jerarquía de células madre hepáticas en diferentes fases de maduración, donde la HPC/célula oval más madura es la que tiene capacidad bipotencial. Un modelo adicional sugiere que hay diferentes células precursoras de hepatocitos y colangiocitos, en lugar de una población progenitora bipotencial (Duncan et al., 2009). Por otro lado, también se ha sugerido un origen extrahepático (la médula ósea) de las HPC/células ovas en rata (Petersen et al., 1999). Otras teorías sostienen que las HPC/células ovas pueden provenir de células estrelladas hepáticas (Kordes et al., 2014), o de hepatocitos o colangiocitos, después de un proceso de

desdiferenciación en respuesta a un daño hepático (Tarlow et al., 2014; Bria et al., 2017).

3.3 Marcadores

Las HPC/células ovals conforman una población celular heterogénea con diferentes estados de diferenciación reflejados por cambios fenotípicos dinámicos que dependen del tipo de célula que ha sufrido el daño (Boulter et al., 2013). A pesar de la falta de marcadores específicos, se han descrito varios antígenos de superficie y proteínas intracelulares características de las HPC/células ovals. Debido a su naturaleza progenitora bipotencial, estas células poseen un fenotipo singular ya que coexpresan marcadores típicos de linaje biliar como las citoqueratinas 7 y 19 (CK7 y CK19), A6, el antígeno de célula oval 6 (OV6) y la molécula de adhesión de células epiteliales (EPCAM); y marcadores de hepatocito inmaduro, como alfa-fetoproteína (AFP) o la proteína 1 tipo Delta (Dlk1), así como de hepatocito maduro, incluyendo las citoqueratinas 8 y 18 (CK8 y CK18), albúmina (ALB) y c-MET (receptor del factor de crecimiento hepático o HGF). Además, también presentan marcadores asociados a linajes hematopoyéticos como el antígeno de diferenciación a timocito (Thy-1, conocido como CD90), CD34, el antígeno 1 de células madre (Sca-1), c-KIT y CXCR4; marcadores neuroepiteliales como la molécula de adhesión de células neurales (N-CAM) y cromogranina; y marcadores de células madre como CD133, CD44 y nestina (Yovchev et al., 2008; Bria et al., 2017; Chen et al., 2017; Rmilah et al., 2019).

Sin embargo, su identificación inequívoca y su caracterización son un obstáculo importante en la investigación de las HPC/células ovals, ya que ninguno de los marcadores citados anteriormente expresados por estas células es específico, lo que hace que sea difícil distinguir entre poblaciones celulares distintas que comparten algunos de estos marcadores. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales para hallar marcadores específicos para las HPC/células ovals (Chen et al., 2017).

3.4 Respuesta de las HPC/células ovals

Siguiendo la teoría clásica, tras la activación de sus precursores, se produce la expansión de las HPC/células ovals que proliferan, migran al parénquima hepático y finalmente se diferencian a hepatocitos y/o colangiocitos. Por ello, la respuesta de las HPC/células ovals puede dividirse en 4 fases: activación, proliferación, migración y diferenciación (Tanaka et al., 2011). Estas fases están reguladas por el microambiente, también denominado nicho, el cual está compuesto por diferentes tipos de células, componentes de la ECM, factores de crecimiento, citoquinas y otras señales y moléculas

liberadas por las células del propio nicho, que ayudan a mantener las características de las HPC/células ovals y el equilibrio entre su activación, proliferación, migración y diferenciación (Chen et al., 2017).

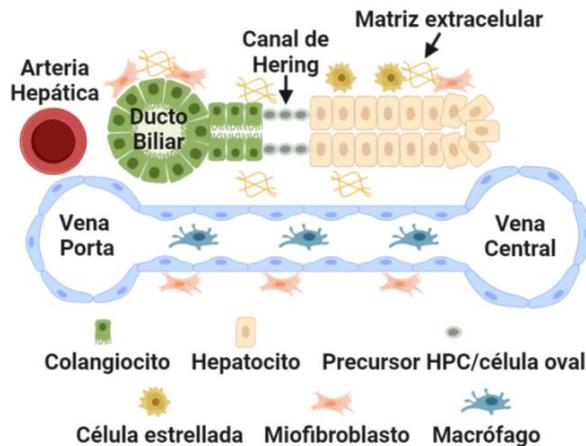


Figura 4. Modelo del nicho de las células madre quiescentes precursoras de las HPC/células ovals. El canal de Hering proporciona un nicho para las células madre quiescentes precursoras de las HPC/células ovals. Este nicho está compuesto por diferentes tipos de células, componentes de la ECM, factores de crecimiento, citoquinas y otras señales y moléculas. Adaptado de Chen et al., 2017.

Potencialmente todos los tipos celulares del hígado pueden interactuar con las HPC/células ovals, incluyendo hepatocitos, colangiocitos, células estrelladas, miofibroblastos, células de Kupffer, células endoteliales sinusoidales, macrófagos y linfocitos. Estas células, que están estrechamente asociadas con las HPC/células ovals, tienen la capacidad de influir en su supervivencia, proliferación, migración y diferenciación mediante la secreción de factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas (Lorenzini et al., 2010; Bria et al., 2017; Chen et al., 2017).

Existen distintas señales que modulan la respuesta regenerativa de las HPC/células ovals, que pueden actuar directamente sobre las HPC/células ovals o indirectamente a través de células no parenquimáticas que, a su vez, actúan sobre las HPC/células ovals. Dentro de este conjunto de señales, se encuentran factores de crecimiento como el HGF, TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α) o el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), entre otros; la proteína morfogenética ósea-9 (BMP9); citoquinas como IL-6, TNF- α , interferón gamma (IFN- γ) o el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK); hormonas como la somatostatina o la insulina; adipoquinas como la leptina; quimioquinas como el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) o neurotransmisores como la serotonina, la epinefrina o la norepinefrina (Erker &

Grompe, 2008; Best et al., 2013; Lukacs-Kornek & Lammert, 2017; Addante et al., 2018). Por último, los morfógenos (factores que desempeñan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario) como Wnt, Notch y Hedgehog son reguladores clave de la respuesta de las HPC/células ovasales tal y como han puesto de manifiesto estudios *in vivo* e *in vitro* (Apte et al., 2008; Darwiche et al., 2011; Bria et al., 2017; Chen et al., 2017).

Por tanto, queda patente la existencia de un elevado número de señales y moléculas que regulan las HPC/células ovasales y que generan una compleja red reguladora cuyos mecanismos e interrelaciones son solo parcialmente conocidos. Así, sería necesario comprender en profundidad los mecanismos que median la respuesta de las células progenitoras y regulan su biología para poder modular su respuesta con objetivos terapéuticos.

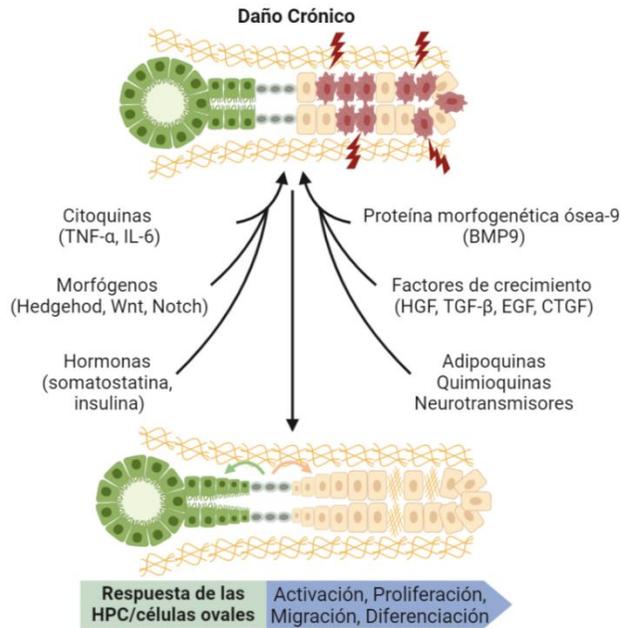


Figura 5. Respuesta de las HPC/células ovasales. Durante un daño crónico, se produce una pérdida masiva de hepatocitos, de manera que no queda suficiente masa de hepatocitos sanos para restaurar la función hepática. Por ello, el compartimento de las HPC/células ovasales se activa en un intento de restaurar la masa, arquitectura y función de las células epiteliales hepáticas. Cuando se activan, las HPC/células ovasales bipotenciales son capaces de infiltrarse a lo largo del parénquima hepático desde los Canales de Hering, proliferar y diferenciarse en hepatocitos y/o colangiocitos. Este proceso regenerativo está regulado por un gran número de señales y moléculas, entre las cuales se encuentran diversos factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, morfógenos, adipoquinas, quimioquinas y neurotransmisores. Adaptado de Best et al., 2013.

3.5 Las HPC/células ovals en terapia

En la actualidad, el trasplante ortotópico del hígado es el tratamiento estándar frente a varias enfermedades hepáticas agudas, crónicas, congénitas o adquiridas en fase final. Sin embargo, este procedimiento presenta numerosas limitaciones y obstáculos como son el bajo número de donantes, las complicaciones postoperatorias o la necesidad de una inmunosupresión de por vida. Todo ello hace que sea necesaria la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos para restaurar la función hepática. En este contexto, la terapia celular se ha presentado como una novedosa estrategia que se introdujo hace varios años para el tratamiento de diferentes patologías hepáticas (**Dollé et al., 2010; Heydari et al., 2020**), como es el caso de la regeneración mediante la repoblación del hígado con hepatocitos trasplantados en pacientes con enfermedades metabólicas congénitas hepáticas o con fallo hepático agudo. Los ensayos clínicos han demostrado que el trasplante de hepatocitos es un procedimiento seguro y eficaz, pero sólo corrige parcialmente los trastornos metabólicos a corto plazo. Además, este procedimiento también presenta una serie de problemas asociados como son la dificultad de obtener una fuente de hepatocitos fácil y reproducible, el bajo nivel de integración celular, las dificultades para la criopreservación, la dificultad de identificar las células después del trasplante y la necesidad de inmunosupresión a largo plazo (**Gilgenkrantz & Collin de l'Hortet, 2018; Giancotti et al., 2019**).

Por todas estas razones, y debido a la naturaleza bipotencial y capacidad demostrada para regenerar el hígado dañado de forma aguda o crónica de las HPC/células ovals, éstas se han propuesto como candidatas para la terapia celular. El papel regenerador de las HPC/células ovals ha sido probado en experimentos de trasplante, como por ejemplo en los realizados en ratas sometidas a PH, donde las células progenitoras epiteliales fetales del hígado de rata trasplantadas fueron capaces de repoblar el hígado receptor (**Sandhu et al., 2001; Oertel et al., 2008**). Por otro lado, estudios realizados en ratones indicaron que las HPC/células ovals de los ratones (inducidas por la dieta DDC) tienen una amplia capacidad de repoblación hepática (**Wang et al., 2003**). Éstos y otros estudios (**Suzuki et al., 2008**) han demostrado de manera convincente el potencial regenerativo que tienen estas células. Cabe destacar que, además, presentan ciertas ventajas sobre los hepatocitos ya que generalmente exhiben una mayor capacidad proliferativa y tienen una menor sensibilidad a la criopreservación, así como un menor tamaño, que se traduce en una mejor eficiencia de trasplante (**Lombard et al., 2013**).

En base a lo mencionado anteriormente, es fundamental comprender las señales que regulan y modulan la activación de las HPC/células ovals en la dirección correcta porque no solo ayudará a determinar su verdadero potencial

regenerativo y permitirá esclarecer si realmente tienen un papel en el agravamiento del proceso fibrótico y el desarrollo de HCC, tal y como algunas evidencias muestran, sino que también facilitará el desarrollo de posibilidades terapéuticas para acelerar la reestructuración y el funcionamiento del hígado tras un daño crónico (Kaur et al., 2015; Köhn-Gaone et al., 2016).

3.6 Las HPC/células ovals en fibrosis hepática y HCC

Como ya se ha mencionado anteriormente, las HPC/células ovals están presentes y se activan tanto en modelos animales de daño hepático crónico como en diferentes patologías hepáticas humanas, como es el caso de las enfermedades colestásicas PBC y PSC, donde se observa un patrón diferente de activación de las HPC/células ovals que se caracteriza por un compromiso de linaje diferente y un predominio de diferentes vías de señalización (Carpino et al., 2018). Algunos estudios realizados en humanos y roedores han establecido una aparente correlación directa entre la expansión de las HPC/células ovals y el grado de fibrosis (Williams et al., 2014; Kitade et al., 2019). Es por ello que existe la idea de que las HPC/células ovals tienen una posible dualidad de actividad pro-fibrótica/pro-tumorigénica y pro-regenerativa.

Entre los estudios que apoyan un papel de las HPC/células ovals como inductoras de la progresión de la fibrosis, encontramos el estudio realizado por Chobert et al., 2012, en el que se demostraba en un modelo de daño hepático inducido por el tratamiento combinado con 2-AAF/CCL₄ en ratas que las HPC/células ovals dan lugar al aumento de la fibrosis y a la progresión de la enfermedad mediante la expresión de TGF- β , el cual promueve la transformación de las células estrelladas a miofibroblastos. Por otro lado, Kuramitsu et al., 2013 han demostrado que el fallo en la regeneración mediada por los hepatocitos en los hígados fibróticos de ratones activa el compartimento de las HPC/células ovals, las cuales, a su vez, activan una respuesta fibrótica severa, de manera que la inhibición de la proliferación de dichas células mejoraría la regeneración hepática. Además, Peng et al., 2016 han demostrado que la inhibición de la integrina $\alpha\beta 6$ expresada por las HPC/células ovals reduce la respuesta de dichas células proporcionando así protección contra la fibrosis hepática en modelos murinos de daño biliar crónico. Otros estudios han observado que las HPC/células ovals pueden diferenciarse a miofibroblastos, acentuando la progresión de la fibrosis (Pan et al., 2017; Liu et al., 2020). Adicionalmente, se ha observado que las HPC/células ovals que expresan *Prom1* promueven la fibrosis biliar que está asociada a la activación de los miofibroblastos en un modelo de BDL (Fenlon et al., 2020). Por el contrario, también existen estudios que apoyan un papel antifibrótico de las HPC/células ovals. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Bi et al., 2019 en el que han observado que el trasplante de las HPC/células ovals humanas adultas

previene la fibrosis hepática avanzada inducida por CCL₄ en ratones. Otro ejemplo es el estudio realizado por **Dai et al., 2020** en el que se observa una respuesta protectora frente a la fibrosis a través de la expansión de las HPC/células ovals.

Por otro lado, también existen estudios que consideran la fibrosis como un factor que promueve la activación de las HPC/células ovals. En ellos se propone que la remodelación de la ECM podría impulsar la expansión de las HPC/células ovals y su respuesta regenerativa (**Pi et al., 2005; Van Hul et al., 2009**). No obstante, es importante destacar que estas dos ideas opuestas en el orden de los acontecimientos no son mutuamente excluyentes, y que esta paradoja puede resolverse reconociendo la heterogeneidad en la activación y evolución de la DR en el contexto específico de los diferentes modelos utilizados. A pesar de esta controversia de causa y efecto, está claro que las interacciones entre las HPC/células ovals y los componentes de la ECM son fundamentales para la regulación del destino de estas células (**Köhn-Gaone et al., 2016**).

Además, cuando se produce una desregulación de su vía de activación o diferenciación, las HPC/células ovals son susceptibles de sufrir una transformación maligna y convertirse en células iniciadoras tumorales capaces de conducir a la hepatocarcinogénesis (**Lee et al., 2009**). Esta relación entre las HPC/células ovals y el HCC ha sido demostrada en diferentes estudios (**Dumble et al., 2002; Lee et al., 2006; Mishra et al., 2009; Köhn-Gaone et al., 2016**).

En resumen, todas estas evidencias apoyan la idea, ya mencionada previamente, de la necesidad de comprender mejor los mecanismos que regulan el comportamiento de las HPC/células ovals durante las enfermedades hepáticas crónicas, así como los diferentes factores de crecimiento que están implicados en dichos procesos, de cara a poder diseñar estrategias terapéuticas regenerativas seguras y efectivas.

4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

4.1 Familia EGFR/ErbB

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) representa uno de los receptores más estudiados en la historia de la investigación (**Qin & Beier, 2019**). Su ligando prototípico, el EGF, fue descubierto por Stanley Cohen en extractos crudos de la glándula salival de ratón hace más de medio siglo (**Cohen, 1962**). 20 años más tarde Cohen purificó el EGFR (**Cohen et al., 1982**) y debido a su trabajo fundamental en el campo de la señalización de los factores de

crecimiento fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1986.

El EGFR, también conocido como ErbB1 o HER-1, pertenece a una familia de receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs) que incluye otros miembros como ErbB2/HER-2/Neu, que no tiene ligandos conocidos; ErbB3/HER-3, que tiene un dominio con actividad tirosina quinasa inactivo debido a la sustitución de aminoácidos críticos; y ErbB4/HER-4. Estructuralmente, el EGFR está compuesto por un dominio extracelular de unión a ligando, seguido de un dominio hidrofóbico transmembrana corto y un dominio intracelular, donde se encuentran el dominio con actividad tirosina quinasa y la cola carboxílica (Scaltriti & Baselga, 2006; Morandell et al., 2008; Lemmon et al., 2014; Komposch & Sibilis, 2015). Estos receptores se expresan en casi todos los tipos celulares, excepto en las células hematopoyéticas, y disparan y modulan diferentes respuestas celulares, que van desde la proliferación, apoptosis/supervivencia y diferenciación, hasta la motilidad celular y la adhesión (Berasain & Ávila, 2014; Wee & Wang, 2017; Qin & Beier, 2019).

El EGFR se sintetiza a partir de un precursor polipeptídico de 1210 residuos, que tras el corte de la secuencia N-terminal se inserta en la membrana celular como una proteína altamente glicosilada de 1186 residuos y 170 kDa. Los diferentes receptores de la familia poseen diferentes grados de homología; así, EGFR y ErbB3 poseen un 53% de similitud mientras que EGFR y ErbB2 presentan un 64%. El grado de homología es variable también en los distintos dominios, siendo los dominios con actividad tirosina quinasa los que presentan un mayor grado de homología (promedio 59-81%), y los dominios carboxi-terminales un grado de homología más bajo (promedio 12-30%) (Jorissen et al., 2003).

El dominio extracelular del EGFR, también llamado ectodominio (residuos 1-620), consta de cuatro dominios denominados I (L1), II (CR1), III (L2) y IV (CR2) (Figura 6). Los ligandos se unen entre los dominios I y III (dominios ricos en leucinas) del EGFR; los dominios II y IV (dominios ricos en cisteínas) participan en la formación de homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia EGFR/ErbB; a continuación se encuentran el dominio alfa hélice transmembrana (residuos 621-643) y el dominio yuxtamembrana (residuos 644-685), entre cuyas funciones están la regulación negativa del receptor y su internalización dependiente de ligando (Kil & Carlin, 2000). Ya intracelularmente, además del dominio con actividad tirosina quinasa (residuos 686-953) se halla un dominio de autofosforilación (residuos 954-1136) que incluye los residuos de tirosina que van a ser fosforilados y que van a mediar la transducción de señales disparadas por el EGFR. Además, también hay varios residuos de serina/treonina (y otros residuos de tirosina) cuya fosforilación

participaría en la regulación negativa de los receptores y cuyas secuencias parecen ser necesarias para la endocitosis (Jorissen et al., 2003).

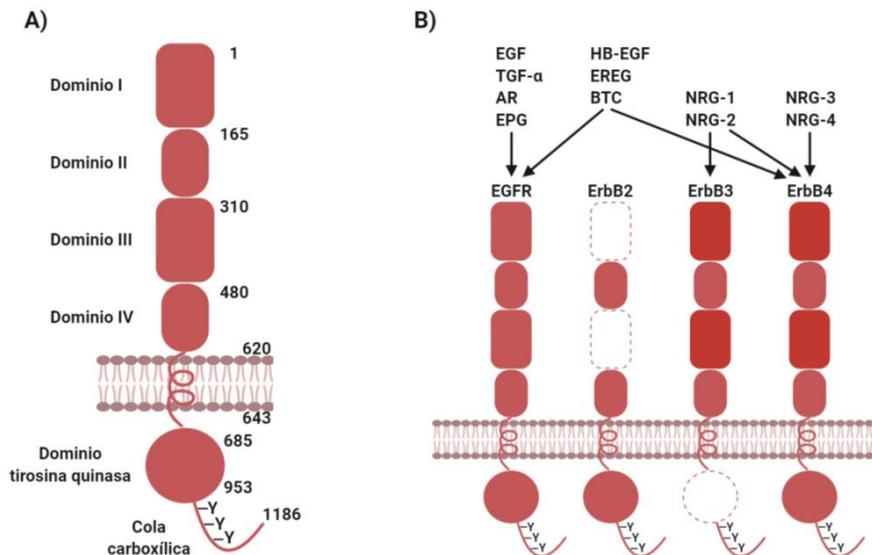


Figura 6. Representación esquemática de los receptores y ligandos de la familia EGFR/ErbB. **A)** Estructura del EGFR. El dominio extracelular (ectodominio) consta de cuatro dominios denominados I (L1), II (CR1), III (L2) y IV (CR2). Se muestra una estructura representativa del dominio con actividad tirosina quinasa, seguido de una cola carboxilica que contiene los residuos de tirosina que van a ser fosforilados. **B)** El EGFR es uno de los cuatro miembros de la familia EGFR/ErbB, que incluyen a ErbB2/HER-2/Neu (sin ligandos conocidos); ErbB3/HER-3, que tiene un dominio con actividad tirosina quinasa inactivo debido a la sustitución de aminoácidos críticos; y ErbB4/HER-4. El EGFR es activado por EGF, TGF- α , anfiregulina (AR) y epigeno (EPG). Los ligandos con especificidad dual regulan tanto EGFR como ErbB4 y son el EGF de unión a heparina (HB-EGF), la epiregulina (EREg) y la betacelulina (BTC). Las neuregulinas (NRG) 1 y 2 regulan ErbB3 y ErbB4, mientras que las neuregulinas 3 y 4 parecen ser específicas para ErbB4. Adaptado de Lemmon et al., 2014.

Existen siete ligandos conocidos que se unen a receptores de la familia ErbB y que se pueden clasificar en tres grupos diferentes dependiendo de su especificidad de unión. El primer grupo incluye el EGF, el TGF- α , la anfiregulina (AR) y el epigeno (EPG), los cuales se unen específicamente al EGFR/ErbB1; el segundo grupo incluye la betacelulina (BTC), EGF de unión a heparina (HB-EGF) y epiregulina (EREg), los cuales muestran una especificidad dual ya que pueden unirse tanto a EGFR como a ErbB4; y el tercer grupo, las neuregulinas (NRG), forma dos subgrupos, NRG-1 y 2 por un lado y NRG-3 y 4 por otro, en función de su capacidad para unirse a ErbB3 y ErbB4, o sólo a ErbB4, respectivamente. Como se indicó anteriormente, el ErbB2 no tiene ligandos conocidos (Figura 6). Estos ligandos se sintetizan como proteínas precursoras transmembrana de tipo I, caracterizadas por la presencia de un dominio similar al EGF, el cual define la especificidad de unión al receptor; un dominio similar a la inmunoglobulina; un

dominio transmembrana hidrofóbico y una cola citoplasmática hidrofílica. Además, también están presentes motivos adicionales que incluyen sitios de glicosilación y dominios de unión a heparina en AR y HB-EGF (**Berasain et al., 2011**). La liberación de las formas solubles y activas de estos ligandos se produce por corte proteolítico del dominio extracelular en respuesta a estímulos fisiológicos y farmacológicos. Esta acción está mediada por proteasas transmembrana pertenecientes a una familia de desintegrinas y metaloproteasas (ADAM), como es el caso de ADAM17, (también conocida con el nombre de enzima convertidora TNF- α (TACE)) y ADAM10 (**Blobel, 2005; Blobel et al., 2009**). ADAM17 puede cortar los precursores de AR, EREG, TGF- α , y HB-EGF, mientras que ADAM10 es la proteasa clave para el corte de EGF y BTC, y puede también cortar el precursor de HB-HGF (**Berasain et al., 2009**). Los ligandos solubles pueden unirse a sus receptores de manera autocrina o paracrina, y los precursores anclados a la membrana pueden señalar de forma yuxtacrina a las células adyacentes (**Hynes & MacDonald, 2009; Schneider & Wolf, 2009; Berasain & Ávila, 2014**).

4.2 Vía de señalización del EGFR

La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional del ectodominio que permite la homodimerización o heterodimerización de los receptores, lo que da lugar a la autofosforilación o transfosforilación a través de la actividad tirosina quinasa intrínseca en varios residuos específicos de tirosina en los dominios C-terminales. Estos residuos sirven como sitios de acoplamiento específicos para diversas proteínas citoplasmáticas adaptadoras, que contienen dominios de homología SRC tipo 2 (SH2) y dominios de unión a fosfotirosina (PTB), así como para proteínas efectoras. Estas proteínas participan en la activación y regulación de numerosas vías de señalización intracelular (**Figura 7**) (**Jorissen et al., 2003; Scaltriti & Baselga, 2006; Morandell et al., 2008; Wee & Wang, 2017**):

- **Vía de la Ras/Raf/proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).** Esta ruta regula la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación o la movilidad, entre otros procesos. El complejo formado por las proteínas Grb2 y Sos se une directamente, o a través de la asociación con la molécula adaptadora Shc, a sitios fosforilados que actúan como sitios de acoplamiento específicos en el receptor. Esta interacción da lugar a una modificación conformacional de Sos, que ahora es capaz de reclutar Ras-GDP, lo que resulta en su activación (Ras-GTP). Ras-GTP activa Raf1 que, a través de las proteínas MAP quinasa quinasa 1 y 2 (MEK1/2), fosforila las ERK1/2-MAPK. Otras MAPKs activadas en la señalización del EGFR son las MAPK de estrés: JNK MAPKs, que están activadas por las proteínas MEK4/7, y p38 MAPKs, activadas por las proteínas MEK3/4/6 (**Cuenda & Rousseau, 2007; Raman et al., 2007; Weston & Davis, 2007**). Las

MAPKs activadas se traslocan al núcleo donde fosforilan factores de transcripción específicos involucrados en diferentes procesos celulares.

- **Vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt.** Esta ruta está involucrada en la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis, la invasión y la migración. PI3K es una enzima dimérica compuesta por una subunidad reguladora p85, responsable del anclaje a los sitios de acoplamiento específicos en los receptores EGFR/ErbB, y una subunidad catalítica p110 que genera el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual es responsable del reclutamiento a la membrana plasmática y activación de la quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositol (PDK1) y de la serina/treonina quinasa Akt. El reclutamiento de PI3K difiere entre diferentes miembros de la familia EGFR/ErbB, ya que PI3K se une directamente a los receptores ErbB3 y ErbB4 a través de su dominio SH2, sin embargo, en el caso de EGFR y ErbB2 se une de forma indirecta a través de la proteína adaptadora GAB1 (**Scaltriti & Baselga, 2006; Wee & Wang, 2017**).

- **Vía de la Fosfolipasa C y (PLC γ).** La PLC γ interactúa directamente con el EGFR activado e hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para dar lugar a inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), que controla la liberación de calcio intracelular; y 1,2-diacilglicerol (DAG). Tanto la liberación de calcio como el DAG confluyen en la activación de la proteína quinasa C (PKC) (**Scaltriti & Baselga, 2006**).

- **Vía del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT).** Las proteínas STAT son una familia de factores de transcripción localizados en el citoplasma como monómeros inactivos. Las proteínas STAT interactúan directamente con los residuos de fosfotirosina del EGFR a través de sus dominios SH2, y tras la dimerización, se traslocan al núcleo donde dirigen la expresión de genes diana específicos (**Jorissen et al., 2003; Scaltriti & Baselga, 2006**).

- **Vía de la quinasa SRC.** SRC es una proteína no receptora con actividad tirosina quinasa que juega un papel crítico en la regulación de la proliferación celular, la migración, la adhesión, la angiogénesis y la función inmunológica. SRC se encuentra en el citosol y activa distintos sustratos, incluyendo la quinasa de adhesión focal (FAK), PI3K y las proteínas STAT. Aunque la actividad tirosina quinasa de SRC funciona de manera independiente a la señalización de los RTKs, también puede cooperar con la señalización de dichos receptores, como es el caso del EGFR o ErbB4, ya que ambos presentan sitios de unión para SRC, aunque no está claro cómo se produce su activación. Por otro lado, la regulación de SRC y EGFR es recíproca, ya que SRC puede fosforilar directamente al EGFR. Así, SRC actuaría como un potenciador de la activación de EGFR y las vías disparadas por él (**Scaltriti & Baselga, 2006; Wee & Wang, 2017**).

Otras proteínas de unión al receptor están involucradas en la regulación de su señalización a través de diferentes mecanismos: regulando la endocitosis, como la proteína Eps15; incidiendo sobre la degradación, la cual está iniciada por la unión en el dominio C-terminal de la ubiquitina ligasa Cbl; o controlando la desfosforilación, como las fosfatasas Shp1 y Shp2 (**Morandell et al., 2008; Wee & Wang, 2017**).

Existen también cada vez más evidencias de que la familia de receptores EGFR/ErbB tienen la capacidad de traslocarse al núcleo donde pueden ejercer una variedad de acciones biológicas. Para el EGFR se ha descrito que puede funcionar como un factor de transcripción del gen de la ciclina D1 o como cofactor de los factores de transcripción STAT3 y E2F1 (**Lin et al., 2001; Lo et al., 2005; Hanada et al., 2006**).

Finalmente, también es importante mencionar que se han identificado funciones independientes de la actividad quinasa del EGFR, revelando un papel de este receptor en la regulación de procesos como la autofagia y el metabolismo. Por un lado, a nivel de la membrana plasmática y de forma independiente a la actividad quinasa, el EGFR interactúa con el transportador SGLT1, el antiportador x-c, la sintasa de ácidos grasos y el complejo mTORC2 para mantener la captación activa de glucosa, la importación de cistina, la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la supresión de Akt, respectivamente. Por otro lado, en los endosomas tardíos y los lisosomas el EGFR interactúa con LAMP4B de forma independiente a la actividad quinasa, y promueve la autofagia pro-supervivencia por falta de nutrientes. Finalmente, a nivel de la mitocondria, el EGFR inhibe la mitofagia mediante la represión de la activación intracelular de Akt, y, además, interactúa con PUMA para inhibir la apoptosis. Generalmente estas funciones no canónicas del EGFR son inducidas por vías de estrés celular que se activan en las células cancerosas para proporcionarles una ventaja de supervivencia y resistencia a la terapia (**Tan et al., 2016; Thomas & Weihua, 2019**).

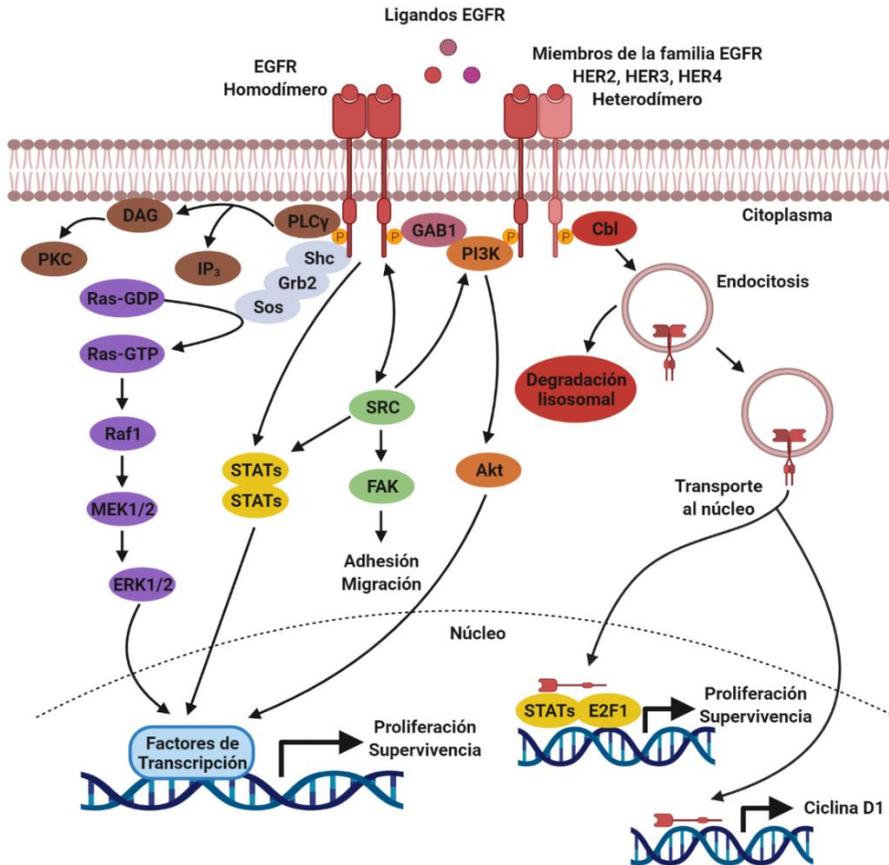


Figura 7. Vía de señalización del EGFR. La unión del ligando al receptor de la familia EGFR/ErbB conduce a su homodimerización o heterodimerización, la fosforilación de residuos específicos de tirosina y el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras y efectoras en la porción intracelular de los receptores, tal y como se ha mencionado en el texto. Estas proteínas se traslocan al núcleo donde fosforilan factores de transcripción específicos que regulan la expresión de genes diana relacionados con procesos de proliferación celular, apoptosis/supervivencia, adhesión/migración o diferenciación. Los receptores activados sufren un proceso de endocitosis y siguen dos posibles rutas: la degradación lisosomal o la traslocación nuclear, donde pueden actuar como cofactores o como factores de transcripción que dan lugar a la activación de genes relacionados con los procesos celulares previamente mencionados. Adaptado de **Scaltriti & Baselga, 2006**.

4.3 Interacción cruzada (crosstalk) de los receptores de la familia EGFR/ErbB

Además de la activación mediante mecanismos dependientes de ligando, explicada anteriormente, el EGFR puede activarse mediante mecanismos alternativos.

El EGFR puede interactuar con otras moléculas para activarse, proceso conocido como “crosstalk o interacción cruzada”, el cual implica mecanismos muy diferentes que incluyen las interacciones físicas, así como las activaciones dependientes e independientes de ligando. En este sentido, hay evidencias que sugieren que el sistema EGFR actúa como un centro de señalización donde convergen diferentes señales extracelulares de crecimiento y supervivencia (**Berasain et al., 2009**). En consecuencia, la activación del EGFR por parte de ligandos heterólogos como resultado de la activación primaria de otro receptor se denomina transactivación. Además, también se ha descrito la transactivación del EGFR independiente de ligando (**Berasain et al., 2011**).

La interacción cruzada más simple y obvia del EGFR implica su heterodimerización con otros miembros de la familia, de una manera dependiente de ligando (**Figura 8A**). Este proceso representa una forma no sólo de amplificar sino también de diversificar las señales. Se ha descubierto que los heterodímeros desencadenan señales más fuertes que los homodímeros debido a que, una vez endocitados, los homodímeros tienen como destino la degradación intracelular, sin embargo, en el caso de los heterodímeros lo que ocurre es un reciclaje de los receptores a la membrana celular. Además, dado que el patrón de tirosinas fosforiladas y las moléculas adaptadoras que se reclutan dependen de cada receptor, la selección de las diferentes parejas de dimerización influirá en el resultado final. Es importante destacar que los heterodímeros adquieren propiedades de señalización únicas que no reflejan simplemente la suma de las señales activadas por cada uno de los receptores individuales (**Berasain et al., 2011**).

También se ha demostrado la interacción física o la heterodimerización del EGFR con otros RTKs, como el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (**Saito et al., 2001**), el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R) (**Morgillo et al., 2006**) y c-MET (**Jo et al., 2000**), y con múltiples receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (**Liebmann & Böhmer, 2000**), así como con integrinas (**Wang et al., 2008**) (**Figura 8A**). Además, también se ha observado que el EGFR contribuye a la señalización del receptor tipo Toll 3 (TLR3) gracias a su capacidad de fosforilar, en cooperación con la proteína quinasa SRC, residuos específicos de tirosina necesarios en dicho receptor para la unión de proteínas adaptadoras (**Yamashita et al., 2012**).

Por otro lado, diferentes receptores pueden inducir la transactivación del EGFR de manera independiente de ligando, sin que haya un contacto físico directo entre ellos. De este modo, la unión de ligandos a GPCRs, receptores de citoquinas, receptores nucleares (PPAR α/γ) y receptores de muerte (CD95), a través de la elevación de los niveles intracelulares de calcio, y la activación de quinasas citoplasmáticas como SRC, Janus quinasa 2 (Jak) y quinasa Yes, median

la transactivación del EGFR fosforilando residuos de tirosina específicos de su dominio C-terminal, lo cual proporciona sitios de acoplamiento para proteínas de señalización intracelular. De esta manera, en realidad el EGFR estaría actuando en estas vías de señalización como una proteína adaptadora (**Berasain et al., 2011**) (**Figura 8B**).

Por último, la transactivación del EGFR dependiente de ligando involucra la actividad de las metaloproteasas de la familia ADAM, como se ha explicado anteriormente. Esta transactivación puede ser activada por la unión de los ligandos a GPCRs, receptores de citoquinas, integrinas y otros RTKs, que a través de la elevación de los niveles intracelulares de calcio y ROS, y la activación de quinasas como PKC, ERKs o SRC, median la activación de las proteínas ADAM (**Berasain et al., 2011**) (**Figura 8C**). Una vez activadas las metaloproteasas de la familia ADAM, a través del corte proteolítico del dominio extracelular, median la liberación de las formas solubles y activas de los ligandos del EGFR que activan el receptor. Además, también se ha visto que los ácidos biliares transactivan el EGFR (**Werneburg et al., 2003**).

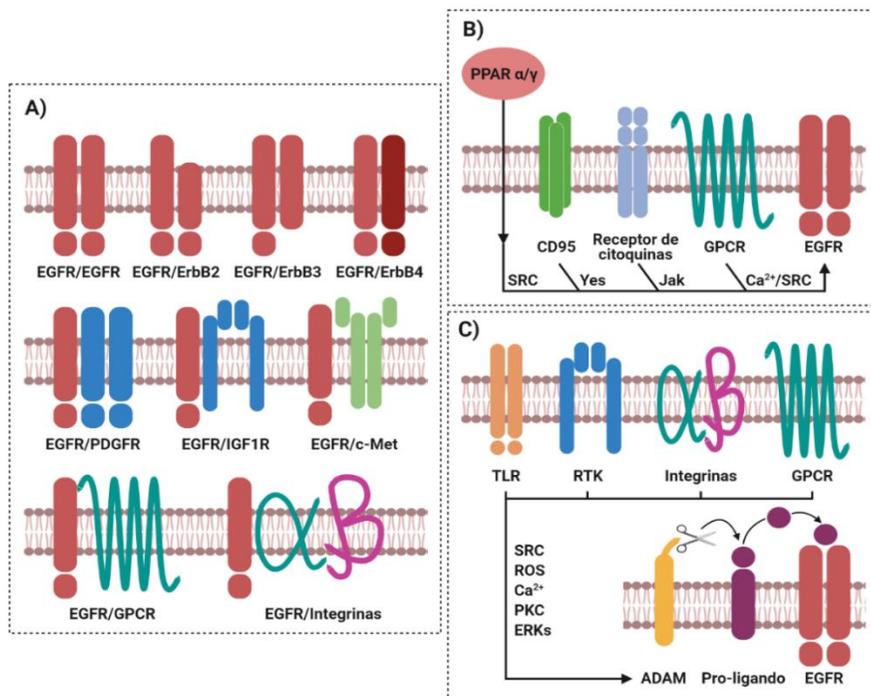


Figura 8. Interacción cruzada del EGFR. **A)** Interacción física o heterodimerización del EGFR con otros receptores de membrana. El EGFR es capaz de unirse a otros receptores incluyendo otros miembros de la familia EGFR/ErbB, RTKs, GPCRs e integrinas. **B)** Transactivación del EGFR de manera independiente de ligando. **C)** Transactivación del EGFR de manera dependiente de ligando. La unión de ligandos a los TLRs, RTKs, integrinas y GPCRs activan las metaloproteasas ADAM, dando lugar a la liberación de los ligandos solubles del EGFR que activan el receptor. Adaptado de **Berasain et al., 2011**.

4.4 Regulación de la señalización del EGFR

4.4.1 Endocitosis del receptor inducida por ligando

Uno de los mecanismos de regulación de los receptores de la familia EGFR/ErbB es la endocitosis del receptor, que puede ocurrir por diferentes vías, clasificadas generalmente como endocitosis mediada por clatrina (CME) y endocitosis mediada por mecanismos independientes de clatrina. En el caso de la CME, proceso que se da en todos los tipos celulares y en todas las concentraciones fisiológicas de ligandos, el receptor es eliminado de la superficie celular utilizando vesículas recubiertas de clatrina. Por su parte, los mecanismos de endocitosis independientes de clatrina se activan generalmente a dosis de ligando más altas, pero que siguen siendo fisiológicamente relevantes, y en estos casos el receptor es eliminado de la superficie celular utilizando caveolas. La elección de estas diferentes vías depende del contexto celular, la naturaleza de la homodimerización o heterodimerización del receptor, la concentración de ligando y la presencia de señales endocíticas específicas en la cola intracitoplasmática (**Sigismund et al., 2008; Caldieri et al., 2018**).

Tras la activación del receptor, los residuos de tirosina fosforilados en los dominios C-terminales proporcionan sitios de acoplamiento para moléculas de señalización y proteínas adaptadoras como Grb2, que une el receptor fosforilado con la E3 ubiquitina ligasa Cbl y la maquinaria endocítica, de manera que se ubiquitinan residuos de lisina en el dominio quinasa del EGFR. No obstante, la E3 ubiquitina ligasa Cbl también es capaz de unirse directamente al receptor. Los receptores activados son rápidamente internalizados de la membrana plasmática, ya sea a través de CME o a través de mecanismos de endocitosis independientes de clatrina, y se dirigen a los endosomas tempranos, donde son clasificados hacia diferentes destinos. Por un lado, pueden ser dirigidos hacia las vesículas de reciclaje, a través de las cuales pueden viajar de vuelta a la superficie celular, y por otro lado, pueden ser dirigidos hacia los endosomas tardíos o multivesiculares, lo cual resulta en la terminación de la señalización y su degradación lisosomal (**Le Roy & Wrana, 2005; Huang et al., 2006b; Tomas et al., 2014; Caldieri et al., 2018**).

Uno de los aspectos que puede influir en el tráfico de los receptores es la interacción ligando-receptor. Así, se ha observado que los receptores unidos a TGF- α , EPG, EREG y AR se reciclan preferentemente de vuelta a la membrana plasmática con poca, o ninguna, degradación. Sin embargo, los ligandos EGF, BTC y HB-EGF inducen eficientemente la ubiquitinación del EGFR y su degradación lisosomal. Por otro lado, la naturaleza de los homodímeros o heterodímeros formados tras la unión del ligando también puede influir en el

tráfico de receptores. Por ejemplo, en comparación con los homodímeros de EGFR, los heterodímeros reclutan ineficientemente la E3 ubiquitina ligasa Cbl y la maquinaria endocítica. Además, los heterodímeros presentan una afinidad de unión de ligando menor que los homodímeros, lo cual provoca la disociación de los ligandos en los endosomas. Por tanto, estas propiedades hacen que los heterodímeros tiendan a ser reciclados de forma más eficiente, mientras que los homodímeros tienden a ser degradados (Caldieri et al., 2018).

También es importante mencionar que, aunque clásicamente la vía endocítica tiene una función crucial en la regulación negativa del EGFR, muchos estudios han ilustrado cómo la endocitosis puede regular positivamente la señalización de los receptores (Sorkin & von Zastrow, 2009). La mayoría de la señalización del EGFR ocurre en la membrana plasmática. Sin embargo, tras la estimulación, las señales mediadas por el EGFR pueden continuar a través de los endosomas. Un ejemplo es la activación completa de las ERK1/2-MAPK, que se promueve en los endosomas tardíos (Teis et al., 2002).

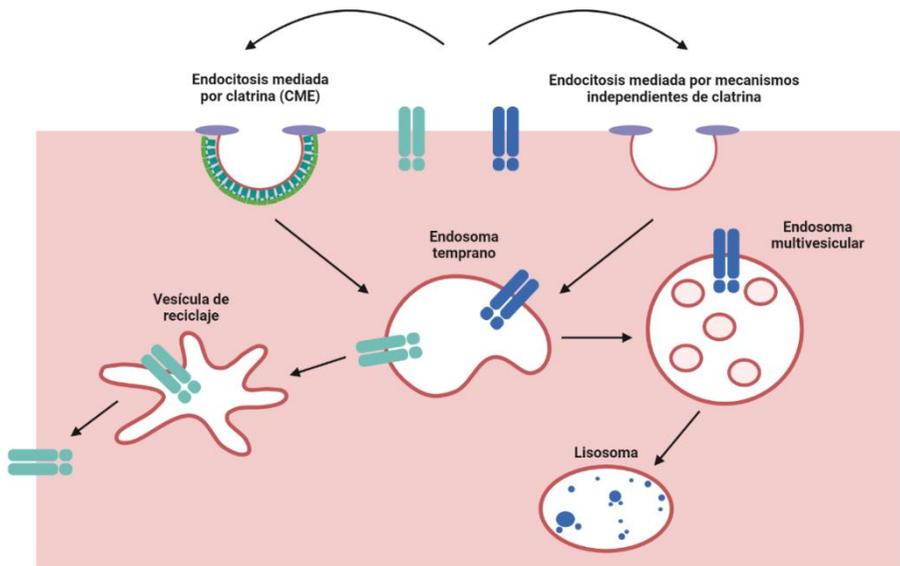


Figura 9. Endocitosis y tráfico del EGFR inducido por ligando. Los receptores EGFR de superficie celular activados por ligandos como TGF- α , EPG, EREG y AR (color azul claro) o por EGF, BTC y HB-EGF (color azul oscuro) son internalizados a través de endocitosis mediada por clatrina (CME) o a través de mecanismos de endocitosis independientes de clatrina. Una vez internalizados, se dirigen a los endosomas tempranos, donde son clasificados hacia las vesículas de reciclaje, a través de las cuales pueden viajar de vuelta a la superficie celular, o hacia los endosomas multivesiculares, lo cual resulta en la terminación de la señalización y su degradación lisosomal. Adaptado de Tomas et al., 2014.

4.4.2 Regulación por retroalimentación positiva

La activación autocrina dependiente del EGFR representa un mecanismo de retroalimentación positiva. Por un lado, la activación de las proteínas Shc y SRC mediada por el EGFR promueve la capacidad de las metaloproteasas de la familia ADAM para liberar el ligando HB-EGF anclado a la membrana celular, impulsándose la señalización autocrina del EGFR, mecanismo que actúa en diferentes tipos de cáncer (**Hynes & Schlang, 2006**). De forma similar, la activación de la vía Ras/Raf/MAPK mediada por el EGFR induce a nivel transcripcional la expresión de ligandos de la familia de receptores EGFR/ErbB, proporcionando otro mecanismo clave de retroalimentación positiva (**Schulze et al., 2004; Shilo, 2005**). Estos bucles autocrinos a menudo convierten un estímulo transitorio en una señal sostenida. Por tanto, la estimulación autocrina constituye un componente regulador fundamental en la vía de señalización de la familia EGFR/ErbB (**Avraham & Yarden, 2011**).

4.4.3 Regulación por moduladores negativos

El estado de fosforilación y la señalización de los RTKs, entre ellos la familia EGFR/ErbB, están determinados por un equilibrio entre la actividad quinasa intrínseca del receptor y las actividades de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP). Por tanto, estas PTPs son uno de los moduladores negativos más importantes de la familia EGFR/ErbB (**Neben et al., 2019**). Se han descrito PTPs actuando a diferentes niveles: PTPs que promueven la desfosforilación del EGFR activado tras la unión mediante los dominios SH2, como las PTPs Shp1 y Shp2 mencionadas anteriormente (**Lemmon et al., 2016**); PTPs que son capaces de desfosforilar al EGFR una vez endocitado, como la PTP1B (**Caldieri et al., 2018**); o PTPs que funcionan por debajo del receptor regulando la señalización intracelular, como es el caso de PTEN y las fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) (**Carracedo et al., 2008; Katz et al., 2011**).

También existe una regulación negativa del EGFR que funciona a partir de la expresión *de novo* de otros moduladores negativos del EGFR, los cuales son codificados por genes cuya transcripción es activada por la señalización del EGFR. Entre estos moduladores se incluyen los adaptadores citosólicos SOCS4 y SOCS5 (**Kario et al., 2005; Nicholson et al., 2005**) y la proteína transmembrana LRIG1 (**Gur et al., 2004; Laederich et al., 2004**), los cuales aumentan la ubiquitinación y degradación del EGFR; y la proteína RALT, que se une al dominio con actividad tirosina quinasa del EGFR e inhibe su activación alostérica (**Anastasi et al., 2007; Zhang et al., 2007b**). Estos moduladores también se unen e inhiben a otros miembros de la familia EGFR/ErbB, por lo que deben ser considerados como reguladores negativos de toda la red de señalización ErbB (**Segatto et al., 2011; Caldieri et al., 2018; Neben et al., 2019**).

4.4.4 Otros mecanismos de regulación

Aparte de los mecanismos de regulación mencionados, cabe destacar que existe una regulación a nivel de la biosíntesis y maduración de los receptores, así como una regulación a nivel de los miRNAs, los cuales controlan los niveles de las moléculas de señalización intracelular mediante la represión postranscripcional (**Lemmon et al., 2016; Neben et al., 2019**).

4.5 Vía de señalización del EGFR en el hígado

Como ya se ha mencionado anteriormente, el EGFR se expresa en casi todos los tipos celulares, excepto en las células hematopoyéticas, por lo que tiene un papel crítico en el desarrollo normal y la fisiología de los vertebrados. Los ratones que carecen de EGFR mueren entre la mitad de la gestación y el día 20 postnatal (P20), dependiendo de sus antecedentes genéticos, y muestran defectos en la placenta, el cerebro, el hueso, la piel, el pulmón y el tracto gastrointestinal (**Threadgill et al., 1995; Sibilia & Wagner, 1995; Miettinen et al., 1995; Sibilia et al., 2003; Wagner et al., 2006; Qin & Beier, 2019**). El EGFR también juega un papel en el desarrollo de los folículos pilosos, el ciclo del cabello o el desarrollo de los conductos mamarios en la adolescencia, entre otros (**Wee & Wang, 2017**).

A nivel hepático, el EGFR está expresado en todos los tipos celulares del hígado adulto y se sabe que juega un papel clave durante la regeneración hepática (**Carver et al., 2002; Hattoum et al., 2013; Michalopoulos & Bhushan, 2021**). Concretamente, fue en 1981 cuando Earp y O'Keefe relacionaron por primera vez el EGFR con procesos de regeneración hepática, describiendo que tras una PH en rata el EGFR se fosforila y sus niveles disminuyen, debido posiblemente a la unión de su ligando y posterior endocitosis (**Earp & O'Keefe, 1981**). Respecto al resto de receptores de la familia EGFR/ErbB cabe destacar que ErbB3 se expresa en hepatocitos de los hígados adultos, ErbB2 se expresa únicamente en hepatocitos fetales y ErbB4 no se expresa en el hígado (**Carver et al., 2002; Michalopoulos & Bhushan, 2021**).

De los ligandos del EGFR, los estudiados en hígado y en el contexto de regeneración hepática incluyen principalmente el EGF, TGF- α , AR y HB-EGF. El EGF se produce en las secreciones de las glándulas exocrinas, incluyendo las glándulas salivales y las glándulas de Brunner del duodeno, estando así constantemente disponible para el hígado a través de la circulación portal. Por tanto, los hepatocitos están continuamente expuestos al EGF y el EGFR se encuentra activado en el hígado normal. Por su parte, el TGF- α se expresa mínimamente en el hígado normal y es producido rápidamente por los hepatocitos durante la regeneración hepática. La AR, al igual que el TGF- α , se

expresa mínimamente en el hígado normal y es producida por los hepatocitos y las células estrelladas hepáticas durante la regeneración hepática. Finalmente, el HB-EGF se expresa en bajos niveles en las células endoteliales y las células de Kupffer en el hígado normal, pero rápidamente se induce durante la regeneración hepática tras PH (Kiso et al., 1995; Berasain et al., 2005; Michalopoulos, 2007; Michalopoulos, 2013; McKee et al., 2015; Michalopoulos & Bhushan, 2021). De estos ligandos, tanto el EGF como TGF- α son reconocidos reguladores clave de la proliferación de hepatocitos. La infusión de uno de estos dos ligandos *in vivo* en el hígado normal intacto de ratas y ratones induce la proliferación de hepatocitos y el agrandamiento del hígado (Bucher et al., 1977; Liu et al., 1994).

Así, existen niveles elevados de EGFR y sus ligandos en los hepatocitos durante el daño hepático y la regeneración (Berasain & Ávila, 2014). Es importante mencionar que, aunque existe un alto nivel de redundancia entre los receptores y los ligandos de la familia EGFR/ErbB, en el contexto hepático, la redundancia de este sistema no es completa. En este sentido, se ha visto que ratones deficientes en TGF- α se desarrollan normalmente y no tienen impedida la regeneración hepática probablemente porque otros ligandos de la familia pueden compensar su ausencia (Russell et al., 1996). Sin embargo, ratones en los que se han eliminado las glándulas salivales, uno de los principales lugares de producción del EGF, muestran una regeneración hepática impedida tras una PH (Collin de l'Hortet et al., 2012). Por otro lado, ratones deficientes en AR o HB-EGF también muestran una regeneración deficiente tras una PH, debido a un retraso en el inicio de la replicación del DNA (Berasain et al., 2005; Mitchell et al., 2005), y muestran un daño hepático colestásico agravado tras BDL o tras la administración de alfa-naftil-isotiocianato (ANIT) (Santamaría et al., 2019). Por el contrario, ratones que sobreexpresan HB-EGF parecen tener una respuesta de crecimiento celular acelerada tras una PH (Kiso et al., 2003).

Con el fin de estudiar el papel de EGFR en el hígado sorteando el problema de la muerte temprana de los ratones EGFR^{-/-}, se generó un modelo murino condicional de deficiencia de EGFR de manera específica en hígado (Natarajan et al., 2007). Aunque la delección del EGFR en el hígado adulto no afectó a la función hepática, los ratones presentaban una mayor mortalidad y daño hepático tras PH. La regeneración hepática estaba retrasada debido a una proliferación disminuida de los hepatocitos y no a un aumento de la apoptosis. Por otro lado, también se ha visto que la inhibición de la expresión del EGFR mediante la utilización de técnicas de silenciamiento basadas en shRNA tiene un efecto supresor en la regeneración hepática en rata tras una PH (Paranjpe et al., 2010). Recientemente, usando un nuevo modelo de ratón mutante que expresa en hepatocitos una forma truncada del receptor humano EGFR, el cual carece de actividad tirosina quinasa y actúa como dominante negativo, nuestro grupo

en colaboración con otros grupos ha demostrado que la atenuación de su señalización provoca un retraso en la regeneración tras una PH, con una menor activación de señales proliferativas y un predominio de los mecanismos citostáticos dependientes del TGF- β (López-Luque et al., 2016). En este modelo solo se ha observado un retraso en la regeneración hepática sin comprometer la recuperación de la masa hepática debido a la activación de otras vías de señalización proliferativas compensatorias, concretamente la vía de HGF/c-MET.

Ya se ha mencionado que el papel del EGFR durante la regeneración hepática se debe fundamentalmente a su efecto proliferativo sobre los hepatocitos. Evidencias adicionales provienen de estudios *in vitro* que muestran que cuando se añaden exógenamente ligandos del EGFR, éstos estimulan el crecimiento de los hepatocitos primarios en todas las etapas del desarrollo: fetal, neonatal y adulto (Draghi et al., 1980; McGowan et al., 1981; Sawada et al., 1988; de Juan et al., 1992a; Sánchez & Fabregat, 2010). Los ligandos del EGFR, junto con el HGF, constituyen los únicos mitógenos completos para hepatocitos en medio libre de suero y son los factores de crecimiento más importantes implicados en la respuesta proliferativa durante la regeneración hepática (Michalopoulos, 2007). Cabe destacar que además de sus efectos conocidos en hepatocitos, el EGFR también juega un papel crucial en los colangiocitos, ya que promueve su proliferación, juega un papel en la morfogénesis de los conductos biliares y en la especificación a linaje biliar. Por otro lado, también participa en la transdiferenciación de los hepatocitos a colangiocitos durante la regeneración hepática para restablecer la integridad del epitelio biliar (Pellat et al., 2018).

Además de la función reguladora de la proliferación, el EGFR es una importante vía de supervivencia en el hígado (Fabregat, 2009). La activación de la ruta de PI3K por el EGFR inhibe la apoptosis inducida por TGF- β en hepatocitos fetales de rata, efecto asociado a su capacidad de inhibir la activación de NOX4 y la producción de ROS inducidos por el TGF- β (Fabregat et al., 2000; Carmona-Cuenca et al., 2006). Adicionalmente, la activación del EGFR mediada por el EGF también puede inhibir la respuesta apoptótica inducida por la estimulación del receptor de muerte Fas en cultivos primarios de hepatocitos de ratón (Musallam et al., 2001). Asimismo, la sobreexpresión de TGF- α protege frente a la apoptosis hepática mediada por el receptor de muerte Fas *in vivo* (Kanda et al., 2002).

Cabe destacar también que los ligandos del EGFR parecen ser moduladores importantes de la diferenciación de los hepatocitos. Estudios morfológicos y de expresión génica de nuestro laboratorio y colaboradores han demostrado que el EGF, actuando en cooperación con otras citoquinas y hormonas, mantiene el estado de diferenciación de hepatocitos primarios

fetales y neonatales *in vitro* (Pagan et al., 1999; de Juan et al., 1992b; Sánchez et al., 1998; Sánchez & Fabregat, 2010).

Por tanto, queda demostrado que el sistema de señalización del EGFR juega un papel central en la respuesta regenerativa del hígado.

4.6 Vía de señalización del EGFR en las HPC/células ovals

Diferentes estudios sugieren que la señalización del EGFR también es importante en la regeneración hepática mediada por las HPC/células ovals. Las HPC/células ovals expresan el EGFR, aunque la expresión de los otros receptores miembros de la familia no ha sido estudiada todavía, y además también expresan algunos de sus ligandos de forma constitutiva, como TGF- α y HB-EGF (Martínez-Palacián et al., 2012). Tanto el EGFR como el ligando TGF- α se encuentran sobreexpresados durante el periodo de proliferación activa y diferenciación de las HPC/células ovals en el hígado de rata tras el protocolo 2-AAF/PH y parecen ser los responsables de la proliferación temprana del compartimento de células progenitoras. Además, la infusión *in vivo* con HGF o EGF disminuye la apoptosis, sugiriendo que esta vía también estaría implicada en fenómenos de supervivencia de las células progenitoras (Evarts et al., 1993; Hu et al., 1996; Nagy et al., 1996). En consonancia con estas observaciones *in vivo*, nuestro laboratorio y otros han proporcionado evidencias de que el EGF y el TGF- α son mitógenos para las HPC/células ovals de rata y ratón *in vitro* (Isfort et al., 1998; Cheung et al., 2007; del Castillo et al., 2008). Además, también tenemos evidencias del papel de la vía de señalización del EGFR en la regulación de la supervivencia de las HPC/células ovals *in vitro*. En este sentido, la inhibición del EGFR mediante el tratamiento con un inhibidor sintético aumenta la apoptosis basal (en ausencia de suero y de estímulos exógenos) y amplifica la apoptosis inducida por el TGF- β , resultados que demuestran una activación autocrina de la vía del EGFR en estas células capaz de promover tanto la supervivencia como la proliferación (Martínez-Palacián et al., 2012).

Por otro lado, se ha documentado un papel del EGFR en los procesos de diferenciación de las HPC/células ovals. El grupo del Dr. Thorgeirsson ha demostrado que el EGFR induce selectivamente NOTCH1 para promover la diferenciación de las HPC/células ovals hacia colangiocitos y la morfogénesis ductular. Para complementar estos resultados *in vitro*, se realizaron experimentos *in vivo* usando ratones knockout condicionales para EGFR (EGFR^{flx/flx};Mx1-Cre^{+/-}) sometidos a daño hepático por tratamiento con la dieta DDC que mostraron que la pérdida del EGFR en el hígado facilita el proceso de regeneración hepática tras el daño inducido con la dieta DDC por promover la diferenciación de las HPC/células ovals hacia hepatocitos en vez de hacia

colangiocitos. De esta forma, se otorga un papel esencial al EGFR en los procesos de compromiso de linaje y diferenciación de las células progenitoras (Kitade et al., 2013). Por otro lado, el EGF, en combinación con otros factores, es importante para la diferenciación hacia colangiocitos de progenitores hepáticos generados a partir de células madre embrionarias humanas (hESC) o derivados de la línea celular HepaRG (Dianat et al., 2014).

4.7 Vía de señalización del EGFR en fibrosis hepática y HCC

Además de estos efectos beneficiosos de la vía de señalización del EGFR durante los procesos de regeneración hepática, también se ha postulado su intervención en la enfermedad hepática crónica, desarrollo de fibrosis hepática y de HCC en hígados cirróticos (Schiffer et al., 2005; Perugorria et al., 2008; McKee et al., 2015). Como ya se ha explicado en apartados anteriores, el proceso de fibrosis se da cuando la respuesta reparadora y regenerativa del hígado se perpetúa en el tiempo y se cronifica, y el daño y la inflamación persisten. Todo esto da lugar a la pérdida de la función hepática y puede conducir al desarrollo de HCC (Berasain & Ávila, 2014). La vía del EGFR está implicada en este proceso en todas sus etapas con diversas consecuencias.

Respecto a su papel en la hepatocarcinogénesis, se ha observado una sobreexpresión del EGFR en HCC, lo cual está asociado con una elevada capacidad proliferativa, metástasis intrahepática y mal pronóstico (Ito et al., 2001; Buckley et al., 2008). Asimismo, la inhibición del EGFR aumenta la apoptosis inducida por TGF- β en células de hepatoma de rata a través de la amplificación del estrés oxidativo, causante de la muerte celular (Sancho et al., 2009). Por ello, la inhibición del EGFR podría ser una diana terapéutica útil en los tumores con un fenotipo epitelial que no muestran alteraciones en la vía de señalización del TGF- β ni sobreactivación de las vías de supervivencia por debajo del EGFR (Caja et al., 2011). Al igual que en la regeneración, trabajos previos, en colaboración, de nuestro grupo revelaban un papel crucial para la vía del EGFR en las etapas tempranas de la hepatocarcinogénesis, actuando no solo a nivel de la proliferación celular sino también de la inflamación (López-Luque et al., 2016), por lo que también sería una buena diana en la inhibición de la inflamación crónica para prevenir el desarrollo del HCC. En relación a esto, también se ha observado que el EGFR tiene un papel promotor tumoral en los macrófagos del hígado ya que es requerido para inducir transcripcionalmente IL-6, que desencadena la proliferación compensatoria de los hepatocitos dañados y da lugar al desarrollo de HCC (Lanaya et al., 2014).

En cuanto al papel del EGFR en las CLD y el desarrollo de fibrosis cabe destacar que se han descrito tanto efectos beneficiosos como perjudiciales. Por

un lado, se ha observado que la delección del EGFR en hepatocitos de ratones *Mdr2^{-/-}* (ratones que presentan daño biliar similar al de pacientes con PSC), agrava la fibrosis y el daño hepático (Svinka et al., 2017), lo que sugiere un papel protector para dicha señalización durante el daño colestásico. Además, se ha observado que la inhibición del gen *HB-EGF* en ratones aumenta la susceptibilidad a la fibrosis hepática en respuesta al daño crónico inducido por TAA y, además, la expresión o acción del HB-EGF se asocia con la supresión de las vías fibrogénicas en las células estrelladas hepáticas (Huang et al., 2012). Estos estudios están de acuerdo con los datos obtenidos en modelos de ratones knockout para HB-EGF en los que se observa un incremento de la fibrosis hepática tras BDL, lo cual sugiere un posible papel protector del HB-EGF en la fibrosis hepática colestásica (Takemura et al., 2013). Adicionalmente, también se ha observado que la deficiencia de AR en ratones agrava el daño hepático colestásico inducido por BDL y por la administración de ANIT, consiguiendo una protección frente al daño tras la administración exógena de AR recombinante en estos ratones (Santamaría et al., 2019).

Por el contrario, en ratones carentes de EGFR en hígado, se ha observado una mejor respuesta regenerativa en el modelo de daño inducido por DDC (Kitade et al., 2013). También se ha observado que ratones que carecen de EGFR en los hepatocitos muestran una menor fibrosis hepática inducida por la administración intraperitoneal crónica de CCL₄ (Scheving et al., 2016), y que la inhibición del EGFR mediada por Erlotinib atenúa la activación de las células estrelladas hepáticas y la fibrosis hepática inducida por distintos tratamientos, como inyecciones repetidas de CCL₄ en ratones o inyecciones repetidas de DEN en dosis bajas en ratas, o por BDL en ratas (Fuchs et al., 2014). Adicionalmente, estudios recientes han demostrado que la inhibición del EGFR disminuye la activación de las células estrelladas hepáticas y atenúa la fibrosis en un modelo de NAFLD (Liang et al., 2018; Bhushan et al., 2019), y que anticuerpos neutralizantes del EGF atenúan la fibrosis hepática inducida por BDL en ratón al inhibir la proliferación de los miofibroblastos (Xu et al., 2020).

En base a todo lo anteriormente expuesto, y a los resultados contrapuestos en la literatura sobre el papel de EGFR en el proceso fibrótico que acompaña al daño hepático, se hace patente la importancia de conocer mejor los mecanismos por los que la vía del EGFR regula la función de las células epiteliales hepáticas, especialmente durante los procesos de regeneración y respuesta a diferentes tipos de daño hepático, no solo en hepatocitos sino también en las HPC/células ovals.

5. ANTECEDENTES

1. Papel del EGFR en regeneración hepática

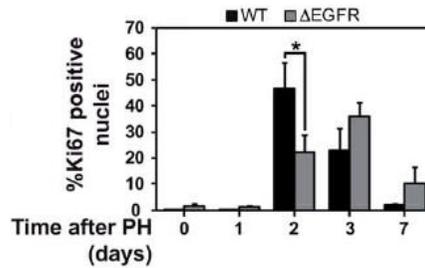
Como ya se ha comentado anteriormente, dentro de los numerosos factores involucrados en el control de la respuesta regenerativa hepática el EGFR juega un papel importante. Trabajos de las Dras. Isabel Fabregat, Aránzazu Sánchez y Blanca Herrera han contribuido a demostrar los efectos reguladores del EGF en hepatocitos en distintos estadios de desarrollo (fetal, neonatal) y contextos fisiopatológicos (regeneración tras PH), evidenciando que no solo estimula la proliferación de los hepatocitos, sino que en cooperación con otros factores de crecimiento y hormonas modula el fenotipo celular y la expresión de genes específicos del linaje hepático promoviendo la diferenciación celular (**de Juan et al., 1992a; de Juan et al., 1992b; Fabregat et al., 1996; Sánchez et al., 1998; Pagan et al., 1999**). Asimismo, han demostrado que la vía de señalización del EGFR inhibe el efecto supresor de la vía del TGF- β en hepatocitos *in vitro* bloqueando la respuesta apoptótica dependiente de estrés oxidativo inducida por TGF- β a través de la activación de la vía PI3K/AKT (**Fabregat et al., 1996; Fabregat et al., 2000; Murillo et al., 2005; Carmona-Cuenca et al., 2006**).

Modelos y abordajes experimentales diferentes han permitido confirmar la relevancia del papel mitogénico de la vía observado *in vitro* en el contexto de la regeneración hepática. Así, la eliminación de la expresión de EGFR en el hígado conduce a una respuesta proliferativa notablemente aminorada y retrasada en respuesta a un daño, aunque finalmente la regeneración tiene lugar, por activación de otras vías compensatorias. En cualquier caso, se evidencia que no hay una redundancia completa entre distintas señales mitogénicas hepáticas, y que el EGFR tendría efectos únicos (**Natarajan et al., 2007; Paranjpe et al., 2010**). Sin embargo, todavía no se comprenden bien muchos aspectos específicos relativos a ésta y otras de las principales actividades biológicas inducidas por esta vía de señalización y su contribución en la regeneración hepática, así como los mecanismos específicos que median dichas actividades.

Para contribuir al estudio de estos aspectos, nuestro grupo de investigación, en colaboración con los grupos dirigidos por el Dr. José Carlos Segovia y la Dra. Isabel Fabregat, generó un nuevo modelo de ratón transgénico que expresa en hepatocitos una forma truncada del receptor humano EGFR (Δ EGFR), carente de actividad tirosina quinasa y que actúa como un mutante dominante negativo (**López-Luque et al., 2016**). Este modelo ofrece una ventaja frente a los modelos previos al permitir estudiar las funciones del EGFR que son dependientes de su actividad catalítica, lo que proporciona información clave para el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a esta vía. Los resultados de los estudios realizados hasta el momento con este modelo han mostrado un papel crítico de la actividad catalítica del EGFR durante las primeras etapas de la

regeneración hepática. Así, después de una PH, los hepatocitos de ratones Δ EGFR mostraron una respuesta proliferativa disminuida y retrasada en el tiempo en comparación con los ratones WT (**Figura 10A**), lo que estaba asociado a una menor activación de vías de señalización mitogénicas, como son las vías de AKT y de ERK (**Figura 10B**).

A)



B)

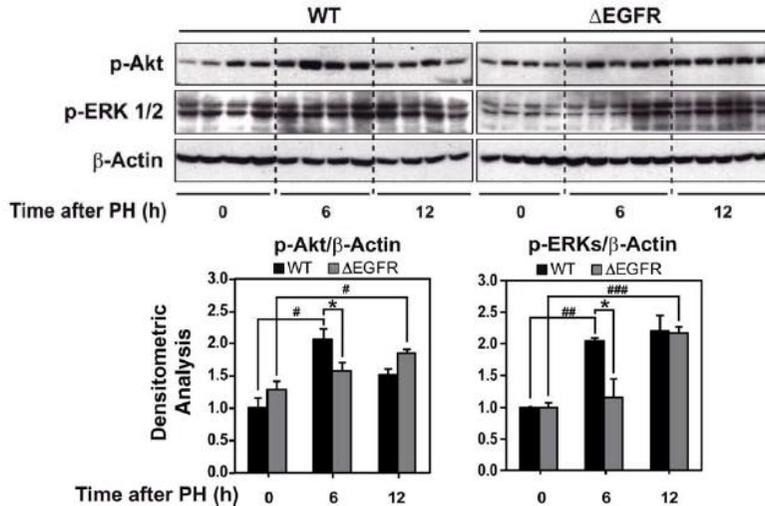


Figura 10. Alteración de la proliferación de los hepatocitos tras PH en los ratones transgénicos Δ EGFR. A) Cuantificación del porcentaje de núcleos positivos para Ki67 en los tejidos hepáticos parafinados de los ratones WT y Δ EGFR a los tiempos indicados tras PH. B) Análisis por western blot de la activación de AKT y ERKs como señales proliferativas tempranas a los tiempos indicados tras PH. Se muestran imágenes representativas (panel superior) y el análisis densitométrico cuantitativo correspondiente (panel inferior). En ambos casos los datos son la media \pm S.E.M de al menos 4 animales por grupo. Se utilizó la prueba T de Student: * = $p < 0.05$ respecto a los animales WT; # = $p < 0.05$, ## = $p < 0.01$, y ### = $p < 0.001$ respecto al tiempo 0 (López-Luque et al., 2016).

Este fenómeno se correlacionó con una fuerte sobreactivación de la vía de señalización de las proteínas SMADs inducida por TGF- β (**Figura 11A**) y una mayor inducción de reguladores negativos del ciclo celular como *p15* y *p21* (**Figura 11B**), lo que es consistente con una amplificación de los efectos



citostáticos que mediarían de forma total o parcial las alteraciones en las fases tempranas de la respuesta proliferativa observadas en los ratones Δ EGFR. No obstante, a pesar de estas profundas alteraciones, los ratones Δ EGFR fueron capaces de recuperar la masa hepática, como ya se había observado en otros modelos previos, mediante la sobreactivación de señales compensatorias, concretamente la vía de HGF/c-MET (**Figura 11C y D**).

Por último, estos estudios revelaron por primera vez un papel crítico para la actividad del EGFR en el proceso de acumulación de grasa que acompaña a la regeneración hepática tras PH y en particular a la inducción de la expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos (**López-Luque et al., 2016**), abriendo nuevas vías de estudios sobre los mecanismos que median las acciones de EGFR en el hígado.

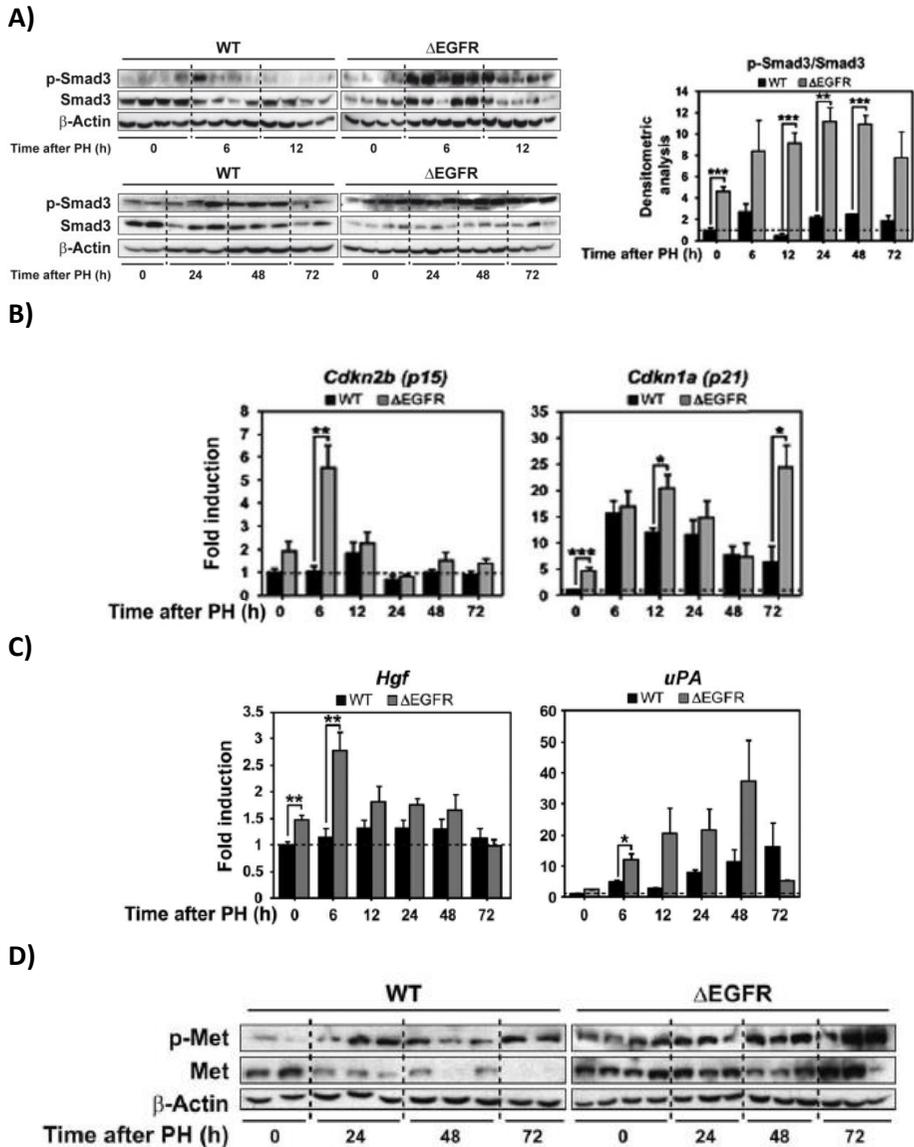


Figura 11. Sobreactivación de las vías del TGF- β y HGF/c-MET en el hígado de los ratones Δ EGFR tras PH. **A)** Análisis mediante western blot de los niveles de fosfo-SMAD3 y SMAD3 total a los tiempos indicados tras PH en ratones WT y Δ EGFR. Se muestran imágenes representativas (panel izquierdo) y el análisis densitométrico cuantitativo correspondiente (panel derecho). **B y C)** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de mRNA de los genes indicados a diferentes tiempos tras PH. **D)** Análisis mediante western blot de los niveles de fosfo-MET y MET TOTAL a los tiempos indicados tras PH en los ratones WT y Δ EGFR. En todos los casos, los datos son la media \pm S.E.M de al menos 3-4 animales por grupo. Se utilizó la prueba T de Student: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ y *** = $p < 0.001$ respecto a los animales WT (López-Luque et al., 2016).

2. Efectos reguladores de los RTKs c-MET y EGFR en las HPC/células ovas

Una de las principales líneas de investigación de nuestro laboratorio en los últimos años está enfocada en descifrar las señales y los mecanismos que regulan la biología y función de las HPC/células ovas, con especial atención a la regulación llevada a cabo por los RTKs c-MET y EGFR y su interacción con otras vías de señalización, en particular con las vías del TGF- β y BMP9, con el fin último de esclarecer qué papel juegan las HPC/células ovas en los procesos de daño hepático crónico, así como los mecanismos que regulan su comportamiento multifacético, lo que nos daría herramientas para modular la respuesta regenerativa con fines terapéuticos en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas.

Usando líneas de HPC/células ovas que expresan un receptor de c-MET funcional ($Met^{flx/flx}$) o no funcional ($Met^{-/-}$), carente de actividad tirosina quinasa, generadas en el laboratorio (del Castillo et al., 2008) a partir de un modelo de ratón knockout condicional para c-MET (Huh et al., 2004) hemos demostrado que el EGF es un mitógeno incluso más potente que el HGF en las HPC/células ovas (del Castillo et al., 2008) (Figura 12).

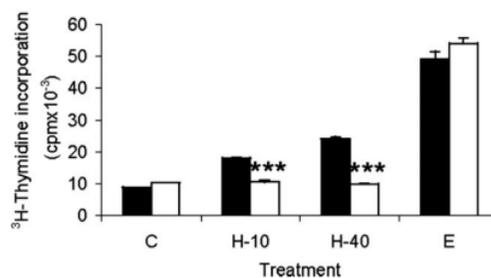


Figura 12. Análisis de la respuesta proliferativa de las HPC/células ovas $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ al HGF y EGF. Ensayo de incorporación de [3 H]Timidina realizado en las HPC/células ovas $Met^{flx/flx}$ y $Met^{-/-}$ tratadas durante 48 horas con diferentes concentraciones de HGF (10 y 40 ng/ml) y EGF (20 ng/ml). Los datos se expresan como cuentas por minuto (cpm) por plato. Los datos son la media \pm S.E.M de 3 experimentos independientes. *** = $p < 0.001$. **Barras negras,** HPC/células ovas $Met^{flx/flx}$. **Barras blancas,** HPC/células ovas $Met^{-/-}$ (del Castillo et al., 2008).

Además, tanto el HGF como el EGF promueven la supervivencia de las HPC/células ovas protegiéndolas frente a la apoptosis inducida por TGF- β (del Castillo et al., 2008; Martínez-Palacián et al., 2012). No se observaron diferencias aparentes en la respuesta a EGF entre células con o sin un receptor c-MET funcional, ni a nivel proliferativo ni de supervivencia (Figura 13A), descartando una interacción entre estas dos vías a este nivel. El efecto antiapoptótico de la vía EGF/EGFR se confirmó mediante el tratamiento con un

inhibidor sintético (AG1478) del EGFR, el cual aumentó la apoptosis tanto basal (en ausencia de suero y de estímulos exógenos) (**Figura 13B**) como inducida por el TGF- β (**Figura 13C**).

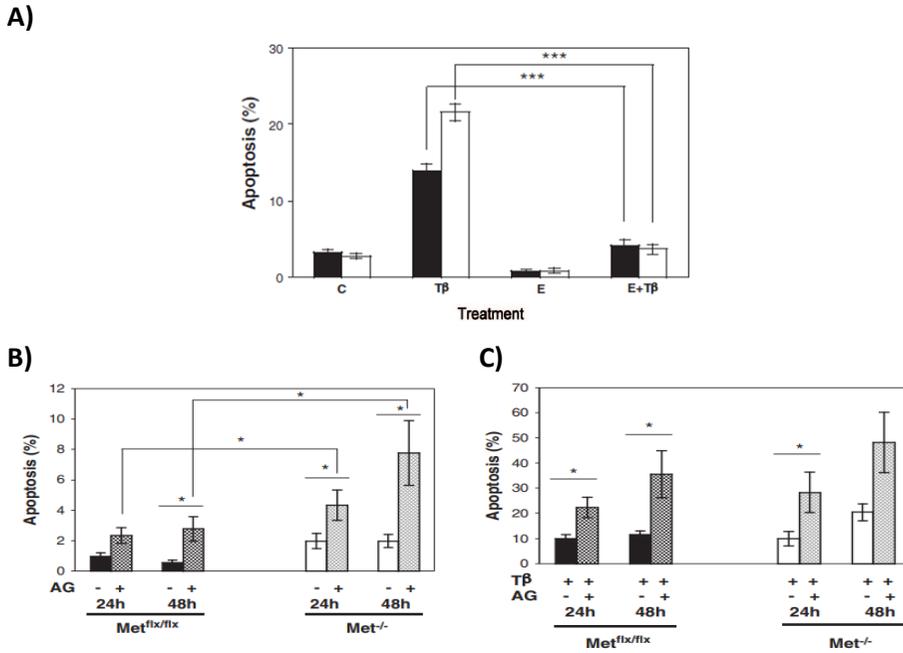


Figura 13. Efecto de la vía EGF/EGFR sobre la apoptosis de las HPC/células ovasles Met^{flx/flx} y Met^{-/-} inducida por TGF- β . **A)** Las células se trataron con TGF- β (T β ; 1 ng/ml) sólo o en combinación con EGF (E; 20 ng/ml) durante 48 horas. La cuantificación de los núcleos apoptóticos se realizó de manera ciega en un total de 1000 a 2000 células por plato tras la tinción con yoduro de propidio utilizando un microscopio de fluorescencia. **Barras negras**, HPC/células ovasles Met^{flx/flx}. **Barras blancas**, HPC/células ovasles Met^{-/-}. Los datos son la media \pm S.E.M de 2 experimentos independientes realizados por triplicado. *** = $p < 0.001$ comparando los grupos indicados. **B y C)** Índice apoptótico en células tratadas (**C**) o no (**B**) con TGF- β (T β ; 1 ng/ml) en presencia o ausencia de 5 μ M AG1478 durante 24 y 48 horas. La cuantificación de los núcleos apoptóticos se realizó de manera ciega (mínimo 1000 núcleos/condición) tras la tinción con yoduro de propidio utilizando un microscopio de fluorescencia. Los datos son la media \pm S.E.M de 6 experimentos independientes. * = $p < 0.05$ comparando los grupos indicados (Martínez-Palacián et al., 2012).

El incremento de apoptosis observado en HPC/células ovasles sin tratamiento con TGF- β y en presencia de AG1478 es consistente con una activación autocrina de la vía del EGFR que promueve supervivencia. Dicha activación fue demostrada por la expresión de ligandos y la presencia de receptor fosforilado en células en ausencia de tratamiento (**Figura 14A y B**). De forma similar, la vía de HGF/c-MET también presenta una activación autocrina en estas células (del Castillo et al., 2008) que promueve su supervivencia.

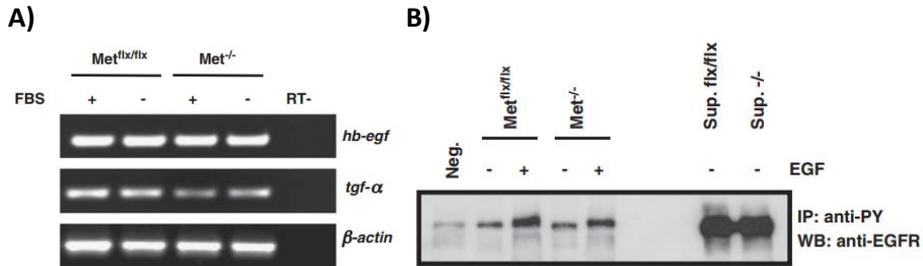


Figura 14. Activación autocrina de la vía del EGFR en las HPC/células ovas Met^{flx/flx} y Met^{-/-}. **A)** La expresión de mRNA de los ligandos del EGFR se analizó mediante RT-PCR en las HPC/células ovas cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de 10% FBS. Se utilizó *β-ACTINA* para la normalización. RT-: sin transcripción reversa. **B)** Las HPC/células ovas se mantuvieron en un medio al 0% FBS durante 12 horas y se trataron con EGF (20 ng/ml) durante 5 minutos. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-fosotirosina y las membranas se incubaron con anticuerpo anti-EGFR. Neg.: control negativo (sin anticuerpo primario). Sup.: control positivo, sobrenadantes recogidos después de la inmunoprecipitación de los lisados. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados (Martínez-Palacián et al., 2012).

Los mecanismos que median el papel protector de la señalización de EGFR en las HPC/células ovas no se han explorado en detalle. No obstante, resultados preliminares no publicados mostraron una disminución en los niveles de mRNA del ligando TGF- α bajo tratamiento con AG1478, lo que indica que la actividad quinasa del EGFR es necesaria para la inducción de la expresión de los ligandos del EGFR, activando así un bucle amplificador pro-supervivencia.

En conjunto, los resultados previos aquí mencionados demuestran la importancia de la actividad catalítica del EGFR en la regulación de la proliferación y supervivencia de las HPC/células ovas, lo que anima a realizar estudios adicionales que nos permitan seguir explorando el papel de esta vía en la regulación de la función de estas células y su importancia en el contexto de la regeneración hepática.

6. OBJETIVOS

La vía del EGFR, de forma independiente o en colaboración con otras vías, juega un papel importante durante la regeneración hepática y en el control del proceso de fibrosis, ejerciendo un efecto regulador sobre diferentes poblaciones de células hepáticas. El **objetivo general** de este trabajo es **estudiar la relevancia de la vía del EGFR en la biología y función de las HPC/células ovals en un contexto de daño hepático crónico**, utilizando como herramientas un modelo de ratón transgénico que expresa en hepatocitos una forma truncada del receptor humano EGFR, carente de actividad tirosina quinasa, y HPC/células ovals carentes de EGFR generadas utilizando diferentes estrategias.

Para lograr este objetivo general, nos planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar *in vivo* el efecto de la ausencia de la actividad tirosina quinasa del EGFR en la respuesta regenerativa del hígado ante el daño colestásico crónico inducido por la dieta DDC, con especial atención en el efecto sobre las HPC/células ovals.

2. Estudiar *in vitro* el papel del EGFR en las HPC/células ovals en el contexto de la enfermedad colestásica, previa puesta a punto de un modelo *in vitro* de daño colestásico por tratamiento con sales biliares.

3. Generar, validar y caracterizar modelos *in vitro* de HPC/células ovals con la vía del EGFR inactivada o silenciada.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Experimentación animal

1.1 Declaración ética

El uso de animales cumplió con la legislación institucional y europea relativa a la vivisección, el uso de organismos modificados genéticamente y el cuidado y bienestar de los animales (Directiva Europea 2010/63/UE aprobada por el Parlamento Europeo y el Consejo de la UE el 22 de Septiembre de 2010). Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), en un ambiente controlado de temperatura, con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, y con acceso a dieta estándar y agua *ad libitum*. Rutinariamente fueron analizados para la detección de patógenos de acuerdo con los procedimientos de la Federación de asociaciones europeas dedicadas a la ciencia del animal de laboratorio (FELASA). Los protocolos y procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional y Regional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid (PROEX 129/16).

1.2 Generación de ratones transgénicos Δ EGFR

Un fragmento de cDNA que codifica para una forma truncada del *EGFR* humano, que carece del dominio quinasa en la región intracitosólica (eliminación de los aminoácidos 654-1186), se clonó en el clon RP23-279P6 de un cromosoma artificial bacteriano de transferencia (BAC) (proporcionado por el Prof. Dr. Günther Schütz, Molekularbiologie der Zelle I, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Alemania), que contenía el locus de la albúmina y el gen de resistencia al cloranfenicol, de forma que el transgén (EGFR truncado) se encontró bajo el control del promotor de la albúmina (**Warming et al., 2005**). Esto permite el control de la expresión del transgén por el promotor de albúmina. El DNA BAC linearizado fue microinyectado en los pronúcleos de los cigotos de ratones B6CBAF2 de acuerdo con protocolos establecidos (**Giraldo & Montoliu, 2001**), los cuales fueron posteriormente transferidos a hembras receptoras pseudo-preñadas, obteniendo finalmente ratones transgénicos Alb- $\Delta^{654-1186}$ EGFR (a partir de ahora denominados Δ EGFR) (**Figura 15**). Seis ratones transgénicos fundadores fueron cruzados con ratones C57BL/6 wild-type (WT). Tres de ellos tuvieron camadas y mostraron la transmisión de la línea germinal del transgén, de manera que se establecieron y denominaron como líneas 1000 (>100 copias del transgén), 2000 (10-20 copias del transgén) y 4000 (<10 copias del transgén). Los ratones obtenidos fueron cruzados entre ellos (Δ EGFRF1) para generar líneas estables de ratones transgénicos, que se mantuvieron heterocigotos (**López-Luque et al., 2016**). Las líneas transgénicas están archivadas en el Archivo Europeo de Ratones Mutantes como B6CBA-Tg(Alb-DeltaEGFR).

El genotipado de los ratones se realizó usando DNA genómico procedente de la cola y un par de cebadores (Sigma-Aldrich) específicos para la detección del transgén mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tal y como se especifica en el Archivo Europeo de Ratones Mutantes (ir a la sección 4.2 de materiales y métodos para más detalles).

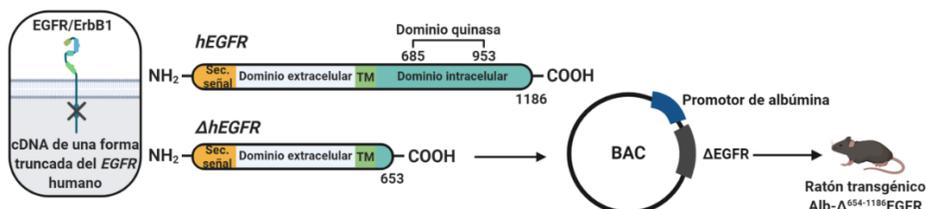


Figura 15. Generación del modelo de ratón transgénico Alb- $\Delta^{654-1186}$ EGFR (Δ EGFR). Un fragmento de cDNA que codifica para una forma truncada del EGFR humano, que carece del dominio quinasa en la región intracitosólica (eliminación de los aminoácidos 654-1186), se clonó en un cromosoma artificial bacteriano de transferencia (BAC) bajo el control de un promotor de albúmina. Adaptado de López-Luque et al., 2016.

La generación de este modelo animal se realizó bajo colaboración entre nuestro grupo de investigación y otros dos grupos de investigación dirigidos por el Dr. José Carlos Segovia (División de Terapias Innovadoras Hematopoyéticas, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)) y la Dra. Isabel Fabregat (Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL)). La microinyección se realizó en el Servicio de transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología, gracias a la colaboración del Dr. Lluís Montoliú (Departamento de Biología Molecular y Celular, (CNB-CSIC)).

1.3 Modelo de daño hepático inducido por la dieta DDC

Ratones WT y Δ EGFR machos de entre 8-10 semanas de edad fueron divididos aleatoriamente en grupos experimentales (5-11 animales por grupo) y sometidos a una dieta normal (grupo control) o a una dieta suplementada con un 0,1% DDC (Cymit Química). La dieta fue producida por los laboratorios Indigo y adecuadamente conservada en nuestro laboratorio. A continuación, se muestra un esquema del protocolo experimental:

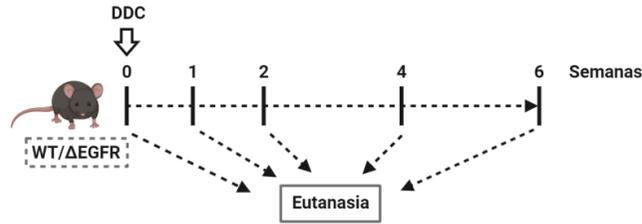


Figura 16. Representación esquemática del protocolo experimental.

Se recogieron muestras de suero y de tejido hepático (ir a la sección 1.4 de materiales y métodos para más detalles) tras 1, 2, 4 y 6 semanas de tratamiento con DDC o tras una dieta control para realizar posteriores análisis.

1.4 Proceso de recogida de muestras

Se anestesió por vía inhalatoria con isoflurano (laboratorios Esteve) a los ratones para abrir la cavidad torácica y exponer el corazón. La sangre se obtuvo por punción cardíaca utilizando una jeringa hipodérmica heparinizada de 1 ml y una aguja de calibre 25 y se colocó en tubos eppendorf. Tras coagulación a temperatura ambiente se centrifugaron las muestras a $300 \times g$ y temperatura ambiente durante 10 minutos para la separación del suero. El suero se congeló inmediatamente a -80°C para posteriores análisis.

Los hígados fueron pesados. Parte de algunos lóbulos hepáticos fueron seccionados finamente y fijados en una solución al 10% de formalina (Sigma-Aldrich) durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS) y después, consecutivamente, con diferentes soluciones: PBS-30% sacarosa, PBS-20% sacarosa y PBS-10% sacarosa. Posteriormente, el tejido fue embebido en parafina, seccionado ($4 \mu\text{m}$) y teñido con hematoxilina y eosina (H&E). La preparación de los bloques de parafina y la tinción H&E se realizó en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos (HCSC), en colaboración con el Dr. Julián Sanz, actualmente en la Clínica Universidad de Navarra (Madrid).

El resto del hígado fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C para ser utilizado posteriormente en la extracción de RNA y proteína.

1.5 Cálculo de la relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo

La relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo (liver-to-body weight ratio) fue calculada siguiendo la siguiente fórmula: $\% = 100 \times \text{LW}/\text{BW}$,

donde LW es el peso del hígado y BW es el peso del cuerpo del animal, en el momento del sacrificio.

1.6 Análisis de marcadores séricos

Las actividades de la AST, ALT, ALP y bilirrubina total fueron analizadas por el Centro de Análisis Sanitarios de la UCM utilizando tests de referencia y un equipo Cobas Integra 400 Plus Chemistry Analyzer (Roche).

1.7 Análisis morfológico cuantitativo de la expansión de HPC/células ovals

Se utilizó el software ImageJ para cuantificar la expansión de las HPC/células ovals a partir de los cortes histológicos teñidos con H&E. Las áreas de expansión de HPC/células ovals de 10 campos periportales no superpuestos de cada animal (4-8 animales por grupo) fueron delimitadas y medidas con un aumento 10X, y después normalizadas por el tamaño del área portal. Los datos se expresan como el valor medio relativo del área de expansión. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Eclipse TE300, Nikon acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-U2.

1.8 Análisis histopatológico

Los cortes histológicos teñidos con H&E y con la tinción inmunohistoquímica CK19 (sección 6.4.1 de materiales y métodos) fueron analizados por el Dr. Julián Sanz. Evaluó de manera cualitativa cambios histopatológicos observados en el modelo experimental DDC, como son la proliferación ductal y la inflamación portal y lobulillar, estableciendo para ello varias puntuaciones: 0-1 (normal), 2 (leve), 3 (moderado) y 4 (intenso). Cabe destacar que la evaluación de la proliferación ductal se realizó en base al número de estructuras ductales/conductos formados y la evaluación de la inflamación portal y lobulillar en base a la densidad de células inflamatorias, principalmente linfocitos, por área.

2. Cultivo de las líneas celulares

2.1 Modelos celulares

Las líneas celulares (de HPC/células ovals WT y Δ EGFR) usadas en este estudio proceden de ratones WT y Δ EGFR machos de 9 semanas de edad sometidos a una dieta suplementada con un 0,1% DDC durante 13 días. La fracción celular hepática no parenquimática (libre de hepatocitos) enriquecida en HPC/células ovals se aisló según el procedimiento descrito en la bibliografía

(Bisgaard et al., 1998) ligeramente modificado, procedimiento utilizado previamente por nuestro grupo de investigación para la obtención de HPC/células ovales a partir de otros modelos de ratón (del Castillo et al., 2008). Brevemente, el hígado fue lavado con una solución salina balanceada de Hank (HBSS, Lonza) sin Ca^{2+} y sin Mg^{2+} y posteriormente fue perfundido para su digestión con un medio William's E (Lonza) que contenía 0,1% de Pronasa E (Sigma-Aldrich), 0,05% de Colagenasa tipo I (Worthington Biomedical Corporation) y 0,007% de DNasa I (Worthington Biomedical Corporation). En un siguiente paso el hígado perfundido se extrajo y se disgregó para terminar la digestión en un baño en agitación a 37°C con el medio suplementado con estas tres enzimas durante 40-60 minutos.

Tras la digestión, la suspensión celular se filtró a través de un filtro de malla de nylon de $70\ \mu\text{m}$ (Falcon) y se lavó para su posterior purificación en un gradiente de Percoll (30% y 70% Percoll) (GE Healthcare, actualmente Cytiva). Las células se sembraron en un medio de adhesión/crecimiento Williams E (Tabla 1). Al día siguiente las células no adheridas se eliminaron y se mantuvo el cultivo durante unos días hasta que aparecieron pequeñas colonias de células con morfología epitelial, que se subcultivaron y expandieron para su caracterización, y fueron nombradas como HPC/células ovales WT-OC y HPC/células ovales $\Delta\text{EGFR-OC}$ según su origen, hígados de ratones WT y ΔEGFR , respectivamente (Figura 17).

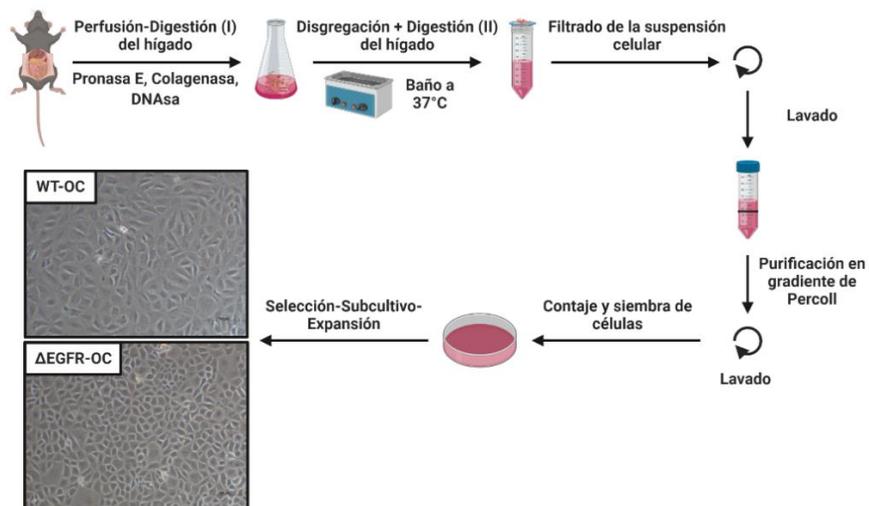


Figura 17. Esquema del aislamiento de las líneas de HPC/células ovales WT-OC y $\Delta\text{EGFR-OC}$ a partir de ratones tratados con dieta DDC. Se muestran imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de las líneas celulares una vez establecidas.

La línea celular de HPC/células ovales $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$ procede de un modelo de ratón knockout condicional para c-MET generado mediante el sistema de

modificación genética Cre-loxP (Huh et al., 2004). Estos ratones presentan secuencias loxP flanqueando el exón 16, que codifica para un dominio de unión a ATP de la región tirosina quinasa de c-MET esencial para la activación del receptor. La eliminación de esta región mediante la expresión y actividad de la Cre-recombinasa conduce a la expresión de un receptor que carece de actividad tirosina quinasa, dejando así de ser funcional. El aislamiento de las HPC/células ovals Met^{flx/flx} se realizó siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente (del Castillo et al., 2008). Una vez aisladas, estas células fueron validadas y caracterizadas fenotípica y funcionalmente para confirmar no solo su identidad de HPC/célula oval sino la expresión de un receptor c-MET funcional, por lo que estas células se comportan como HPC/células ovals WT (del Castillo et al., 2008).

2.2 Condiciones de cultivo celular

El cultivo de las líneas celulares se realizó en el medio indicado para cada tipo celular, suplementado con HEPES 20 mM (pH 7,4) (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco) y los requerimientos específicos para cada tipo celular (Tabla 1), además de penicilina G 120 µg/ml (Sigma-Aldrich), estreptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) y anfotericina B 1,25 µg/ml (Gibco). Las condiciones físicas de cultivo eran controladas, temperatura de 37°C, humedad del 80% y atmósfera de CO₂ del 5%. El medio se renovó completamente cada 3 días y las células se tripsinizaron y subcultivaron con tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Gibco) cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia. Para la realización de los experimentos solo se utilizaron células de bajo número de pases (p1-p12).

Para criopreservar las células, éstas fueron tripsinizadas y centrifugadas durante 5 minutos a 450 x g. El precipitado celular fue resuspendido en una solución de FBS con dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 10% (v/v) e introducido en criotubos (Nunc). Las células se congelaron lentamente mediante el uso de una caja de criopreservación de polietileno bañada por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Scientific), que era introducida en un congelador a -80°C. Pasado un plazo máximo de una semana los criotubos fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

La descongelación de las células se realizó de forma rápida, pasando los criotubos directamente a un baño a 37°C. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con abundante medio de cultivo. Una vez adheridas, el medio fue reemplazado por medio fresco para la total eliminación del DMSO.

Línea celular	Medio	Suplementos
WT-OC ΔEGFR-OC	William's E, 4,5 g/l glucosa (-) L-glutamina (Lonza)	Piruvato sódico 1 mM (Sigma-Aldrich) NaHCO ₃ 17,6 mM (Sigma-Aldrich) Glucosa 14 mM (PanReac) L-Glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) Nicotinamida 10 mM (Sigma-Aldrich) Ácido ascórbico 0,2 mM (Sigma-Aldrich) *ITS 1X (Gibco) *Dexametasona 100 nM (Sigma-Aldrich) *EGF 10 ng/ml (Preprotech) *HGF 10 ng/ml (R&D systems) Superficie recubierta de colágeno tipo I (Corning) (solución de 50 µg/ml en ácido acético glacial 0,02 N)
	DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l glucose (Lonza)	No
Met ^{flx/flx}	DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4,5 g/l glucose (Lonza)	No

Tabla 1. Medios de cultivos celulares utilizados para las distintas líneas celulares. (*) Los suplementos se añaden inmediatamente antes de su uso. Para la colagenización de los platos, éstos se cubrieron con la solución de colágeno tipo I 50 µg/ml en ácido acético glacial 0,02 N durante una hora y posteriormente se lavaron con abundante PBS.

2.3 Factores de crecimiento y ácidos biliares

Los factores de crecimiento y ácidos biliares utilizados en este trabajo aparecen resumidos en la **Tabla 2**:

Factores de crecimiento y sales biliares	Concentración final	Casa comercial
EGF	5-50 ng/ml	Serono Laboratories
TGF-β1	1 ng/ml	Calbiochem
HGF	40 ng/ml	R&D systems
Glicoquenodeoxicolato de sodio (GCDC)	100-2.000 µM	Sigma-Aldrich
Taurocolato de sodio (TCA)	100-2.000 µM	Sigma-Aldrich

Tabla 2. Factores de crecimiento y ácidos biliares.

Antes de realizar los tratamientos se cambió el medio de cultivo de las células a medio sin suero entre 2 y 15 horas, según los tiempos de tratamiento.

3. Modificación genética de las HPC/células ovals

3.1 Delección del *EGFR* mediante la tecnología CRISPR/Cas9

El *EGFR* fue deletado de forma estable (KO-*EGFR*) en las HPC/células ovals mediante la tecnología CRISPR/Cas9 utilizando el sistema lentiviral doble diseñado por el laboratorio de Zhang ([Shalem et al., 2014](#)). Esta metodología utiliza unas moléculas de RNA guías (sgRNAs) que son introducidas en las células y, una vez dentro, reconocen el sitio exacto del DNA que se quiere editar y se unen a la enzima endonucleasa CRISPR associated protein 9 (CAS9). Por ello, también es necesario que las células presenten la endonucleasa CAS9, ya que una vez unida a los sgRNAs es dirigida a la región diana del DNA donde actuará y cortará la doble cadena de DNA, dando lugar a la inactivación génica o a la introducción de genes heterólogos ([D'Agostino & D'Aniello, 2017](#)). Por ello, el sistema utiliza dos vectores lentivirales para introducir en las células tanto CAS9 como los sgRNAs: el plásmido lentiCas9-Blast (Addgene, #52962) y el plásmido lentiGuide-Puro (portador de los sgRNAs de interés) (Addgene, #52963). El plásmido lentiGuide-Puro fue modificado en nuestro laboratorio para generar virus portadores de sgRNAs dirigidos al *EGFR* (plentiGuide-Puro-*EGFR*-KO-4/15/22) (ir a la sección 3.2.1 de materiales y métodos para más detalles).

Las partículas lentivirales lentiCas9-Blast se generaron en células HEK293T (ir a la sección 3.2.2 de materiales y métodos para más detalles). Las HPC/células ovals parentales fueron infectadas por primera vez con partículas lentivirales con CAS9, sembrando las células en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 50.000 células/pocillo. Se retiró el medio de las células y se añadieron 500 µl del medio que contenía las partículas lentivirales lentiCas9-Blast en presencia de polibrén (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich), polímero catiónico utilizado para incrementar la eficiencia de infección. Pasadas unas 6 horas, se completó el volumen con medio DMEM al 10% FBS hasta alcanzar 1 ml. Transcurridas 48 horas, se seleccionaron las HPC/OC-Cas9⁺ incorporando al medio blasticidina (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) durante un mínimo de 7 días. Los niveles de proteína CAS9 en el pool de células HPC/OC-Cas9⁺ fueron verificados mediante western blot (ir a la sección 6.1 de materiales y métodos para más detalles) utilizando el anticuerpo CAS9 (ver [Tabla 14](#)).

En segundo lugar, las células HPC/OC-Cas9⁺ fueron infectadas de forma independiente con diferentes partículas lentivirales que contenían los sgRNAs dirigidos al *EGFR*: plásmidos plentiGuide-Puro-*EGFR*-KO-4/15/22 (ir a la sección 3.2.1 de materiales y métodos para más detalles). Los protocolos de infección y selección con puromicina (1 µg/ml) (PanReac) se realizaron como se ha descrito anteriormente. Cada pool de células (HPC/OC-Cas9⁺-KO-*EGFR*-4/15/22) fue

expandido y el DNA genómico fue aislado utilizando el protocolo NK (Tabla 3). Cada región diana fue amplificada mediante PCR utilizando cebadores específicos (Thermo Scientific) (Tabla 4) y se realizó la secuenciación Sanger en el servicio de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid para comprobar si había tenido lugar la edición genética en las células. Una vez comprobado el genotipo adecuado de las células, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 1 célula/pocillo, con el fin de obtener diferentes clones a partir de una única célula. Tras el crecimiento de los diferentes clones, se procedió a su validación funcional y a la realización de los diferentes experimentos. Adicionalmente, se usaron partículas virales lentiGuide-Puro-Non-Target Control (NTC) para infectar las células HPC/OC-Cas9⁺, generando células HPC/OC-Cas9⁺-NTC como control.

Paso	Descripción del proceso	Reactivos utilizados
1	Incubación del precipitado celular con el tampón NK durante toda la noche a 55°C	Tampón NK: Tris-HCl (50 mM, pH 8), EDTA (50 mM), SDS (1%) y Proteinase K (100 µg/ml; Qiagen)
2	Incubación con RNAsa A (30 min, a 37°C)	RNAsa A (50 µg/ml; Qiagen)
3	Precipitación de proteínas con acetato de amonio, centrifugación, colección de sobrenadantes, precipitación del DNA genómico con isopropanol y centrifugación	Acetato de amonio (7,5 M; Sigma-Aldrich), Isopropanol (PanReac)
4	Lavado del DNA genómico con etanol (70%), secado y resuspensión en agua libre de nucleasas	Etanol (PanReac), Agua libre de nucleasas

Tabla 3. Protocolo NK de extracción del DNA genómico de las células HPC/OC-Cas9⁺-KO-EGFR-4/15/22 y HPC/OC-Cas9⁺-NTC.

Región diana del gen <i>EGFR</i>	Cebador 5´-3´(forward)	Cebador 5´-3´(reverse)	sgRNAs dirigidos a esta región
Exón 4	TACAGGGTCTTTGGGTGGGGGC	ACCCCAACTCCATTCAGCCC	sgRNA-1
Exón 15	TGCGCACCAGGTATGCAAGTGG	ACAGTTGGCGTGCCATAGGTGG	sgRNA-2
Exón 22	GGAGCATAGGCCTGAAGCATGGC	TGGACACGCTCACTGTCTTGCA	sgRNA-3

Tabla 4. Secuencias de cebadores para la amplificación por PCR de las regiones diana en los experimentos de EGFR-KO CRISPR/Cas9.

3.2 Generación de plásmidos y virus para la delección del *EGFR* utilizando la tecnología CRISPR/Cas9

3.2.1 Diseño de los sgRNAs y producción de los plásmidos lentiGuide-Puro-EGFR-KO

En primer lugar, se seleccionaron diferentes secuencias de DNA para los sgRNAs (**Tabla 5**) específicos frente al *EGFR* en las HPC/células ovas con la ayuda del Dr. Álvaro Gutiérrez-Uzquiza utilizando la herramienta CRISPR/Cas9 del software Benchling (<https://www.benchling.com/>). Estas secuencias (#1, #2, #3) estaban dirigidas a los exones 4, 15 y 22 del *EGFR*, respectivamente, que eran los que se había observado que se usan más frecuentemente en la literatura.

sgRNA	Cebador 5´-3´(forward)	Cebador 5´-3´(reverse)	lentiGuide-Puro-EGFR-KO-#
#1	<i>CACCGCAATATGGATACTATCCAG</i>	<i>AAACCTGGATAGTATCCATATTGC</i>	#4
#2	<i>CACCGTGTGGGCCATCAATGTAGT</i>	<i>AAACACTACATTGATGGCCACAC</i>	#15
#3	<i>CACCGATACACACCAAGTGATGTC</i>	<i>AAACGACATCACTTTGGTGTGTATC</i>	#22

Tabla 5. Cebadores diseñados para el clonaje de las secuencias de los sgRNAs en los plásmidos lentiGuide-Puro utilizando CRISPR/Cas9. En cursiva se indican los extremos cohesivos.

Una vez diseñadas las secuencias de los sgRNAs, se llevó a cabo la hibridación de cada par de cebadores para sgRNAs con el fin de obtener un cebador de doble cadena con extremos cohesivos (en cursiva) que será el inserto que se introducirá en el vector de clonación plasmídico lentiGuide-Puro, el cual producirá los sgRNA específicos en base a las secuencias insertadas. Para ello, se incubaron los cebadores durante 5 minutos a 95°C en la mezcla de reacción que se detalla en la **Tabla 6**, dejando posteriormente enfriar a temperatura ambiente y conservándolos a -20°C hasta su uso.

Composición de la mezcla de reacción
23 µl agua libre de nucleasas 1 µl cebador forward (100 µM) 1 µl cebador reverse (100 µM) 25 µl tampón de anillado 2X (acetato potásico 200 mM; Hepes-KOH 60 mM pH 7,4; acetato de magnesio 4mM)

Tabla 6. Composición de la mezcla de reacción para la hibridación de los cebadores para sgRNAs.

Por otro lado, se realizó la digestión del vector de clonación plasmídico lentiGuide-Puro con la enzima de restricción BsmBI (Esp3I) (Thermo Scientific) a 37°C durante 15-18 horas. Una vez digerido, el DNA se cargó en un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE 1X (Tris-HCl 40 mM; Ácido acético glacial 20 mM; EDTA 1 mM) que contenía el colorante para la visualización de ácidos nucleicos GelRed (Biotium). La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 30 minutos a 80 V y, al finalizar, se procedió al corte y purificación de la banda correspondiente al vector digerido, siguiendo el protocolo del kit comercial GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Una vez purificado, se procedió a realizar la ligación del vector con cada uno de los sgRNAs anillados de forma independiente utilizando la T4 ligasa (Thermo Scientific), durante 20 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se procedió a la transformación de bacterias *Escherichia coli* competentes (XL10-Gold Ultracompetent Cells, Agilent Technologies) con cada una de las mezclas de la ligación, en condiciones de esterilidad durante todo el proceso. Para ello, se descongelaron en hielo 100 µl de bacterias, a las cuales se les añadió 4 µl de β-mercaptoetanol y se dejaron en hielo durante 10 minutos, agitando periódicamente a intervalos de 2 minutos. Posteriormente, se les añadió 2 µl del resultado de la ligación y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, las bacterias se sometieron a un choque térmico, introduciendo primero los tubos en un baño a 42°C durante 30 segundos y pasándolos rápidamente de nuevo a hielo durante 3 minutos. Una vez realizado el choque térmico, se añadió a cada tubo 200 µl de medio de recuperación (Endura) previamente calentado, y se incubaron los tubos durante 1 hora a 37°C y agitación constante. Finalmente se sembraron en placas de LB-agar (medio LB (10 g Bacto-triptona, 10 g cloruro sódico (NaCl) y 5 g de extracto de levadura por litro, esterilizado en autoclave) al 1,5% agar) suplementadas con ampicilina (100 µg/ml). Se dejó la placa hacia arriba para que se absorbiese la mezcla durante unos minutos, y finalmente se incubó la placa, hacia abajo, durante 15-18 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se seleccionaron colonias de las placas y se llevaron a tubos Falcon estériles que contenían 1,5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml), y se incubaron a 37°C con agitación orbital durante 15-18 horas.

A la mañana siguiente, se llevó a cabo el aislamiento del DNA plasmídico siguiendo el protocolo del kit comercial NucleoSpin Plasmid, Mini Kit for plasmid DNA (Macherey-Nagel). El DNA plasmídico eluído se conservó a -20°C hasta su uso. La concentración de DNA plasmídico se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (A260), considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/ml de DNA. La pureza de las muestras de DNA se determinó mediante la relación entre las absorbancias A260 y A280. Se aceptó un ratio entre 1,8 y 2,0 como DNA puro. Además, los

plásmidos obtenidos se secuenciaron en el servicio de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid utilizando el cebador hU6F.LKO.1_5 (5'-GACTATCATATGCTTACCGT-3'), para determinar la correcta incorporación de los insertos en los mismos. Se consiguió, al menos, un plásmido positivo por cada par de sgrNAs, generando los correspondientes plásmidos plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4/15/22.

3.2.2 Generación de virus para experimentos CRISPR/Cas9

El empaquetamiento en partículas lentivirales de los plásmidos lentiCas9-Blast, plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4/15/22 y lentiGuide-Puro-NTC se llevó a cabo en la línea celular HEK293T, que proviene de células embrionarias de riñón humano. Estas células crecen en medio DMEM (Gibco), suplementado con un 10% FBS y antibióticos, y se mantenían en cultivo en las condiciones habituales. Para la transfección, por cada plásmido se sembraron 4×10^5 células HEK293T en placas de cultivo de 10 cm de diámetro recubiertas con gelatina (2%) (Sigma-Aldrich), permitiéndoles crecer hasta alcanzar una confluencia del 40-50% al día siguiente. Luego, se retiraron los antibióticos del medio de cultivo para aumentar la tasa de transfección. Para generar las partículas lentivirales mencionadas se co-transfectaron 3 plásmidos:

- 2 µg de plásmido de empaquetamiento lentiviral psPAX2 (Addgene, #12260) (común para todas las producciones lentivirales). Este plásmido porta los genes de empaquetamiento lentiviral Gag y Pol.
- 1,5 µg de plásmido lentiviral envoltente pCMV-VSV-G (Addgene, #8454) (común para todas las producciones lentivirales). Este plásmido induce la expresión de la proteína envoltente lentiviral del virus VSVg.
- 2,5 µg del plásmido lentiCas9-Blast, de cada uno de los plásmidos plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4/15/22 generados o del plásmido lentiGuide-Puro-NTC. Este tercer plásmido incluido en la mezcla es el que lleva la secuencia que se insertará en el genoma de las células infectadas y el que determina específicamente el lentivirus generado en cada placa.

Cada mezcla de los 3 plásmidos fue resuspendida en medio Optimem (Gibco) y mezclada con polietilenimina (PEI, Polysciences) en proporción 1:6. Cabe destacar que la polietilenimina es un polímero con carga positiva que forma vesículas que atrapan el DNA y permiten la liberación del DNA al interior de la célula al fusionarse con la membrana plasmática. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadió gota a gota el contenido de las mezclas de transfección sobre las placas con las células HEK293T y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio de las células y

se reemplazó por 10 ml de medio fresco estándar para eliminar el exceso de plásmidos y PEI. A las 72 horas tras la transfección, se recogió el medio de cultivo de las células de forma independiente y se centrifugó 5 minutos a 1930 x g. Posteriormente se tomaron los sobrenadantes procedentes de estas centrifugaciones, que es donde se encontraban los virus, se filtraron con filtros de 0,45 µm (Cultek), se alicuotearon y se guardaron a -80°C.

La generación de los virus fue comprobada por el Dr. Álvaro Gutiérrez-Uzquiza mediante titulación vírica con las curvas dosis-respuesta. Para ello, se sembraron las células HEK293T en placas de 6 pocillos a una confluencia del 30%. Las células de los diferentes pocillos se incubaron durante toda la noche con un medio fresco que contenía volúmenes crecientes de muestras con las partículas lentivirales (de 0 µl a 1000 µl) y polibrén (10 µg/ml). Transcurridas 48 horas, las células se trataron durante 7 días con blasticidina (10 µg/ml) (para la titulación de lentiCas9-Blast) o puromicina (1 µg/ml) (para la titulación de plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4/15/22 y lentiGuide-Puro-NTC). Finalmente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos con la solución colorante y fijadora (cristal violeta 0,2% p/v (Sigma-Aldrich) en 2% etanol). Se contaron las colonias coloreadas resistentes a los antibióticos y se estimó el número de unidades infecciosas lentivirales por ml en cada muestra. Sólo se utilizaron las producciones virales que superaban los 10⁴ virus/ml.

4. Análisis de DNA

4.1 Aislamiento de DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico de ratón se recogió alrededor de 1 cm de la cola en un eppendorf y se incubó con 0,5 ml de un tampón de lisis específico (**Tabla 7**) durante toda la noche a 55°C en agitación constante. A continuación, las muestras se centrifugaron a 15.700 x g durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y el DNA genómico se precipitó con isopropanol en frío. Finalmente, el DNA se diluyó en tampón Tris-EDTA (TE) (**Tabla 8**) a 37°C para facilitar su resuspensión y se almacenó a -20°C hasta que se procesó. La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.

Compuesto	Concentración final
Tris-HCl pH 8,5	100 mM
EDTA	5 mM
Dodecil sulfato sódico (SDS)	0,2% (p/v)
NaCl	200 mM
Proteinasa K*	100 µg/ml

Tabla 7. Tampón de lisis de aislamiento de DNA genómico. (*) Añadido inmediatamente antes de su uso.

Compuesto	Concentración final
Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

Tabla 8. Tampón TE.

Para el genotipado de las líneas de HPC/células ovas, el aislamiento del DNA genómico se realizó mediante una extracción fenol:cloroformo clásica. En primer lugar, las células se lavaron con PBS y se recogieron mediante rascado. Posteriormente, se centrifugaron a 400 x *g* durante 5 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado en 0,5 ml del tampón de lisis (**Tabla 7**) durante toda la noche a 55°C en agitación constante.

A continuación, se añadió el mismo volumen de fenol (0,5 ml), se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 3 minutos a 13.400 x *g*. Se tomó la fase acuosa superior correspondiente a los ácidos nucleicos y se añadió el mismo volumen de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 3 minutos a 13.400 x *g*. De nuevo, se tomó la fase superior y se realizó la misma operación sólo con cloroformo con el fin de eliminar los restos de fenol. Finalmente, se precipitó el DNA genómico mediante inversión con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 1 volumen de isopropanol. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó 2 minutos a 9.800 x *g*. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón TE (**Tabla 8**) y se incubó durante 1-2 horas a 37°C para facilitar su resuspensión. La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm.

4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se incubó 1 µg de DNA genómico con una mezcla de 0,4 µM de cebadores específicos (**Tabla 9**), 200 µM dNTPs (Thermo Scientific), tampón NH₄ 1X, 1,5 mM MgCl₂ y 2 unidades de Taq polimerasa (Bioline). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes:

- 94°C durante 2 minutos.
- 29 ciclos con 3 pasos: 94°C durante 30 segundos (desnaturalización), 59°C durante 30 segundos (unión de los cebadores) y 72°C durante 45 segundos (elongación).
- 72°C durante 10 minutos.
- 4°C (conservación).

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1,3% en tampón TAE 1X que contenían el colorante para la visualización de ácidos nucleicos GelRed (Biotium). La electroforesis se llevó a cabo durante aproximadamente 30 minutos a 80 V. Se observaron bandas de amplificación específicas para Δ hEGFR a 660 bp (**Figura 18**).

Gen	Cebador 5'-3'(forward)	Cebador 5'-3'(reverse)
Δ hEGFR	TAAGATCCCGTCCATCGCCAC	CCAGGCTTCCATTACTAG

Tabla 9. Secuencias de los cebadores empleados en el genotipado de los ratones y de las líneas de HPC/células ovales.

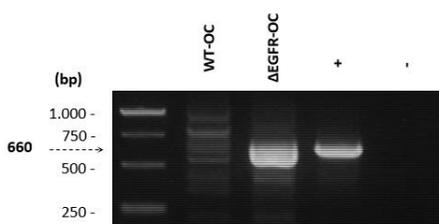


Figura 18. PCR ilustrativa para el genotipado de los ratones WT y Δ EGFR. La PCR confirma la presencia del transgén a 660 bp en los animales Δ EGFR. + es un control positivo que lleva DNA genómico de un animal Δ EGFR previamente genotipado; - es un control negativo que lleva H₂O en vez de DNA genómico.

5. Análisis de la expresión génica

5.1 Aislamiento de RNA total

En el caso del aislamiento a partir de células en cultivo, éstas se lavaron con PBS frío y se recogieron mediante rascado con tampón de lisis (proporcionado en el kit comercial NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel). En el caso de tejido hepático, 40 mg de tejido congelado fueron machacados con un mortero, homogenizados con una aguja fina y lisados con tampón de lisis durante 20 minutos. En ambos casos, el RNA se aisló siguiendo el protocolo del kit comercial mencionado arriba, incluyendo el tratamiento con DNAsa (proporcionado en el propio kit) para evitar la presencia de DNA genómico. El RNA fue eluído en agua libre de RNAsas y se conservó a -80°C hasta su uso.

La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de RNA. La pureza de las muestras de RNA se determinó mediante la relación entre las absorbancias A260 y A280. Se aceptó un ratio entre 1,8 y 2,0 como RNA puro.

5.2 Síntesis de cDNA (RT, retrotranscripción)

El cDNA se obtuvo mediante una reacción de retrotranscripción a partir de 1 µg de RNA total, siguiendo las instrucciones del kit comercial SuperScript III RT (Invitrogen) en dos reacciones consecutivas. En la primera reacción las muestras se calentaban a 65°C durante 5 minutos en presencia de 0,25 µg de cebador poli dT (Roche) y dNTPs 0,5 mM (Thermo Scientific), con el fin de desnaturalizar el RNA. A continuación, esta mezcla se incubó a 50°C durante 1 hora en presencia de 200 unidades de retrotranscriptasa (Superscript III RNase H Reverse Transcriptase, Invitrogen), ditiotretitol (DTT) 5 mM y 20 unidades de inhibidor de RNAsas (RNasin, Promega) en un tampón RT 5X y un volumen final de 20 µl. La reacción se detuvo inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se diluyó 1:10 en agua libre de nucleasas y se conservó a -20°C hasta su uso.

5.3 RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos, siendo el volumen total de reacción por pocillo de 10 µl. La composición de la mezcla de reacción se detalla en la **Tabla 10**.

Composición de la mezcla de reacción
2,5 µl cDNA diluido 1:10
5 µl FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche)
1,2 µl mezcla de cebadores 10 µM
1,3 µl agua libre de nucleasas

Tabla 10. Composición de la mezcla de reacción para la RT-qPCR.

El desarrollo de la reacción de RT-qPCR se realizó en un equipo ABI Prism 7900 HT Fast-Real-Time de Applied Biosystems de los servicios de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Las secuencias de los cebadores empleados se encuentran indicadas en la **Tabla 11**. La expresión de *GUSB* se empleó como normalizador interno. Además, se prepararon controles negativos mediante la adición de agua en lugar de cDNA en las muestras.

Se obtuvo el parámetro Ct (Cycle threshold), que se define como el número de ciclos que cada muestra necesita para alcanzar un valor de fluorescencia umbral a partir del cual ese DNA puede ser detectado. Para cada condición del experimento los datos de Ct de cada gen se corrigieron con los valores de Ct del normalizador interno, obteniéndose así el valor de ΔCt . Éste, a su vez, se expresó en relación a los valores de ΔCt de un control, obteniendo así el parámetro $\Delta\Delta Ct$. Dicho parámetro, una vez expresado en escala no

logarítmica mediante la transformación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proporciona el número de veces de inducción de la expresión del gen en estudio respecto a un control, denominado valor RQ.

Proteína	Gen	Cebador 5'-3' (forward)	Cebador 5'-3' (reverse)	Especie
α -SMA	<i>ACTA2</i>	ACAGCCCTCGCACCCA	GCCACCGATCCAGACAGAGT	Ratón
ANFIREGULINA	<i>AR</i>	GGTCTTAGGCTCAGGCCATTA	CGCTTATGGTGGAACCTCTC	Ratón
ALBÚMINA	<i>ALB</i>	ATCTGCACACTCCAGAGAAGG	TCCATGACAGTCTTCAGTTGC	Ratón
CCL2	<i>CCL2</i>	GTCCTGTCTGCTTCTGG	GCTCTCCAGCCTACTCATTG	Ratón
E-CADHERINA	<i>CDH1</i>	CAGCCTTCTTTTCGGAAGACT	GGTAGACAGCTCCCTATGACTG	Ratón
COL1A1	<i>COL1A1</i>	GTCGCTTCACCTACAGCACCT	AGGGGGGAGGTCTTGGTGGTTT	Ratón
CTGF	<i>CTGF</i>	CACTCTGCCAGTGGAGTTCA	AAGATGTCATTGTCCCCAGG	Ratón
CXCL1	<i>CXCL1</i>	AAGGTGTCCCAAGTAACGG	TGTTGTCAGAAGCCAGCGTT	Ratón
CXCL2	<i>CXCL2</i>	CCACCAACCACCAGGCTACA	TGGCAGGGTCTTCAGGCATT	Ratón
EPCAM	<i>EPCAM</i>	ACCTGAGAGTGAACGGAGAGCC	TGCATGGAGAAGCTCGGGTGCCT	Ratón
EGFR	<i>ERBB1</i>	TCCTCATTGCCCTCAACACC	GCAGTTCCTAAGCCAGTT	Ratón
EGFR	<i>ERBB1</i>	GCAAATTCGAGACGAAGCC	CTGTATTTGCCCTCGGGTT	Humano
GUSB	<i>GUSB</i>	AAAATGGAGTGCCTGTTGGGTCG	CCACAGTCCGTCAGCGCCTT	Ratón
HB-EGF	<i>HBEGF</i>	CGGGGAGTGCAGATACCTG	TTCTCCACTGGTAGAGTCAGC	Ratón
HGF	<i>HGF</i>	GAGTCTGAGTTATGTGCTGGG	AGGACGATTTGGGATGGC	Ratón
IL-1 β	<i>IL1B</i>	CTGGGAAACAACAGTGGTCA	CTGCTCATTACGAAAAGGG	Ratón
IL-4	<i>IL4</i>	CTCGAATGTACCAGGAGCCATAT	CACATCCATCTCCGTGCATGG	Ratón
IL-6	<i>IL6</i>	AGACAAAGCCAGAGTCCTTCA	GGAGAGCATTGGAAATTGGGG	Ratón
IL-12 β	<i>IL12B</i>	ATTACTCCGGACGGTTCACG	ACGCCATTCCACATGTCACT	Ratón
IL-17	<i>IL17</i>	CAAACATGAGTCCAGGGAGAG	ACACGCTGAGCTTTGAGG	Ratón
CK19	<i>KRT19</i>	TTCAGTACGCATTGGGTGAGGGG	ACACAGCCAGGGTCCCACTAA	Ratón
CD133	<i>PROM1</i>	CTGGGATTGTTGCCCTCTC	AGGGCAATCTCCTTGAATCA	Ratón
TGF- α	<i>TGFA</i>	TCCTCATTATCACCTGTGTGC	GTCTCAGAGTGGCAGCAAGC	Ratón
TGF- β 1	<i>TGFB1</i>	ATGAACCGGCCCTTCTGCT	TTGGTATCCAGGGCTCTCCGGT	Ratón
TGF- β 2	<i>TGFB2</i>	TGGAGTCACAACAGTCCAGCCG	ATGTAAGAGGGCGAAGGCAGCA	Ratón
TNF- α	<i>TNFA</i>	ACGTCGTAGCAAACCACAA	ATCGGCTGGCACCCTAGTT	Ratón

Tabla 11. Secuencias de los cebadores empleados en la RT-PCR cuantitativa.

6. Análisis de la expresión de proteínas

6.1 Análisis de la expresión de proteínas mediante western blot

6.1.1 Obtención de extractos proteicos celulares

Las células se lavaron con PBS frío y se rascaron en tampón de lisis RIPA modificado (Tabla 12). Los lisados celulares se incubaron durante 30 minutos a

4°C, agitando mediante vórtex cada 10 minutos, y pasado ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 15.700 x g 10 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. Finalmente, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Compuesto	Concentración final
Deoxicolato de sodio	1% (p/v)
Tris-HCl pH 7,4	10 mM
SDS	0,1% (p/v)
NaCl	150 mM
NP-40	1% (v/v)
EDTA	2 mM
Na ₃ VO ₄ *	0,1 mM
NaF*	20 mM
Aprotinina*	10 µg/ml
Leupeptina*	10 µg/ml
PMSF*	1 mM

Tabla 12. Composición del tampón RIPA modificado.

(*) Añadido inmediatamente antes de su uso.

6.1.2 Obtención de extractos proteicos a partir de tejido hepático

25-30 mg de tejido hepático congelado se machacaron con un mortero en hielo seco y se lisaron en tampón RIPA modificado (Tabla 12) durante 40 minutos a 4°C, agitando mediante vórtex cada 10 minutos. Pasado ese tiempo, se procedió como en el apartado 6.1.1.

6.1.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo el método de Bradford, utilizando una recta patrón con concentraciones conocidas (0-10 µg) de albúmina sérica bovina (BSA, PanReac). Las muestras a valorar se prepararon por triplicado, añadiendo 1 µl de extracto proteico, 49 µl de agua ultrapura y 200 µL de reactivo de Bradford (PanReac). Posteriormente, se cuantificó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Powerwave XS, Biotek).

6.1.4 Electroforesis de proteínas

Las muestras se prepararon utilizando el tampón de carga Laemmli 4X (Tabla 13) y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos.

Compuesto	Concentración final
SDS	8% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	250 mM
Glicerol	40% (v/v)
Azul de bromofenol	0,002% (p/v)
β -mercaptoetanol	5% (v/v)

Tabla 13. Composición del tampón de carga Laemmli 4X.

Las proteínas se separaron en función de su peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida a distintas concentraciones (6-15%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó a voltaje constante (80-120 V) en un tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1%, glicina 0,2 M, pH 8,3). En cada gel se cargaba un pocillo con un marcador de pesos moleculares (Thermo Scientific) para facilitar la posterior identificación de la proteína de interés.

6.1.5 Transferencia de proteínas

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa (GE Healthcare, actualmente Cytiva) utilizando un equipo de transferencia en húmedo y tampón de transferencia (20% metanol, Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM) a amperaje constante (0,3 A) durante 110-155 minutos, dependiendo del tamaño o grosor del gel, así como del porcentaje de acrilamida. Para evaluar la eficacia de la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau (0,2% en ácido tricloroacético al 3%).

6.1.6 Inmunodetección de las proteínas

Tras la transferencia de las proteínas a las membranas, éstas se lavaron con TTBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0,05%, pH 7,6) y se incubaron con una solución de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo o BSA en TTBS, según las especificaciones de cada anticuerpo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron en agitación suave a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido como se indica en la **Tabla 14** en TTBS suplementado con 0,5-5% leche o BSA, según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TTBS para eliminar el anticuerpo no unido a la proteína y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:5000 en TTBS suplementado con 0,5-1% de leche o BSA durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, tras 3 nuevos lavados de 10 minutos con TTBS se realizó la inmunodetección mediante una reacción de quimioluminiscencia con la enzima peroxidasa que lleva acoplada el anticuerpo secundario. Esta reacción se llevó a cabo con un kit comercial (Pierce ECL Western blotting substrate) bien en

el documentador de geles VWR® Imager2 and Imager CHEMI Premium o bien utilizando películas de rayos X.

Las membranas podían ser borradas para ser rehibridadas con otros anticuerpos. Para ello se incubaron con una solución de borrado (glicina 0,20 M, SDS 0,1%, Tween-20 1% a pH 2,2-2,5) dos veces durante 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en TBS dos veces durante 10 minutos y finalmente en TTBS dos veces durante 5 minutos.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Especie	Casa comercial
β-ACTINA	Sigma-Aldrich (A-5441)	1:5000	Ratón	Cell Signaling Technology (7076)
	Cell Signaling Technology (3700)			
ALBÚMINA (RaRa/Alb/PO)	Nordic Immunology	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
CAS9	Cell Signaling Technology (14697)	1:1000	Ratón	Cell Signaling Technology (7076)
CASPASA 3 activa	Cell Signaling Technology (Asp175) (9661)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
CK19 (TROMA III)	Hybridoma Bank	1:1000	Rata	Fisher Scientific (31471)
E-CADHERINA	BD Transduction Laboratories (610181)	1:1000	Ratón	Cell Signaling Technology (7076)
EGFR	R&D Systems (AF231)	1:100	Cabra	Santa Cruz Biotechnology (sc-2354)
EPCAM	Santa Cruz Biotechnology (sc-66020)	1:1000	Ratón	Cell Signaling Technology (7076)
ERK1/2	Cell Signaling Technology (9102)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
Phospho-AKT	Cell Signaling Technology (Ser473) (9271)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
Phospho-EGFR	Cell Signaling Technology (Tyr1068) (D7A5) (3777)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
Phospho-ERK1/2	Cell Signaling Technology (Thr202/Tyr204) (9101)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
Phospho-SMAD2	Cell Signaling Technology (Ser465/467) (3101)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
Phospho-STAT3	Cell Signaling Technology (Tyr705) (9131)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
SMAD2/3	Cell Signaling Technology (5678)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)
STAT3	Cell Signaling Technology (9132)	1:1000	Conejo	Cell Signaling Technology (7074)

Tabla 14. Anticuerpos primarios utilizados en western blot.

6.2 Análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo

Para el análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo las células se despegaron de las placas de cultivo con tripsina-EDTA, se contaron, se centrifugaron 5 minutos a 100 x *g* a 4°C y se resuspendieron en PBS-3% BSA (1x10⁶ células por condición). Se siguieron los siguientes protocolos para analizar diferentes proteínas.

6.2.1 Análisis de A6

Las células se incubaron con el anticuerpo primario A6 (**Tabla 15**) o sólo con PBS-3% BSA, como control, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente las células se lavaron con PBS-3% BSA y se centrifugaron a 400 x *g* 5 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en PBS-3% BSA y se incubó con el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (**Tabla 15**) o sólo con PBS-3% BSA durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Finalmente, las células se diluyeron con PBS para obtener la concentración celular adecuada para el análisis y se transfirieron a los tubos de citometría.

6.2.2 Análisis de EPCAM

En primer lugar, se realizó un paso de bloqueo incubando las células en PBS-5% de suero de ratón durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron con PBS-3% BSA y se centrifugaron a 400 x *g* 5 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en PBS-3% BSA y se incubó con EPCAM-Ficoeritrina (PE), con el control isotópico IgG1 de ratón-PE (**Tabla 15**), o sólo con PBS-3% BSA como control, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 400 x *g* 5 minutos a 4°C. El precipitado celular fue resuspendido en PBS para obtener la concentración celular adecuada para el análisis y se transfirió a los tubos de citometría.

En ambos casos se analizaron 10.000 células por condición en un citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson) del Servicio de Citometría de la Universidad Complutense de Madrid.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución
A6	No comercial Cortesía de la Dra. V. Factor	1:50
Anti-rata FITC	Invitrogen (31629)	1:200
EPCAM-PE	Santa Cruz Biotechnology (sc-66020)	1:50
Control isotópico IgG1 de ratón-PE	Santa Cruz Biotechnology (sc-2866)	1:50

Tabla 15. Anticuerpos utilizados para el análisis de la expresión de proteínas mediante citometría de flujo.

6.3 Análisis de la expresión de proteínas mediante inmunocitoquímica

Para el análisis de la expresión de las proteínas E-CADHERINA, ALBÚMINA y CK19 mediante inmunocitoquímica, se sembraron 725.000 células en platos de 60 mm que contenían varios cubreobjetos circulares de vidrio recubiertos con colágeno tipo I en medio de cultivo completo. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS y se siguieron los siguientes protocolos para analizar diferentes proteínas.

6.3.1 Análisis de ALBÚMINA

Las células se fijaron con metanol frío (-20°C) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon en PBS-2% BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con PBS-1% BSA y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 16) en PBS-1% BSA en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos cada lavado) y se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 16) en PBS-1% BSA en una cámara húmeda durante 1 hora a 37°C. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos cada lavado), se montaron con un medio de montaje que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Slowfade gold antifade Mountant, Invitrogen), y, una vez secados al aire y en oscuridad, se sellaron.

6.3.2 Análisis de CK19

Las células se fijaron con etanol al 95% a -20°C durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron 2 veces con TBS y se procedió al bloqueo con TBS-0,3%Triton X-100-5% suero de cabra durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con TBS y se incubaron con el anticuerpo primario (Tabla 16) en solución de bloqueo en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. En un siguiente paso, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con TBS (10 minutos cada lavado) y se incubaron con el anticuerpo

secundario (**Tabla 16**) en PBS-0,1% BSA en una cámara húmeda durante 1 hora a 37°C. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con TBS (10 minutos cada lavado) y se montaron como se ha explicado anteriormente.

Anticuerpo primario	Casa comercial	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
ALBÚMINA (RaRa/Alb/PO)	Nordic Immunology	1:50	Anti Conejo-AlexaFluor 594	1:200
CK19 (TROMA III)	Hybridoma Bank	1:50	Anti Rata-FITC	1:200

Tabla 16. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para el análisis de la expresión de proteínas mediante inmunocitoquímica.

En todos los casos las preparaciones se visualizaron en un microscopio láser confocal Olympus FV1200 del Servicio de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM.

6.4 Análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y tinción Sirius Red en tejidos hepáticos

6.4.1 Tinción inmunohistoquímica de CK19 a partir de cortes histológicos embebidos en parafina

Para la tinción inmunohistoquímica de CK19 a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina, en primer lugar se llevó a cabo la desparafinación del tejido en una estufa a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se hidrató el tejido mediante inmersión en soluciones con concentraciones decrecientes de etanol a temperatura ambiente, tal y como se indica en la **Tabla 17**.

Paso	Tiempo
Xileno	15 minutos
Etanol 100%	5 minutos
Etanol 100%	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 80%	5 minutos
Agua destilada	5 minutos

Tabla 17. Pasos de hidratación para la inmunohistoquímica.

A continuación, las muestras se sumergieron en un tampón citrato 10 mM (pH 6) y se hirvieron durante 15 minutos. Este paso rompe los puentes de metileno y expone los determinantes antigénicos para permitir la unión de los

anticuerpos. Seguidamente, las muestras se dejaron sumergidas en el tampón durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se permeabilizaron con PBS-1%Triton X-100 durante 5 minutos y se lavaron en PBS-0,1%Tritón X-100 durante 5 minutos. En este punto, se procedió a inactivar la peroxidasa endógena, con el fin de minimizar el fondo, mediante la incubación de los tejidos en PBS-3% H_2O_2 durante 15 minutos a temperatura ambiente, y posterior lavado en PBS-0,1%Tritón X-100 durante 10 minutos. El bloqueo se realizó en PBS-0,1%Tritón X-100 suplementado con 6% de suero de cabra y 3%BSA en una cámara húmeda durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario específico para CK19 (Hybridoma Bank) diluido 1:2 en solución de bloqueo en una cámara húmeda primero durante 2 horas a 37°C y seguidamente durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se lavaron las muestras en PBS-0,1%Tritón X-100 durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora y media con el anticuerpo secundario anti-rata acoplado a la peroxidasa (Invitrogen, 31471) diluido 1:30 en solución de bloqueo en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego las muestras se lavaron 3 veces en PBS durante 5 minutos. La tinción de la peroxidasa fue revelada utilizando diaminobencidina (DAB) diluida (SK-4100 Vector Laboratories) hasta la obtención de una señal adecuada que no estuviese saturada. La reacción se detuvo sumergiendo las muestras en agua durante 5 minutos. A continuación, se lavaron con PBS durante 5 minutos y con agua destilada durante 5 minutos. Los últimos pasos consistieron en una contratinción con Hematoxilina de Carazzi (PanReac), siguiendo con la deshidratación de los tejidos tal y como se indica en la [Tabla 18](#), y montando las muestras con D.P.X (VWR Chemicals) para su preservación.

Paso	Tiempo
Agua destilada	5 minutos
Etanol 80%	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 100%	5 minutos
Etanol 100%	5 minutos
Xileno	15 minutos

Tabla 18. Pasos de deshidratación para la inmunohistoquímica.

Las preparaciones fueron visualizadas en un microscopio Eclipse TE300, Nikon acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-U2 con un objetivo 20X. El número de estructuras ductales maduras, en las que se observaba claramente el lumen, como el número de estructuras ductales inmaduras, que engloban tanto las agrupaciones de células CK19+ que no forman estructuras ductales bien

definidas y células CK19+ aisladas, fueron analizadas utilizando el software ImageJ en al menos 10 campos por muestra.

6.4.2 Detección de células Ki67/CK19 dobles positivas mediante inmunofluorescencia a partir de cortes histológicos embebidos en parafina

Ki67 se considera un marcador adecuado para analizar la fracción proliferativa de una población celular, ya que es posible detectarla durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y mitosis) y está ausente en las células en estado quiescente (G0) (Scholzen & Gerdes, 2000). Para la tinción por inmunofluorescencia de células Ki67/CK19 dobles positivas a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el apartado 6.4.1 hasta la incubación de los anticuerpos primarios. En este caso los tejidos se incubaron con los anticuerpos primarios frente a CK19 (Hybridoma Bank), diluido 1:2 en solución de bloqueo, y frente a Ki67 (Abcam, ab15580), diluido 1:25 en solución de bloqueo, en una cámara húmeda primero durante 2 horas a 37°C y seguidamente durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se lavaron las muestras en PBS-0,1%Tritón X-100 durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora y media con los anticuerpos secundarios anti-rata FITC (Invitrogen, 31629) y anti conejo-AlexaFluor 594 (Invitrogen, A11012), ambos diluidos 1:30 en solución de bloqueo en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Además, también se añadió DAPI (PanReac) diluido 1:1000 en solución de bloqueo para la visualización de los núcleos. Luego se lavaron las muestras primero en PBS y posteriormente en agua destilada (5 minutos cada lavado) y finalmente se montaron utilizando Mowiol (Sigma-Aldrich).

Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse TE300, Nikon) con un objetivo 20X. El número de células ductales Ki67+/CK19+ y de células parenquimáticas Ki67+ fueron analizadas utilizando el software ImageJ en al menos 8 campos por muestra.

6.4.3 Detección de fibras de colágeno tipo I y III mediante la tinción Sirius Red a partir de cortes histológicos embebidos en parafina

Para la detección de fibras de colágeno tipo I y III mediante la tinción Sirius Red a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina en primer lugar se llevó a cabo la desparafinación del tejido en una estufa a 58°C durante 2 horas. Posteriormente, se hidrató el tejido mediante inmersión en soluciones

con concentraciones decrecientes de etanol a temperatura ambiente, tal y como se indica en la **Tabla 19**.

Paso	Tiempo
Xileno	10 minutos
Xileno	10 minutos
Etanol 100%	10 minutos
Etanol 100%	10 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol 70%	5 minutos
Agua destilada	2 minutos
Agua destilada	2 minutos

Tabla 19. Pasos de hidratación para la tinción Sirius Red.

A continuación, se incubaron las muestras durante 1 hora en una solución de Sirius Red (o Direct Red 80) saturada de ácido pícrico (0,5 g Direct Red 80/500 ml de ácido pícrico (Sigma-Aldrich)) para llevar a cabo la tinción de las fibras de colágeno. Posteriormente, se lavaron las muestras (2 lavados de 10 minutos) en agua acidificada (5 ml de ácido acético glacial (PanReac) en 1000 ml de agua destilada). Finalmente, se llevó a cabo la deshidratación de los tejidos tal y como se indica en la **Tabla 20**, y se montaron las muestras con D.P.X (VWR Chemicals) para su preservación.

Paso	Tiempo
Agua destilada	3-5 segundos
Agua destilada	3-5 segundos
Etanol 70%	3-5 segundos
Etanol 96%	3-5 segundos
Etanol 96%	3-5 segundos
Etanol 100%	3-5 segundos
Etanol 100%	3-5 segundos
Xileno	10 minutos
Xileno	10 minutos

Tabla 20. Pasos de deshidratación para la tinción Sirius Red.

Para cada animal se tomaron imágenes de al menos 10 campos al azar utilizando un microscopio Eclipse TE300, Nikon acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS-U2 con un aumento 10X. Se midió la fibrosis y el área total de cada imagen y se calculó el porcentaje de área fibrótica utilizando el software ImageJ. Los datos se expresan como % medio del área fibrótica (área teñida con Sirius Red).

7. Análisis de la viabilidad y proliferación celular

7.1 Contaje celular

En el caso del análisis de la respuesta al tratamiento con factores, las células se sembraron por triplicado en placas de 12 pocillos en medio completo en un rango de distintas densidades (15.000-80.000 células), según el tipo de experimento y tratamiento utilizado en cada caso. Al día siguiente se privaron de suero (2-3 horas) y se añadieron los diferentes factores de crecimiento, para realizar el contaje a diferentes tiempos. Para ello, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, se tiñeron con azul de tripano (Lonza) y se realizó un contaje celular mediante una cámara de Neubauer.

Para la curva de crecimiento en presencia de suero, se sembraron 20.000 células por triplicado en placas de 12 pocillos en medio completo. El medio fue reemplazado 2 veces por semana y las células se contaron diariamente durante 5 días consecutivos usando una tinción con azul de tripano y una cámara de Neubauer.

7.2 Tinción con cristal violeta

Este método permite la cuantificación de las células que permanecen adheridas a la placa, por ello es útil para cuantificar proliferación y muerte celular, en este último caso sólo cuando el proceso de toxicidad implica la pérdida de adhesión. Se sembraron 275.000 células en placas de 6 pocillos y, tras los diversos tratamientos, se lavaron 2 veces con PBS e incubaron durante 30 minutos con la solución colorante y fijadora (cristal violeta 0,2% p/v (Sigma-Aldrich) en 2% etanol) a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el exceso de colorante mediante lavado con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Las células teñidas se resuspendieron con una solución de SDS al 1% durante 20-25 minutos para solubilizar las células y liberar el colorante. Finalmente, la cuantificación se realizó espectrofotométricamente, midiéndose la absorbancia a 560 nm.

7.3 Ensayo de MTT

Este método se trata de un ensayo de viabilidad celular colorimétrico basado en la reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), una sal de tetrazolio amarilla, por distintas enzimas deshidrogenasas mitocondriales en la célula metabólicamente activa. Se origina un compuesto hidrofóbico denominado formazán, de color azul violeta, cuya absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de células viables (**Mosmann, 1983; Denizot & Lang, 1986**). Se sembraron 12.500 células en placas

de 96 pocillos y, tras los diversos tratamientos, se añadió el reactivo MTT (Promega), 20 µl por pocillo en un volumen de 100 µl de medio de cultivo, y se incubó la placa durante 1-2 horas a 37°C. Finalmente, se midió espectrofotométricamente la absorbancia a las longitudes de onda correspondientes al reactivo (620 nm) y al producto (492 nm) de la reacción de reducción producida. El porcentaje de viabilidad se obtuvo a partir de la diferencia de las absorbancias de producto y reactivo para cada pocillo, referenciada al valor obtenido para la muestra control.

8. Análisis de la apoptosis por tinción con yoduro de propidio (PI)

Se sembraron 250.000 células en platos de 35 mm en medio completo. Tras los diferentes tratamientos, se lavaron 2 veces con PBS frío y se fijaron con una mezcla de metanol:acético (3:1) a -20°C durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se tiñeron durante 30 minutos a 37°C con una solución de tinción preparada en PBS (**Tabla 21**). A continuación, se lavaron de nuevo las células con PBS y sobre el fondo de la placa de cultivo se montó un cubreobjetos utilizando Mowiol.

Compuesto	Concentración final
PI (Sigma-Aldrich P-4170)	5 µg/ml
Triton X-100	0,1%
EDTA	0,1 M
RNAasa (Sigma-Aldrich)	25 U/ml

Tabla 21. Composición de la solución de tinción de yoduro de propidio.

Las células apoptóticas fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse TE300, Nikon) con un objetivo 60X, según criterios morfológicos estándar. Se analizaron al menos 15 campos por plato de manera ciega.

9. Estudio estadístico

Los resultados se han expresado como la media aritmética de valores de entre 2-8 experimentos independientes *in vitro* o 2-11 animales por condición y su error estándar de la media (S.E.M). Cuando sólo se ha mostrado un experimento, los datos se han representado como el valor medio ± desviación estándar (S.D). Se comprobó la normalidad de los datos con la prueba de Saphiro-Wilk. Cuando los datos mostraron una distribución normal, se utilizó la prueba t de Student desapareada paramétrica para la comparación de 2 grupos experimentales independientes, y el análisis de la varianza (ANOVA) seguido de



la prueba de comparación múltiple de Bonferroni para la comparación de más de 2 grupos. Cuando los datos no mostraron una distribución normal y en variables ordinales, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para la comparación de 2 grupos experimentales independientes, seguida de la corrección de Monte Carlo, y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar más de 2 grupos experimentales, seguida de una prueba de comparación múltiple de Benjamini, Krieger y Yekutieli. Para todos los análisis, los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos y se indicaron en cada figura. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7.

8. RESULTADOS

1. La expresión de un EGFR sin actividad catalítica en hepatocitos conduce a una mayor expansión de HPC/células ovals en un modelo de enfermedad hepática colestásica

Aunque, como ya se ha mencionado en la introducción, la importancia de la señalización del EGFR en la regeneración hepática tras PH, y especialmente en la respuesta proliferativa de los hepatocitos, ha quedado demostrada en modelos *in vivo* de delección o inactivación del receptor (Natarajan et al., 2007; Paranjpe et al., 2010; López-Luque et al., 2016), su papel en las enfermedades hepáticas colestásicas no está claro. Existen estudios que apoyan un papel protector de la vía, o al menos de algunos de sus ligandos, en modelos experimentales de daño colestásico (Takemura et al., 2013; Svinka et al., 2017; Santamaría et al., 2019), mientras que otros apoyarían su contribución al desarrollo de la fibrosis y el daño colestásico (Fuchs et al., 2014; Xu et al., 2020).

Es importante destacar que apenas hay estudios previos sobre el efecto de la inhibición de la vía del EGFR en la activación, expansión y/o destino de HPC/células ovals en modelos de daño hepático. Dado que estas células juegan un papel en el contexto de la enfermedad hepática crónica, como es el caso de las enfermedades hepáticas colestásicas (Itoh, 2016; Chen et al., 2017), que puede ser determinante para la progresión de la enfermedad, decidimos abordar este estudio.

1.1 La vía de señalización del EGFR está disminuida en el daño hepático inducido por la dieta DDC

Se usó el modelo de ratón transgénico de pérdida de función de EGFR (Δ EGFR, descrito en la sección 1.2 de materiales y métodos), y ratones WT, y se indujo en ellos un daño hepático colestásico crónico. Para ello se realizó un tratamiento dietético a distintos tiempos (1, 2, 4 y 6 semanas) con una dieta que contiene un 0,1% de la hepatotoxina porfirinogénica DDC, un modelo que imita la PSC en humanos y que está asociado a la activación y expansión de las HPC/células ovals (Preisegger et al., 1999; Fickert et al., 2007).

Trabajos previos han demostrado un incremento en los niveles de expresión de diferentes ligandos del EGFR en modelos experimentales de daño hepático (Webber et al., 1993; Kiso et al., 1995; Berasain et al., 2005). Además, hemos encontrado un conjunto de datos públicos (GSE61256) que incluye muestras de hígado de sujetos con PSC y PBC, los dos tipos principales de enfermedad hepática colestásica crónica en humanos, observando también un incremento en los niveles de expresión de algunos de los ligandos del EGFR, lo

cual sugiere una implicación de la vía del EGFR en el daño hepático. Teniendo estos resultados como punto de partida, en primer lugar, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión génica del *EGFR* endógeno en ratones WT y Δ EGFR sometidos a la dieta DDC. Este análisis reveló un patrón de expresión análogo en ambos casos observándose una disminución significativa de los niveles de mRNA a 2 semanas de tratamiento (**Figura 19**), tiempo al que se observa un pico de expansión de las HPC/células ovas, como se verá más adelante.

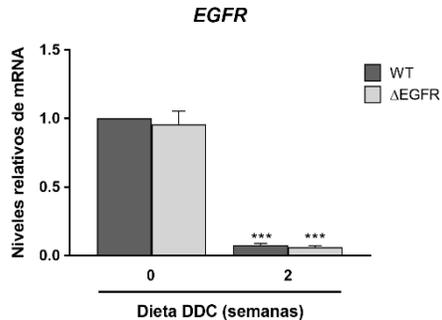
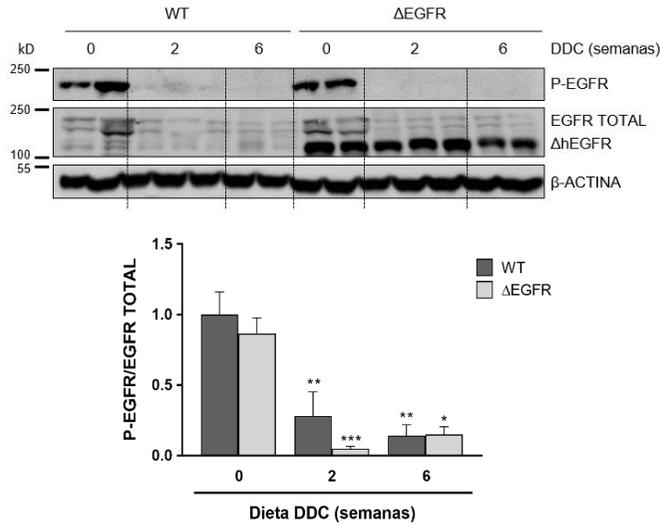


Figura 19. Análisis de los niveles de expresión génica del *EGFR* endógeno en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Niveles de mRNA de *EGFR* endógeno en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 semanas con la dieta DDC, analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=5-7 animales por condición. *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado.

En paralelo, estudiamos la activación del EGFR mediante la detección de las formas fosforilada y total del receptor por western blot en extractos totales de proteína hepática obtenidos de los ratones WT y Δ EGFR. Los resultados mostraron una notable disminución tanto de la forma fosforilada como de la forma total del EGFR tras el tratamiento (**Figura 20A**). En la **Figura 20B** se muestra un western blot más detallado de los niveles de EGFR a 1, 2, 4, y 6 semanas de tratamiento, donde se observa su disminución a todos los tiempos estudiados.

A)



B)

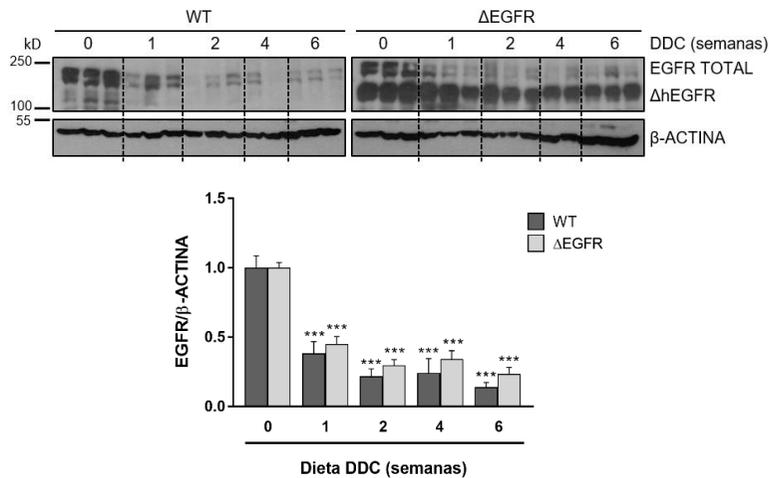


Figura 20. Análisis de la vía de señalización del EGFR en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. **A)** Western blots correspondientes a las formas fosforilada (P-EGFR) y total del EGFR en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Se utilizó EGFR TOTAL como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a $n=4-6$ animales por condición (panel inferior). Los datos representan la media \pm S.E.M y se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$ respecto al grupo no tratado. **B)** Western blots correspondientes a la forma total del EGFR en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 1, 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC. Se utilizó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a $n=3-9$ animales por condición (panel inferior). Los datos representan la media \pm S.E.M y se expresan respecto a los ratones no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). *** = $p<0.001$ respecto al grupo no tratado.

Los datos obtenidos sugieren una regulación negativa de la vía durante el daño inducido por DDC. Sin embargo, a 2 semanas de tratamiento se observó una inducción de los niveles de mRNA de *HB-EGF* y *AR*, dos ligandos del EGFR expresados por las células hepáticas, posiblemente en un intento de activar la vía. En el caso del ligando *TGF- α* no se encontraron diferencias por el tratamiento (**Figura 21**). Todos los ligandos analizados muestran un patrón similar de expresión en ratones WT y Δ EGFR.

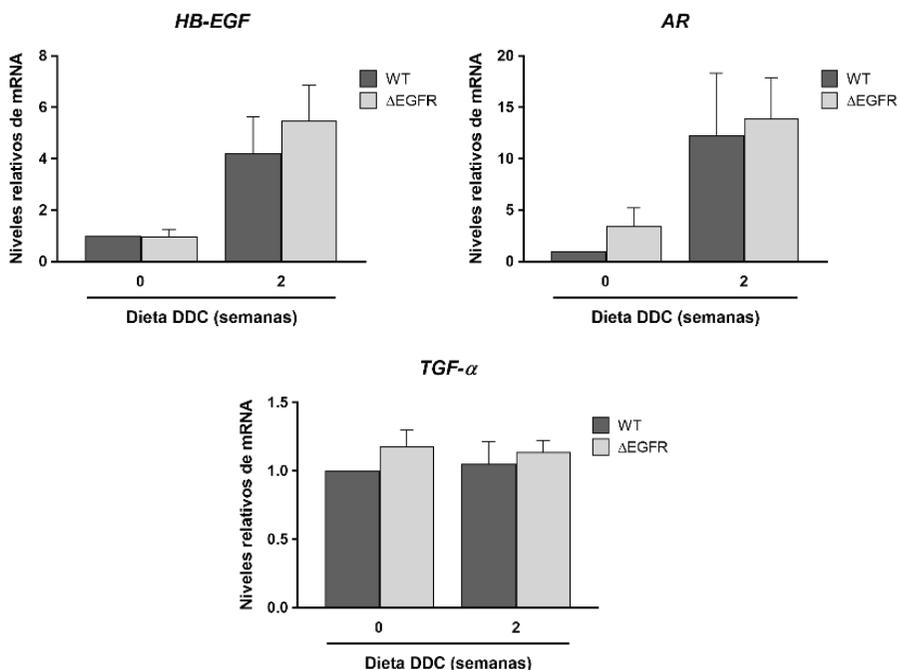


Figura 21. Análisis de la expresión de los ligandos del EGFR en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Niveles de mRNA de *HB-EGF*, *AR* y *TGF- α* en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 semanas con la dieta DDC, analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=3-7 animales por condición.

El significado de esta disminución de la vía de señalización del EGFR no está claro. Una posibilidad podría ser que dicha disminución fuese necesaria para permitir el proceso regenerativo del hígado, o por el contrario, fuese una consecuencia del daño hepático e impida una regeneración eficiente. Para tratar de entender el papel del EGFR en el daño colestásico crónico analizamos en profundidad las consecuencias de inactivar el EGFR durante el daño hepático inducido por la dieta DDC.

1.2 La inactivación del EGFR en hepatocitos aminora el daño hepático inducido por la dieta DDC

Para evaluar el grado de daño hepático de los ratones WT y Δ EGFR tras la dieta DDC se midieron los niveles de algunos de los marcadores séricos de daño hepático más utilizados, como AST, ALT, ALP y bilirrubina total (**Figura 22**). Todos ellos mostraron un incremento en respuesta al tratamiento. Aunque la cinética no es idéntica, de forma general todos ellos muestran un pico seguido de una disminución a los tiempos más largos, lo que podría estar relacionado con la activación de una respuesta regenerativa en el hígado, mediada por las HPC/células ovas, que contribuye a restaurar la funcionalidad hepática. Los ratones Δ EGFR muestran un perfil similar, pero claramente el incremento de estos parámetros fue menor, en especial ALP y bilirrubina total, encontrándose diferencias significativas con respecto a los ratones WT a 4 y 6 semanas de tratamiento respectivamente. Particularmente llamativos son los valores de bilirrubina total, que volvieron a la normalidad en los ratones Δ EGFR, mientras que en los ratones WT seguían aún muy elevados. Estos datos proporcionan una evidencia clara de que el daño hepático está atenuado en los ratones Δ EGFR.

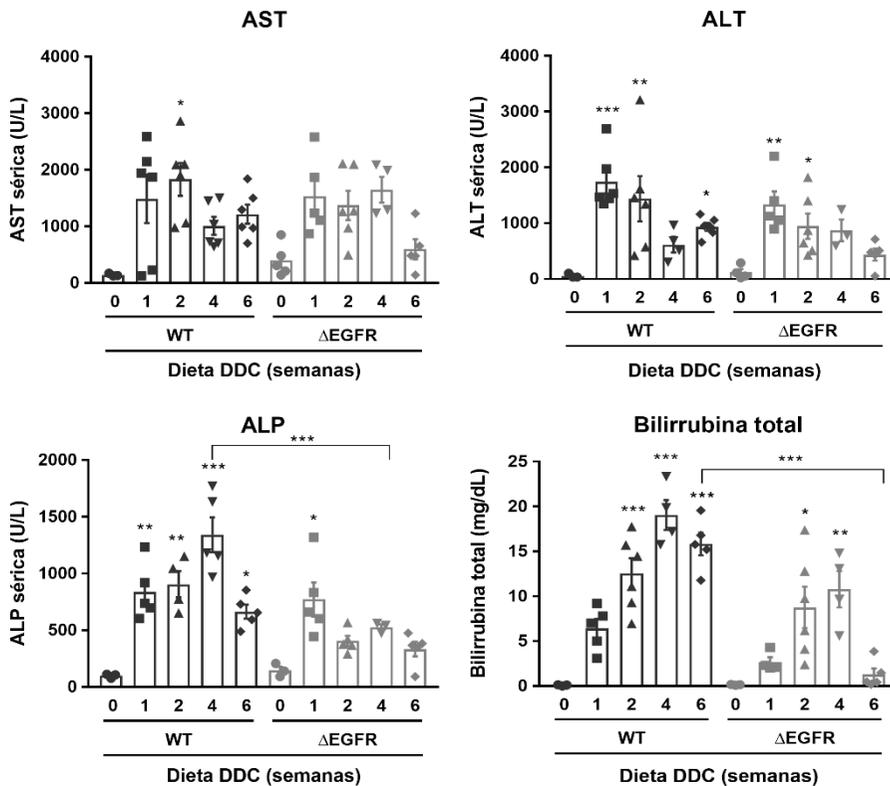
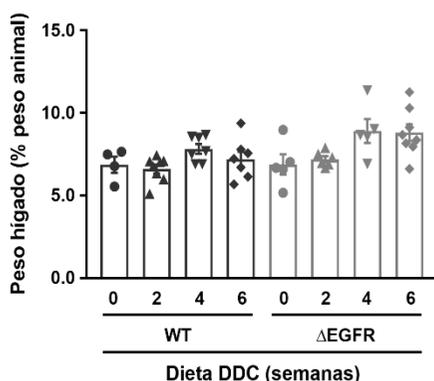


Figura 22. Análisis de los marcadores séricos de daño hepático en ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Niveles séricos de AST, ALT, ALP y bilirrubina total en ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 1, 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC. Los datos representan la media \pm S.E.M, n=3-6 animales por condición. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado o como se indica.

En paralelo, se analizó la relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo, otro parámetro muy utilizado para evaluar el grado de daño hepático (Best et al., 2013), y que permite predecir una mejor o peor respuesta regenerativa. Los resultados mostraron un aumento progresivo en la relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo con el tiempo de tratamiento en ambos casos, siendo los animales Δ EGFR los que mayor aumento presentaron, fundamentalmente a tiempos largos (Figura 23A). De hecho, estos resultados se observan mejor al analizar de forma independiente los pesos relativos de los animales y de los hígados con el tratamiento (Figura 23B). Los animales Δ EGFR pierden menos peso corporal, y además los hígados ganan más peso, observándose un punto de inflexión (cambio de pérdida de peso a ganancia) tras 2 semanas de tratamiento, fenómeno que no está claro en los animales WT. Estos resultados son consistentes con una mejor o mayor respuesta regenerativa inducida tras el daño en los animales Δ EGFR.

A)



B)

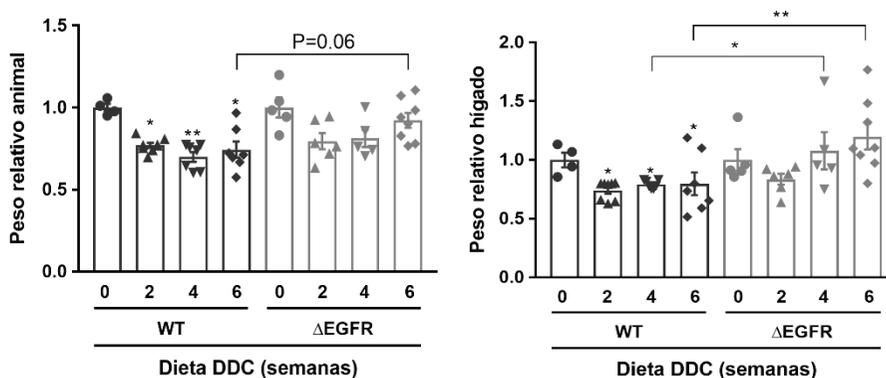


Figura 23. Análisis del peso del hígado y peso corporal y la relación entre ambos en ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. A) Relación entre el peso del hígado y el peso corporal de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC. Los datos representan la media \pm S.E.M, n=4-8 animales por condición. **B)** Pesos relativos de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC (panel izquierdo), así como de sus hígados (panel derecho) en el momento del sacrificio. Los datos se expresan respecto a los ratones no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=4-8 animales por condición. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ respecto al grupo no tratado o como se indica.

Dado que hay evidencias sobre la intervención del EGFR en la enfermedad hepática crónica y en particular, en el desarrollo de fibrosis hepática (Perugorria et al., 2008; McKee et al., 2015), a continuación, analizamos el grado de fibrosis en nuestro modelo de ratón después del tratamiento con la dieta DDC. Por una parte, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión de un panel de marcadores pro-fibróticos como son *TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *COL1A1*, *CTGF* y *ACTA-2* (Figura 24). Consistente con una inducción de daño fibrótico hepático, todos los marcadores analizados se incrementaron en los ratones WT después del tratamiento con la dieta DDC, mostrando un pico de inducción a las 4 semanas, a excepción del marcador *ACTA-2* en el que el pico

se observó a las 2 semanas. En los ratones Δ EGFR también se observó un incremento, pero fue menor, alcanzando niveles similares a los WT solo al tiempo más largo (6 semanas).

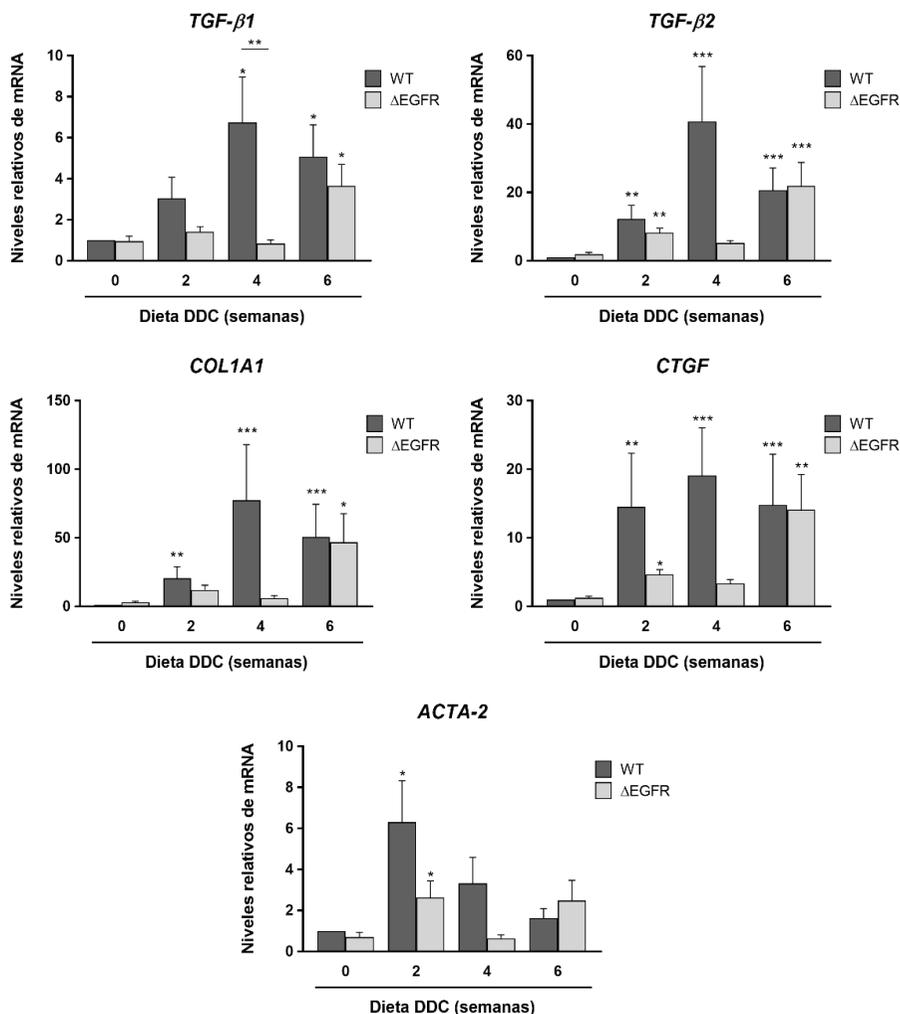


Figura 24. Análisis de la expresión de marcadores de fibrosis en hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a la dieta DDC. Niveles de mRNA de *TGF-β1*, *TGF-β2*, *COL1A1*, *CTGF* y *ACTA-2* en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC, analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=3-11 animales por condición. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 respecto al grupo no tratado o como se indica.

Como abordaje adicional realizamos una tinción con la solución de Sirius Red en los cortes histológicos hepáticos embebidos en parafina. Esta tinción es específica para la detección de fibras de colágeno de tipo I y tipo III presentes en

el parénquima hepático (**Figura 25**). El análisis de la tinción reveló una acumulación de colágeno restringido a las áreas portales en respuesta al tratamiento, fenómeno que es consistente con el proceso de fibrosis de tipo biliar inducido en este modelo de colangiopatía crónica (**Fickert et al., 2007**). El perfil es muy similar en hígados de ratones WT y Δ EGFR. Si bien los resultados muestran niveles absolutos de colágeno ligeramente superiores en los ratones Δ EGFR a 6 semanas de tratamiento, estos ratones muestran niveles de colágeno hepático algo superiores basalmente, de forma que si se calcula el incremento inducido por tratamiento respecto a la situación control el incremento es menor que en los ratones WT (a 2 semanas de tratamiento: $6,01 \pm 1,01$ versus $3,5 \pm 0,37$ veces de incremento en WT y Δ EGFR, respectivamente; a 6 semanas de tratamiento: $6,13 \pm 0,53$ versus $4,81 \pm 0,39$ veces de incremento en WT y Δ EGFR, respectivamente).

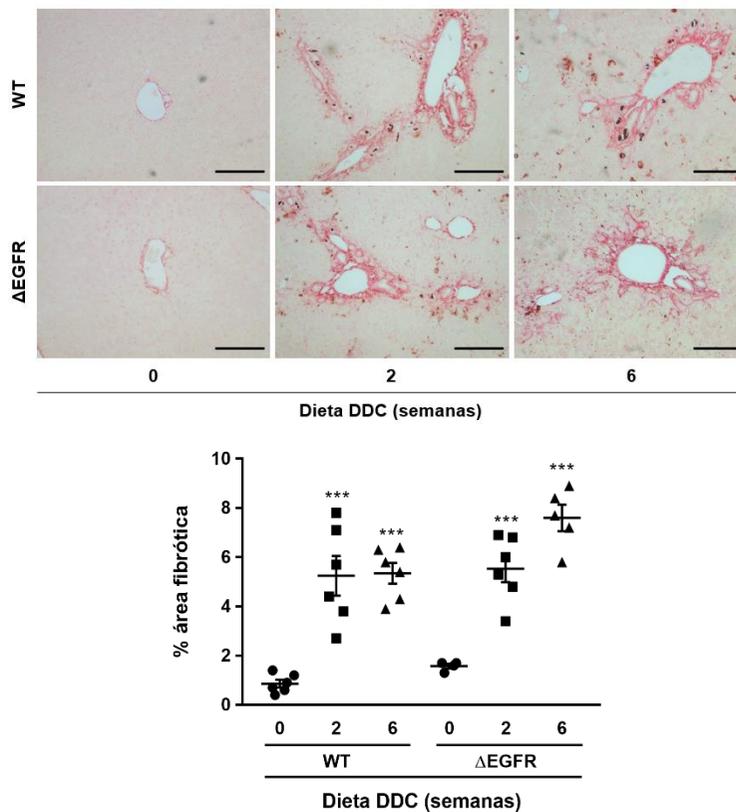


Figura 25. Análisis de los niveles de colágeno en hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Se muestran imágenes representativas de la tinción con Sirius Red en tejidos hepáticos de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC (panel superior). Barra de escala = 100 μ m. Se midió el área fibrótica (área teñida con Sirius Red), usando el software Image J, en 10 regiones periportales por animal, n=4-6 animales por condición (panel inferior). Los datos se expresan como % promedio del área fibrótica. *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado.

Para completar estos estudios, analizamos mediante western blot los niveles de la proteína CASPASA-3 activa, un mediador crucial en la apoptosis, como forma de medir el daño hepático en los animales WT y Δ EGFR. Los resultados mostraron en ambos casos un aumento en los niveles de CASPASA-3 activa con la dieta. No obstante, este incremento fue menor en los animales Δ EGFR, que partían de unos niveles basales superiores que los animales WT y a 6 semanas de tratamiento volvían a la normalidad, mientras que en los ratones WT seguían siendo elevados (a 2 semanas de tratamiento: $2,55 \pm 0,07$ versus $2,18 \pm 0,31$ veces de incremento en WT y Δ EGFR, respectivamente; a 6 semanas de tratamiento: $5,37 \pm 2,83$ versus $1,02 \pm 0,38$ veces de incremento en WT y Δ EGFR, respectivamente), lo cual sugiere un mayor daño hepático en estos animales a tiempos largos (**Figura 26**).

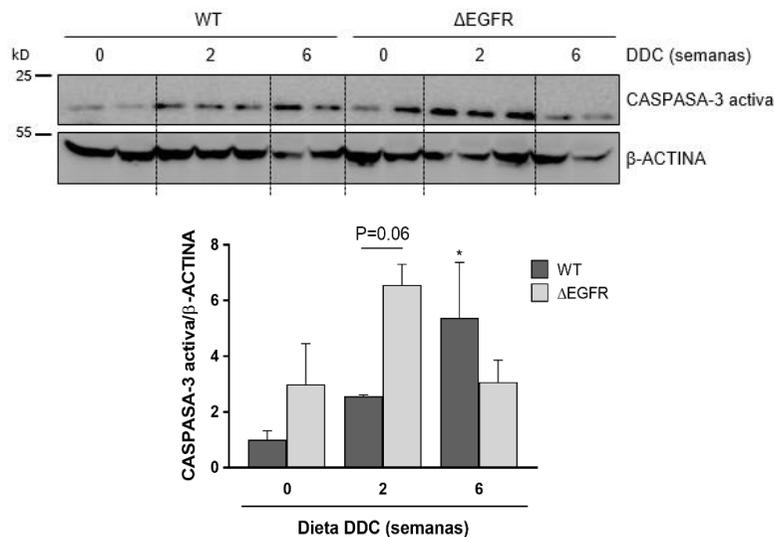


Figura 26. Análisis de la expresión de CASPASA-3 activa en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Western blots correspondientes a CASPASA-3 activa en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Se utilizó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a n=2-3 animales por condición (panel inferior). Los datos representan la media \pm S.E.M y se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). * = $p < 0.05$ respecto al grupo no tratado.

Finalmente, se analizó el índice proliferativo de las células en el parénquima hepático mediante una tinción por inmunofluorescencia con Ki67 a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina. Los resultados revelaron una mayor proliferación basal en los hepatocitos Δ EGFR que no aumenta significativamente por el tratamiento con la dieta DDC. Sin embargo, en los animales WT sí que se observó un aumento significativo de la proliferación de

hepatocitos a 6 semanas de tratamiento con respecto a los animales no tratados o tratados durante 2 semanas, sugiriendo una respuesta proliferativa compensatoria por parte de los hepatocitos para hacer frente al daño hepático (Figura 27).

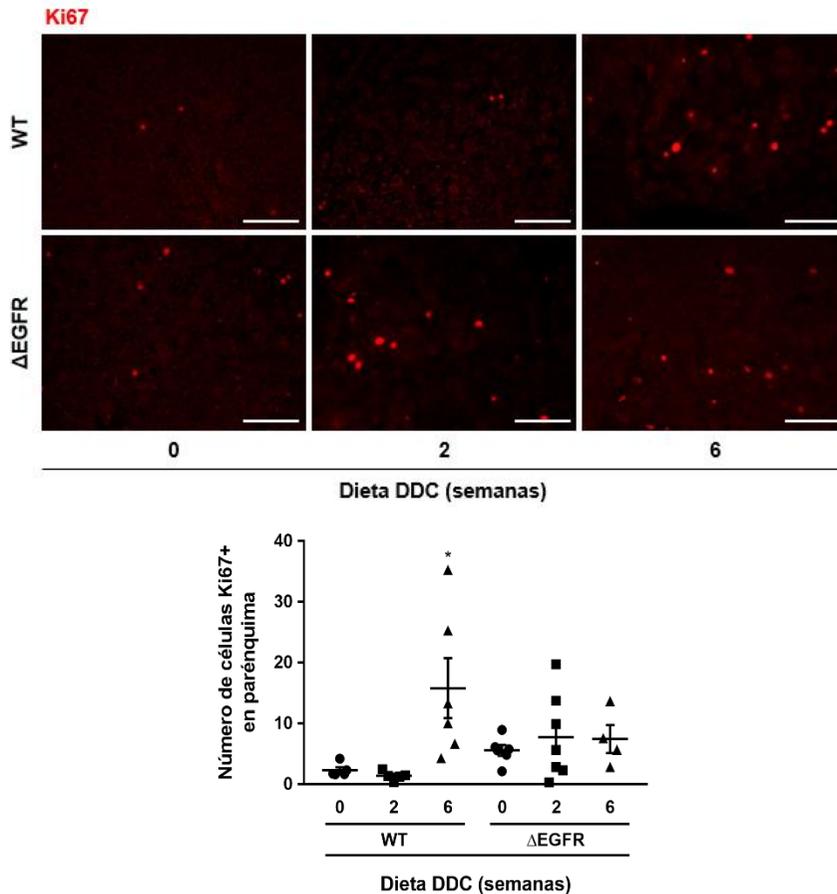


Figura 27. Análisis del índice proliferativo de las células en el parénquima hepático de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Imágenes representativas de la tinción por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico para Ki67 en tejidos hepáticos de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Barra de escala = 50 μ m (panel superior). Se realizó un conteo del número de células Ki67+ de 10 regiones parenquimáticas de cada animal. Los datos representan la media \pm S.E.M, n=4-7 animales por condición (panel inferior). * = p<0.05 respecto al grupo no tratado.

En conjunto, todos estos resultados sugerían que el daño inducido por la dieta DDC estaba de alguna manera aminorado o retrasado en los animales Δ EGFR en comparación con los animales WT.

1.3 Reacción ductular amplificada y aumento de marcadores de HPC/células ovals en respuesta a la dieta DDC en los hígados de los ratones Δ EGFR

Como ya se ha descrito anteriormente, el modelo de daño hepático inducido por la dieta DDC está asociado a la activación y expansión de HPC/células ovals y por ello es un modelo muy utilizado para estudiar los mecanismos que regulan dicho proceso (Yamazaki et al., 2011). Así, en un siguiente paso analizamos si la expresión en hígado de una forma mutante del EGFR que carece de actividad tirosina quinasa tenía algún efecto sobre este proceso.

El análisis histológico, en base a la tinción H&E, mostró, tanto en los hígados de los ratones WT como de los Δ EGFR tratados, la típica reacción ductular caracterizada por la expansión desde las regiones periportales de células pequeñas basofílicas que forman estructuras de tipo ductal (Figura 28A). Dicha reacción parecía ser mayor en los ratones Δ EGFR sobre todo a tiempos más largos (Figura 28A). No obstante, para confirmar la observación visual se llevó a cabo una cuantificación de la expansión de las HPC/células ovals midiendo las áreas relativas ocupadas por las mismas en las regiones periportales, tal y como se ha explicado en la sección 1.7 de materiales y métodos. El análisis cuantitativo demostró que la reacción ductular a tiempos tardíos está amplificadas en el caso de los animales Δ EGFR, siendo la diferencia entre ambos grupos estadísticamente significativa (Figura 28B).

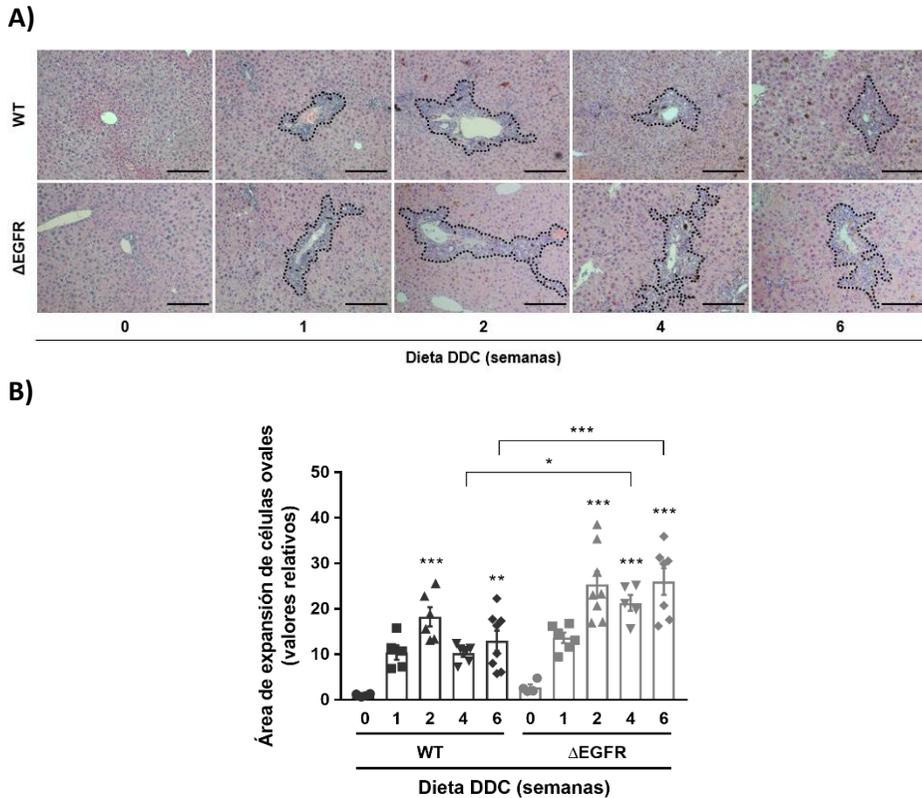


Figura 28. Análisis de la reacción ductular en hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. **A)** Imágenes representativas de la tinción H&E en los tejidos hepáticos de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 1, 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC. Barra de escala = 100 μ m. Las líneas punteadas delimitan los bordes del área de expansión de la reacción ductular. **B)** Se realizó un análisis morfométrico cuantitativo de dicha área de expansión utilizando el software ImageJ, a partir de 10 regiones portales por animal. Los datos representan la media \pm S.E.M del área, n=4-8 animales por condición. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado o como se indica.

Como abordaje adicional para reforzar las evidencias de una mayor reacción ductular y expansión de las HPC/células ovals en los ratones Δ EGFR, analizamos mediante RT-qPCR la expresión de algunos de los marcadores más utilizados para la identificación de dichas células, como son *EPCAM*, *KRT19* (*CK19*) y *PROM1* (*CD133*). Los resultados mostraron una inducción de la expresión de los marcadores tras el tratamiento con la dieta DDC en ambos modelos animales, lo que es consistente con la expansión de las HPC/células ovals, pero en el caso de los animales Δ EGFR la inducción fue mayor (**Figura 29**).

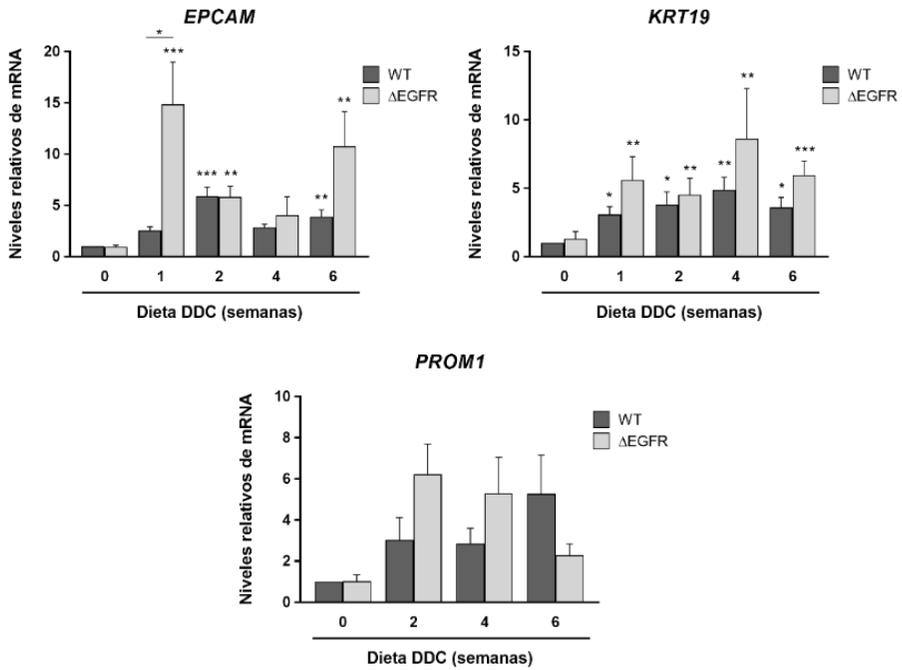


Figura 29. Análisis de la expresión de marcadores de HPC/células ovales en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Niveles de mRNA de *EPCAM*, *KRT19* y *PROM1* en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o sometidos durante diferentes periodos de tiempo a la dieta DDC (1, 2, 4 y 6 semanas), analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=3-9 animales por condición. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado o como se indica.

Estos datos se corroboraron a nivel de proteína mediante western blot, observándose unos niveles de EPCAM claramente mayores en los animales Δ EGFR (**Figura 30**).

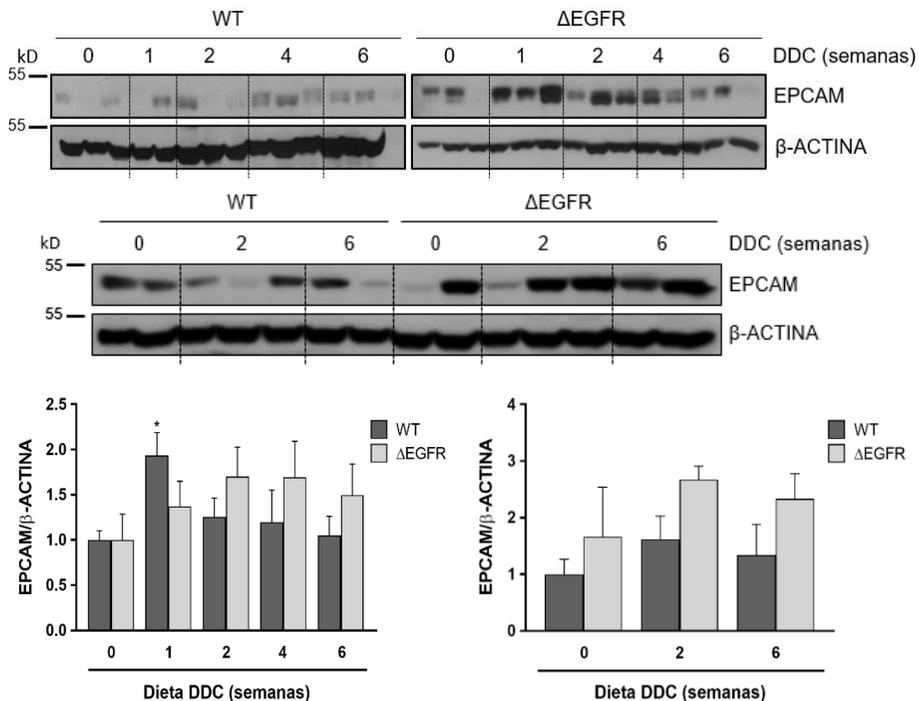


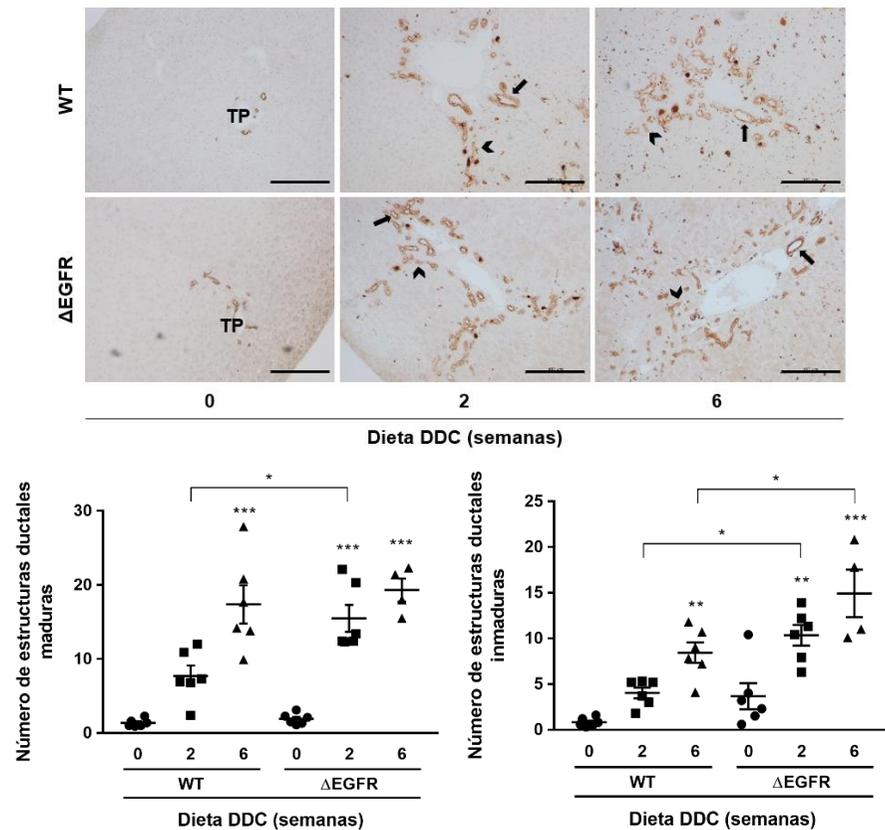
Figura 30. Análisis de la expresión del marcador EPCAM de HPC/células ovas en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Western blots correspondientes a EPCAM en hígados de los ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados con la dieta DDC. Se muestran tanto los análisis por separado de WT y Δ EGFR a todos los tiempos de tratamiento (1, 2, 4 y 6 semanas) como el análisis combinado a 2 y 6 semanas. Se utilizó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (paneles superiores) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a n=4-9 animales por condición (paneles inferiores). Los datos representan la media \pm S.E.M y se expresan respecto a los ratones no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) en el caso del análisis completo y respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) en el caso del análisis combinado. * = p<0.05 respecto al grupo no tratado.

Estos análisis se acompañaron de una tinción inmunohistoquímica para la detección de CK19. Las imágenes de la **Figura 31A** muestran claramente la presencia de células CK19+, tanto aisladas o en grupos, como formando estructuras de tipo ductal perfectamente definidas, en las áreas portales hepáticas. Con el fin de realizar un análisis más detallado que permitiera ver si había diferencias entre los animales WT y Δ EGFR se procedió a contar tanto el número de estructuras ductales maduras, en las que se observaba claramente el lumen, como el número de estructuras ductales inmaduras, que engloban las agrupaciones de células CK19+ que no forman estructuras ductales bien definidas, y células CK19+ aisladas. Los resultados del análisis cuantitativo realizado mostraron un número significativamente mayor de estructuras ductales, tanto maduras como inmaduras, por área portal, en los animales Δ EGFR con respecto a los WT (**Figura 31A**). Hay que destacar que la valoración



histopatológica realizada de forma independiente por el patólogo Dr. Julián Sanz a partir de los mismos cortes histológicos también determinó una mayor proliferación ductal, que fue estadísticamente significativa a 2 semanas de tratamiento, y que tuvo una tendencia a ser también mayor a 6 semanas de tratamiento, en los animales Δ EGFR en comparación con los animales WT (**Figura 31B**).

A)



B)

		Proliferación ductal			
		Puntuación	Normal (0-1)	Leve (2)	Moderado (3)
WT	No tratado	100%	-	-	-
	DDC 2 semanas (**)	-	88,9%	11,1%	-
	DDC 6 semanas	-	-	80%	20%
Δ EGFR	No tratado	100%	-	-	-
	DDC 2 semanas (**)	-	33,3%	33,3%	33,4%
	DDC 6 semanas	-	-	16,7%	83,3%

Figura 31. Análisis de la proliferación ductal en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. A) Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para CK19 en tejidos hepáticos de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Se muestran áreas portales (TP: tríada portal). Barra de escala = 100 μ m (panel superior). La flecha indica una estructura ductal madura y la cabeza de flecha una estructura ductal inmadura. Se realizó un conteo del número de estructuras ductales maduras e inmaduras en 10 regiones portales de cada animal. Los datos representan la media \pm S.E.M, n=4-6 animales por condición (panel inferior). * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 respecto al grupo no tratado o como se indica. **B)** Evaluación histopatológica del grado de proliferación ductal (puntuación cualitativa 0 a 4) en hígados de los ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Los datos se expresan como % de animales en cada puntuación, n=4-9 animales por condición. ** = p<0.01 respecto como se indica.

Finalmente, para completar estos estudios, se analizó el índice proliferativo de las células CK19+ mediante una doble tinción por inmunofluorescencia con Ki67 y CK19 a partir de los cortes histológicos embebidos en parafina. Los resultados revelaron una mayor proliferación de células ductales en los ratones Δ EGFR a 2 semanas de tratamiento, obteniéndose diferencias significativas con respecto a los animales WT, mientras que a 6 semanas de tratamiento no se observaron diferencias (Figura 32).

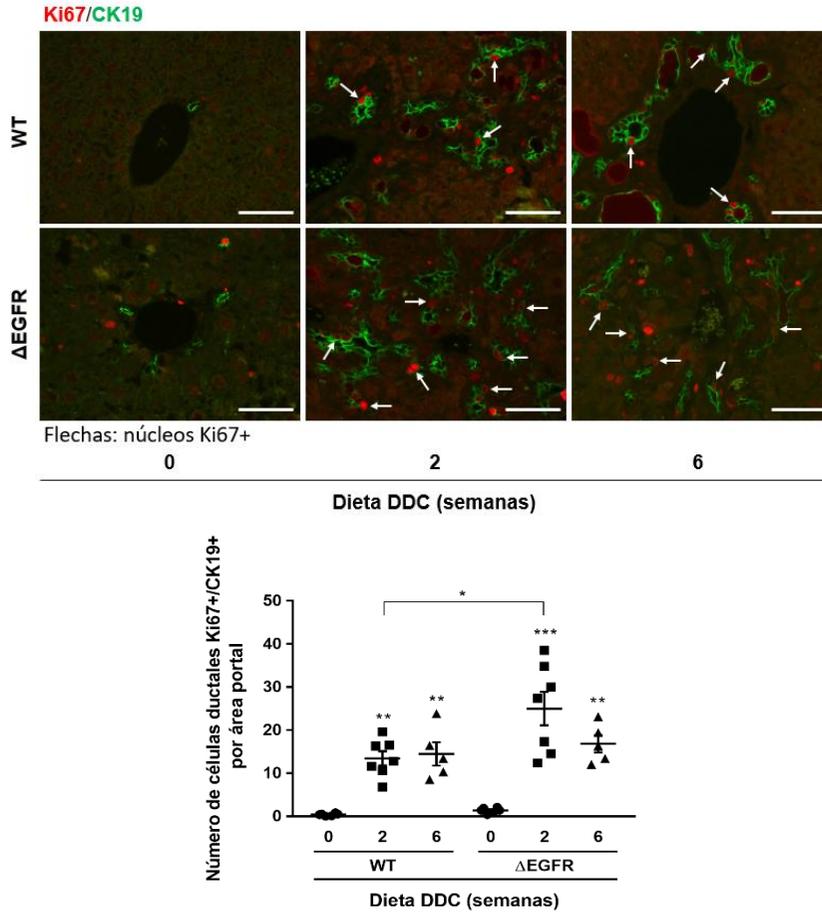


Figura 32. Análisis del índice proliferativo de las células CK19+ en hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Imágenes representativas de la tinción por inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para Ki67 y CK19 en tejidos hepáticos de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Barra de escala = 50 μ m (panel superior). Se realizó un conteo del número de células ductales Ki67+/CK19+ de 10 regiones portales de cada animal. Los datos representan la media \pm S.E.M, n=5-7 animales por condición (panel inferior). * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 respecto al grupo no tratado o como se indica.

Todos estos datos en conjunto sugieren que la expansión de las HPC/células ovals en los animales Δ EGFR es mayor tras el daño inducido por la dieta DDC.

1.4 Respuesta inflamatoria exacerbada en los hígados de los ratones Δ EGFR en respuesta a la dieta DDC

Existen diferentes evidencias que han demostrado que la proliferación de las HPC/células ovals *in vivo* e *in vitro* y la reacción ductular están asociadas a una reacción inflamatoria; y de hecho se ha visto que algunas citoquinas inflamatorias, como IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ , TWEAK inducen la proliferación de las HPC/células ovals (Knight et al., 2005b; Gadd et al., 2014; Guillot et al., 2018). Por otro lado, hay evidencias en la literatura que apuntan a un papel del EGFR en la regulación de la respuesta inflamatoria hepática en diferentes contextos fisiopatológicos (Berasain & Ávila, 2014; López-Luque et al., 2016). Apoyándonos en todos estos datos, y para profundizar en los mecanismos subyacentes en la respuesta amplificada de las HPC/células ovals en los ratones Δ EGFR, analizamos la respuesta inflamatoria en nuestro modelo.

Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis histológico de la inflamación portal y lobulillar en los ratones WT y Δ EGFR a partir de los cortes histológicos teñidos con H&E gracias a la ayuda del patólogo Dr. Julián Sanz. El análisis mostró una clara tendencia a una mayor inflamación portal en los ratones Δ EGFR a 2 semanas de tratamiento. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la inflamación lobulillar tras la dieta DDC, aunque basalmente los ratones Δ EGFR presentaban un cierto grado de inflamación (Figura 33).

Inflamación portal					
Puntuación		Normal (0-1)	Leve (2)	Moderado (3)	Intenso (4)
WT	No tratado	100%	-	-	-
	DDC 2 semanas	11,1%	66,7%	22,2%	-
	DDC 6 semanas	-	20%	80%	-
Δ EGFR	No tratado	100%	-	-	-
	DDC 2 semanas	-	44,4%	55,6%	-
	DDC 6 semanas	-	33,3%	66,7%	-

Inflamación lobulillar					
Puntuación		Normal (0-1)	Leve (2)	Moderado (3)	Intenso (4)
WT	No tratado	100%	-	-	-
	DDC 2 semanas	88,9%	11,1%	-	-
	DDC 6 semanas	20%	60%	20%	-
Δ EGFR	No tratado	60%	40%	-	-
	DDC 2 semanas	77,8%	22,2%	-	-
	DDC 6 semanas	16,7%	50%	33,3%	-

Figura 33. Análisis histopatológico de la inflamación portal y lobulillar en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Se muestra el porcentaje de ratones en cada uno de los grupos de puntuación (0 a 4), n=4-9 animales por condición.

Por otro lado, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión génica de un panel de citoquinas inflamatorias. Los resultados mostraron una mayor expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como *IL6*, *IL1B*, *IL12B*, *IL17*, *CXCL1* y *CCL2* en los ratones Δ EGFR tras la dieta DDC. No obstante, cabe destacar que el perfil de expresión de la citoquina proinflamatoria *TNF- α* fue diferente al resto, ya que se observó una menor expresión en los ratones Δ EGFR, apoyando la idea de que estos ratones presentan una respuesta inflamatoria modificada. Por otro lado, los resultados también mostraron una menor expresión de citoquinas antiinflamatorias como *IL4* (**Figura 34**), reforzando la idea de una respuesta inflamatoria alterada en estos ratones.

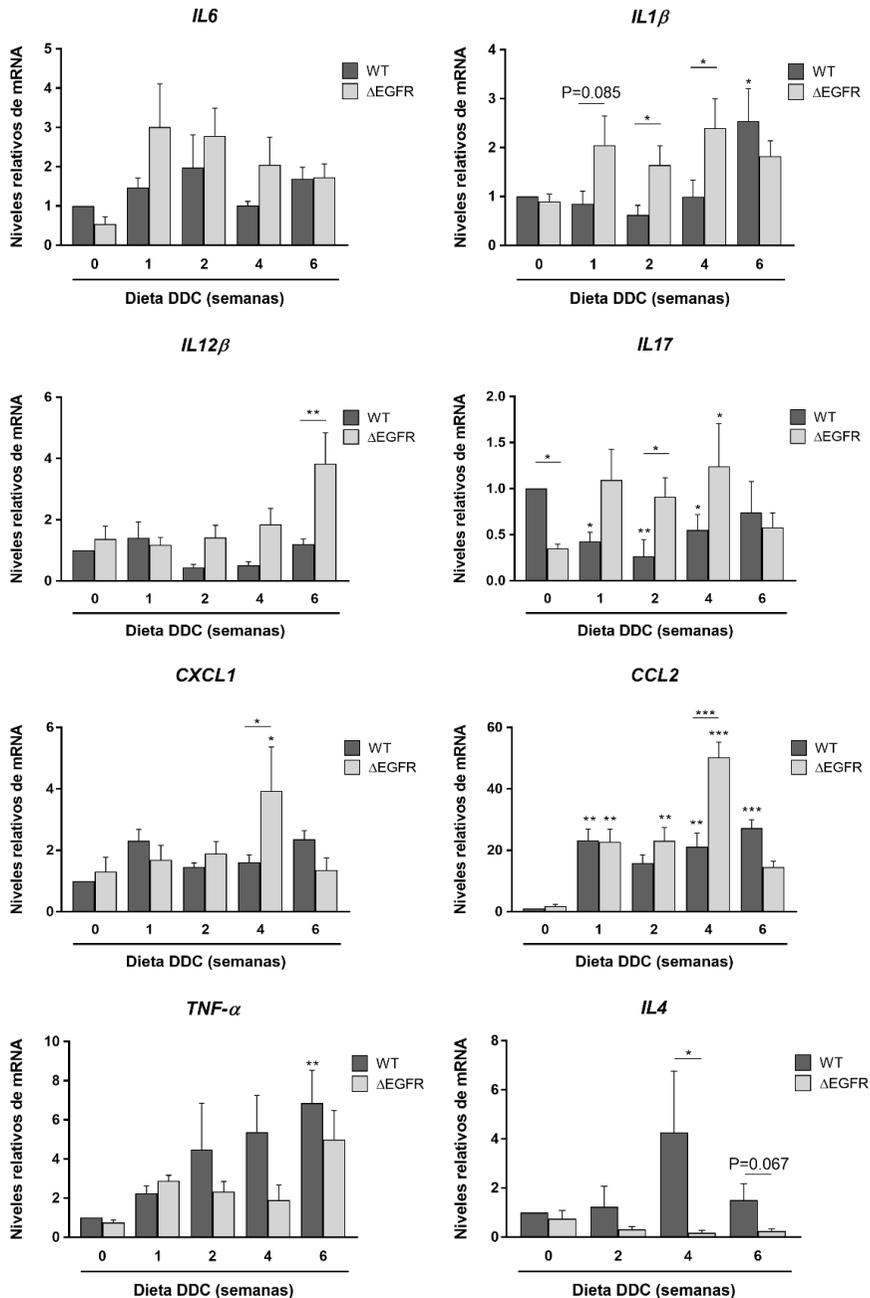


Figura 34. Análisis de la respuesta inflamatoria en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Niveles de mRNA de *IL6*, *IL1 β* , *IL12 β* , *IL17*, *CXCL1*, *CCL2*, *TNF- α* e *IL4* en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o sometidos durante diferentes periodos de tiempo a la dieta DDC (1, 2, 4 y 6 semanas), analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=3-10 animales por condición. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado o como se indica.

Finalmente, analizamos mediante western blot la activación de la vía de señalización de STAT3, como una forma de medir la señalización activada por las citoquinas. Observamos un aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 en los animales Δ EGFR en comparación con los animales WT en respuesta al daño hepático (Figura 35).

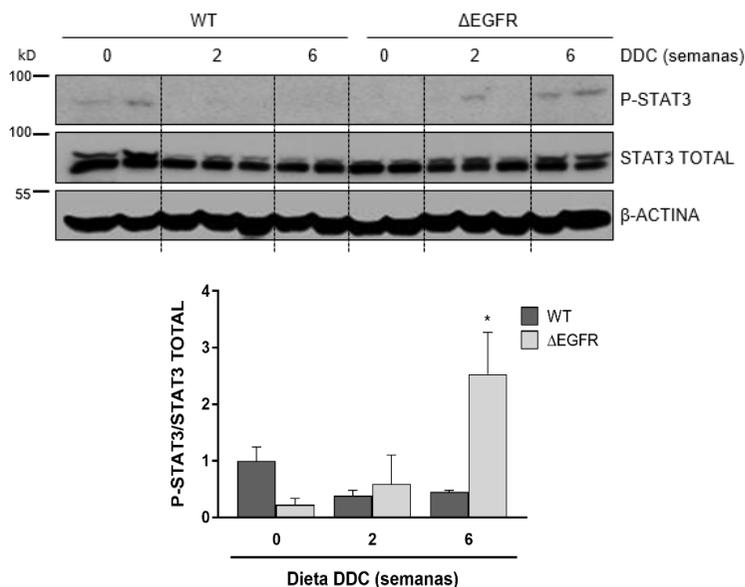


Figura 35. Análisis de la vía de señalización de STAT3 en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Western blots correspondientes a las formas fosforilada (P-STAT3) y total de STAT3 en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 2 y 6 semanas con la dieta DDC. Se utilizó STAT3 TOTAL como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a n=2-3 animales por condición (panel inferior). Los datos representan la media \pm S.E.M y se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). * = $p < 0.05$ respecto al grupo no tratado.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian una mayor respuesta inflamatoria hepática en los ratones Δ EGFR en comparación con los ratones WT tras el daño inducido por la dieta DDC. Esta mayor respuesta inflamatoria podría estar asociada a una expansión amplificada de las HPC/células ovales, lo cual apoyaría aún más la hipótesis de que las señales inflamatorias podrían contribuir a promover la expansión y proliferación de las HPC/células ovales.

1.5 Activación más potente de vías mitogénicas y de supervivencia en los hígados de los ratones Δ EGFR en respuesta a la dieta DDC

Diferentes estudios han demostrado el papel importante que juega la señalización de las vías de señalización de las ERK1/2-MAPK y de AKT en la

estimulación de la proliferación, supervivencia y movilidad celular tanto en los hepatocitos como en las HPC/células ovas y en consecuencia en la respuesta regenerativa hepática (Kitade et al., 2013; Morales-Ruiz et al., 2017). Por ello, para entender mejor los mecanismos implicados en la mejor respuesta regenerativa vía HPC/células ovas observada en los ratones Δ EGFR en respuesta al daño hepático inducido por la dieta DDC llevamos a cabo un análisis comparativo de la activación de estas dos vías de señalización en los hígados de los ratones WT y Δ EGFR. Los resultados mostraron una activación más intensa y/o sostenida de estas quinasas en los animales Δ EGFR tras la dieta DDC (Figura 36), sobre todo a tiempos tardíos, donde se observan diferencias significativas respecto a los animales WT. Estos resultados sugieren la implicación de estas quinasas en la expansión de las HPC/células ovas y la respuesta regenerativa potenciada en nuestro modelo.

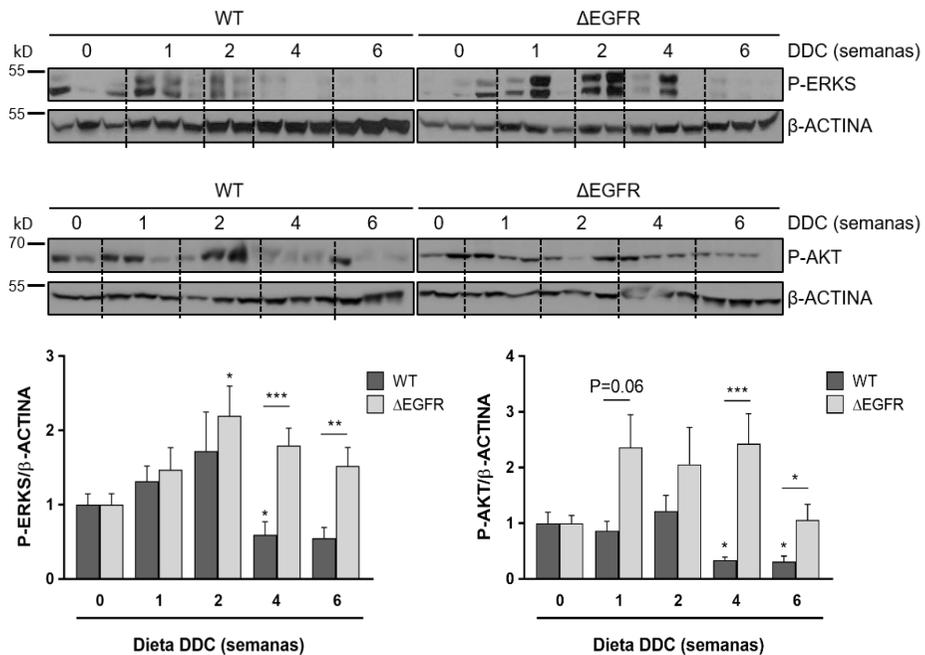


Figura 36. Análisis de la activación de vías mitogénicas y de supervivencia en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Western blots correspondientes a las formas fosforiladas de ERK1/2-MAPK (P-ERKS) y AKT (P-AKT) en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 1, 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC. Se utilizó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (paneles superiores) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a n=3-11 animales por condición (paneles inferiores). Los datos representan la media \pm S.E.M y se expresan respecto a los ratones no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto al grupo no tratado o como se indica.

La vía de señalización HGF/c-MET desempeña un papel fundamental en la regeneración hepática (Borowiak et al., 2004; Huh et al., 2004; Michalopoulos, 2010; Riehle et al., 2011), incluida la respuesta regenerativa mediada por las HPC/células ovas (Shiota et al., 2000; Ishikawa et al., 2012). De hecho, en el modelo DDC se ha demostrado que la ausencia de c-MET en el hígado de ratón se correlaciona con una reducción de la expansión, diferenciación y migración de la población de HPC/células ovas y la muerte de los animales (Ishikawa et al., 2012). Todo ello nos llevó a comprobar si la expansión amplificada observada en los ratones Δ EGFR tras la dieta DDC estaba asociada de alguna manera con la sobreactivación de la vía de HGF/c-MET, la cual induciría señales compensatorias y promovería la recuperación de la funcionalidad hepática. Para ello, analizamos los niveles de expresión génica tanto de *HGF* como de *c-MET* en respuesta al daño hepático inducido por la dieta DDC en los ratones WT y Δ EGFR (Figura 37). Se observó una mayor expresión hepática de *HGF* en los ratones Δ EGFR, tanto a 2 como a 4 semanas de tratamiento, en comparación con los ratones WT, coincidiendo con el aumento en la expansión de las HPC/células ovas. Aunque los niveles del receptor *c-MET* disminuyen con la dieta DDC, los ratones Δ EGFR también presentaban mayores niveles de expresión de *c-MET* a tiempos tardíos. A falta de resultados que demuestren la activación y señalización de c-MET, estos resultados sugieren que en los ratones Δ EGFR la activación de la vía de HGF/c-MET podría estar induciendo señales compensatorias que ayuden a revertir el daño hepático y recuperar la funcionalidad hepática.

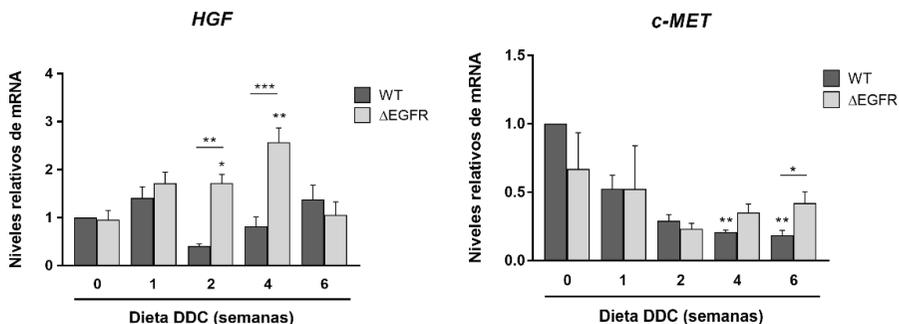


Figura 37. Análisis de la expresión de *HGF* y *c-MET* en los hígados de ratones WT y Δ EGFR sometidos a una dieta DDC. Niveles de mRNA de *HGF* y *c-MET* en hígados de ratones WT y Δ EGFR sin tratar o tratados durante 1, 2, 4 y 6 semanas con la dieta DDC, analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a los ratones WT no tratados (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=2-7 animales por condición. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 respecto al grupo no tratado o como se indica.

2. Estudio de la relevancia de la vía de señalización del EGFR en HPC/células ovasales usando un modelo *in vitro* de daño colestásico

Para complementar este estudio y con el fin de disponer de una herramienta adicional para analizar la relevancia de la vía de señalización del EGFR en la regulación de la función de las HPC/células ovasales, nuestro siguiente objetivo fue realizar estudios funcionales *in vitro* en un modelo que imita el daño hepático colestásico, para así esclarecer los mecanismos moleculares dependientes del EGFR implicados en la respuesta hepática al daño.

2.1 Establecimiento y validación de un modelo *in vitro* de daño colestásico en HPC/células ovasales

En primer lugar, llevamos a cabo la puesta a punto del modelo *in vitro* de daño colestásico mediante el tratamiento con diferentes sales biliares, como son el glicoquenodesoxicolato de sodio (GCDC) o el taurocolato de sodio (TCA), a concentraciones presentes en la bilis de pacientes con colestasis (**Woolbright & Jaeschke, 2015**), debido a que la acumulación de ácidos biliares (BAs) a nivel hepático se considera el evento iniciador durante la lesión hepática colestásica. De hecho, existen numerosos estudios en hepatocitos demostrando el efecto citotóxico y la inducción de apoptosis por BAs (**Clouzeau-Girard et al., 2006; Zhang et al., 2012**), sin embargo, apenas hay datos en la literatura sobre la respuesta de las HPC/células ovasales a dichos ácidos.

Dada la ausencia de estudios previos en las HPC/células ovasales, comenzamos analizando el efecto de las sales biliares sobre la viabilidad celular en líneas de HPC/células ovasales previamente establecidas, validadas y caracterizadas en nuestro laboratorio (**del Castillo et al., 2008**). Por un lado, llevamos a cabo una tinción con cristal violeta tras el tratamiento con diferentes concentraciones de GCDC y TCA, tanto de forma individual como de forma combinada. Los resultados mostraron cambios en la viabilidad con concentraciones de GCDC del orden de 1500 μM o superiores, observándose una disminución del 55% en el número de células viables (**Figura 38A**). Sin embargo, el tratamiento con TCA no provocó cambios en la viabilidad, independientemente de las concentraciones utilizadas (**Figura 38B**). El tratamiento combinado con las dos sales biliares (**Figura 38C**) mostró resultados similares a los obtenidos al tratar con GCDC de forma individual, es decir, una notable disminución de la viabilidad a partir de una concentración de GCDC de 1500 μM , aunque en este caso el efecto citotóxico fue ligeramente mayor, observándose una disminución del 65-70% en el número de células viables. Finalmente, realizamos un ensayo de MTT para apoyar los resultados anteriores,

utilizando concentraciones crecientes de GCDC y una concentración fija de TCA (Figura 38D). En este caso se observó una disminución de la viabilidad a concentraciones de GCDC del orden de 1000 μM , aunque ésta fue máxima a concentraciones del orden de 1500 μM . Este resultado podría estar indicando una afectación de la función mitocondrial a dosis de 1000 μM , concentración a la cual ya se observa una notable disminución de la viabilidad.

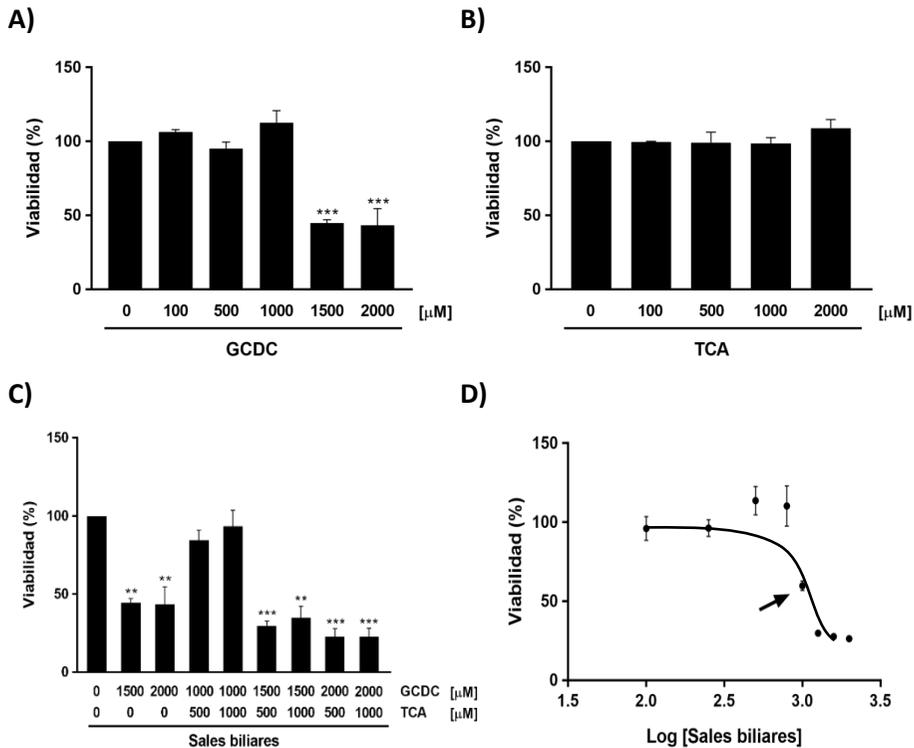


Figura 38. Análisis de la viabilidad celular en las HPC/células ovas tras el tratamiento con GCDC y TCA. **A, B y C)** Las células se privaron de suero durante 2 horas y se trataron con concentraciones crecientes de GCDC (100-2000 μM), TCA (100-2000 μM) o con combinaciones de ambas (GCDC 1000-2000 μM ; TCA 500-1000 μM) durante 24 horas. La viabilidad se determinó mediante tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como % respecto a las células sin tratar y representan la media \pm S.E.M, n=2-8 experimentos independientes realizados por duplicado. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto a las células control. **D)** Las células se privaron de suero durante 2 horas y se trataron con combinaciones de las dos sales biliares (concentraciones crecientes de GCDC 100-2000 μM combinadas con TCA 500 μM) durante 24 horas. La viabilidad se determinó mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como % respecto a las células sin tratar y representan la media \pm S.D de 1 experimento realizado por sextuplicado.

Los análisis realizados utilizando diferentes abordajes demuestran que las sales biliares reducen la viabilidad de las HPC/células ovas. Se eligió utilizar la combinación de GCDC y TCA para siguientes experimentos, con dos concentraciones de GCDC, 1000 y 1500 μM , y TCA a 500 μM .

2.2 Estudio de la vía del EGFR en HPC/células ovals sometidas a tratamiento con sales biliares

Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado el importante efecto mitogénico y de supervivencia del EGF en las HPC/células ovals (**del Castillo et al., 2008; Martínez-Palacián et al., 2012**). Para comprobar si dichos efectos se mantenían o no en presencia de sales biliares, en primer lugar, analizamos la viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta en las HPC/células ovals cultivadas en presencia del tratamiento combinado de GCDC y TCA, con o sin EGF (**Figura 39A**). Los resultados indican que en presencia de las sales biliares se pierde la respuesta proliferativa al EGF, y, además, éste no parece ejercer ningún efecto protector frente a la citotoxicidad inducida por GCDC/TCA. Estos datos se confirmaron mediante conteo celular en las mismas condiciones experimentales (**Figura 39B**), obteniéndose unos datos similares a los obtenidos anteriormente, es decir, la pérdida de la respuesta proliferativa al EGF y la ausencia de un efecto de supervivencia frente a la pérdida de viabilidad provocada por las sales biliares. Para comprobar si estos resultados también se observaban con otros ligandos del EGFR, se realizaron análisis idénticos de la viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta en las HPC/células ovals tratadas con GCDC y TCA, en este caso con o sin HB-EGF, a dos concentraciones distintas (20 y 50 ng/ml), obteniéndose resultados totalmente análogos (**Figura 39C y D**).

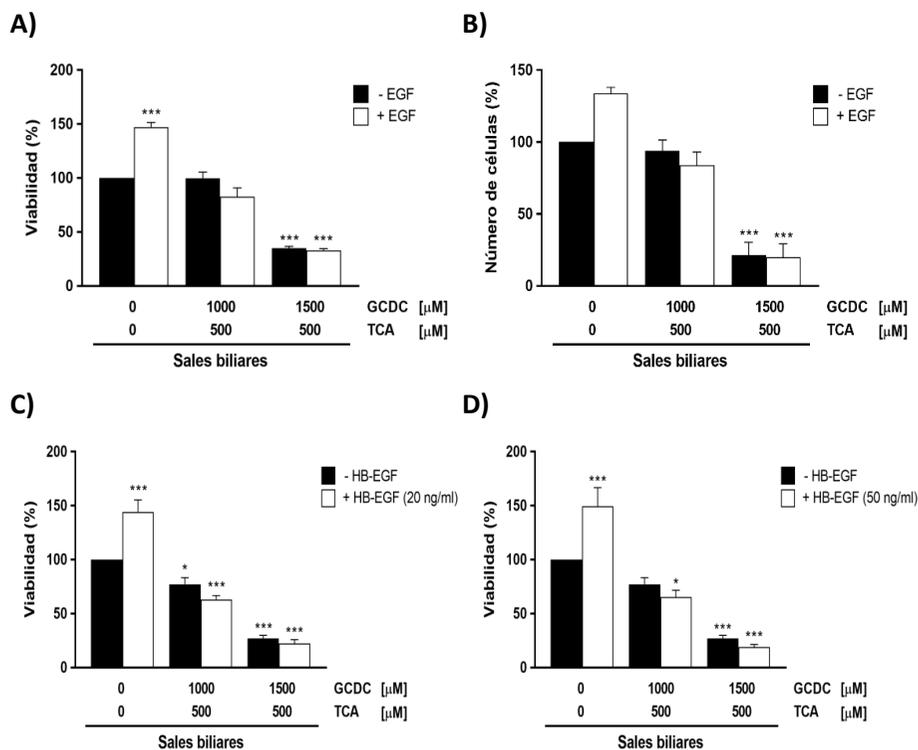


Figura 39. Análisis de la viabilidad celular en las HPC/células ovas tras el tratamiento con GCDC y TCA, en presencia o ausencia de EGF y HB-EGF. A, B, C y D) Las células se privaron de suero durante 2 horas y se trataron con combinaciones de las dos sales biliares (GCDC 1000-1500 μ M; TCA 500 μ M) con o sin EGF (20 ng/ml) y HB-EGF (20 y 50 ng/ml) durante 24 horas. **A, C y D)** La viabilidad se determinó mediante tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como % respecto a las células sin tratar y representan la media \pm S.E.M, n=3-7 experimentos independientes realizados por duplicado. * = p<0.05, *** = p<0.001 respecto a las células control. **B)** Se determinó el número de células mediante conteo tras ser teñidas con azul de tripano. Los datos se expresan como % respecto a las células sin tratar y representan la media \pm S.E.M, n=3 experimentos independientes realizados por triplicado. *** = p<0.001 respecto a las células control.

Dado que además de sus efectos citotóxicos, también se ha visto que las sales biliares actúan como señales reguladoras que modulan la secreción de citoquinas y quimioquinas por parte de hepatocitos (Allen et al., 2011; Woolbright et al., 2015; Cai et al., 2017), quisimos evaluar si esta respuesta se producía en las HPC/células ovas y si la vía del EGFR podría jugar un papel en la regulación de la respuesta inflamatoria hepática como se ha visto en diferentes contextos fisiopatológicos (Berasain & Ávila, 2014; López-Luque et al., 2016). Para ello, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión génica de la quimioquina *CXCL2* y la interleuquina *IL6* en presencia de EGF, sales biliares (GCDC 1000 μ M y TCA 500 μ M) y el tratamiento conjunto de EGF y sales biliares. (Figura 40). Los resultados mostraron un aumento de la expresión de

CXCL2 en presencia de EGF y de las sales biliares por separado, efecto que se veía muy potenciado en células tratadas con ambos. En el caso de *IL6* no se observó un aumento de expresión de mRNA por acción de EGF, pero sí en presencia de las sales biliares, efecto que también se vio potenciado (aunque no de forma tan significativa) en el tratamiento conjunto de sales biliares y EGF.

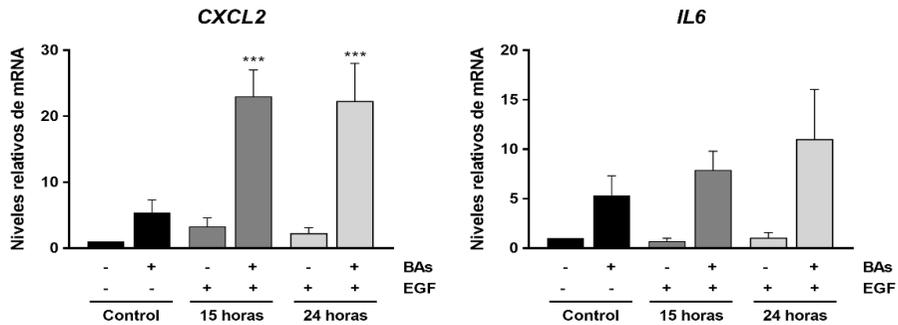


Figura 40. Análisis de la respuesta inflamatoria en las HPC/células ovales tras el tratamiento con EGF, sales biliares o tratamiento combinado. Niveles de mRNA de *CXCL2* e *IL6* tras el tratamiento de las células con EGF (20 ng/ml), sales biliares (GCDC 1000 μ M y TCA 500 μ M) y tratamiento combinado (EGF + sales biliares) durante 15 y 24 horas, analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a las células sin tratar en ausencia de EGF y sales biliares (a las que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=2-5 experimentos independientes. *** = $p < 0.001$ respecto a las células control.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con ligandos del EGFR y con sales biliares, y sobre todo con ambos conjuntamente en las HPC/células ovales induce la expresión de mediadores inflamatorios, evidenciando no solo la implicación directa de estas células en la respuesta inflamatoria en un contexto de daño colestásico, sino un papel importante para la vía del EGFR a este nivel.

3. Generación y caracterización de modelos *in vitro* de HPC/células ovales con la vía del EGFR inactivada o silenciada

Para ahondar en el estudio del papel de la vía del EGFR en las HPC/células ovales en respuesta al daño colestásico, nuestro siguiente objetivo fue obtener HPC/células ovales con la vía del EGFR inactivada o silenciada. Como primer abordaje, aislamos y caracterizamos HPC/células ovales a partir de ratones WT y Δ EGFR, estableciendo así las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC. Para ello utilizamos un procedimiento descrito previamente (del Castillo et al., 2008), tal y como se ha explicado en la sección 2.1 de materiales y métodos. Por otro lado, utilizamos HPC/células ovales deficientes en EGFR generadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9 tal y como se ha explicado en la sección 3

de materiales y métodos. Estos modelos celulares *in vitro* fueron caracterizados y validados fenotípica y funcionalmente.

3.1 Caracterización genotípica y fenotípica de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC

En primer lugar, se verificó el genotipo de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC mediante la detección de la presencia del transgén (**Figura 41A**) por PCR usando cebadores específicos para la secuencia del transgén, tal y como se ha detallado en la sección 4.2 de materiales y métodos. Adicionalmente, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión del transgén *EGFR humano* ($\Delta hEGFR$) en nuestros modelos celulares (**Figura 41B**), confirmando unos altos niveles del mRNA de $\Delta hEGFR$ en las células Δ EGFR-OC y su ausencia en las células WT-OC. Estos resultados confirmaban el genotipo de las líneas celulares y la presencia del transgén únicamente en las células Δ EGFR-OC.

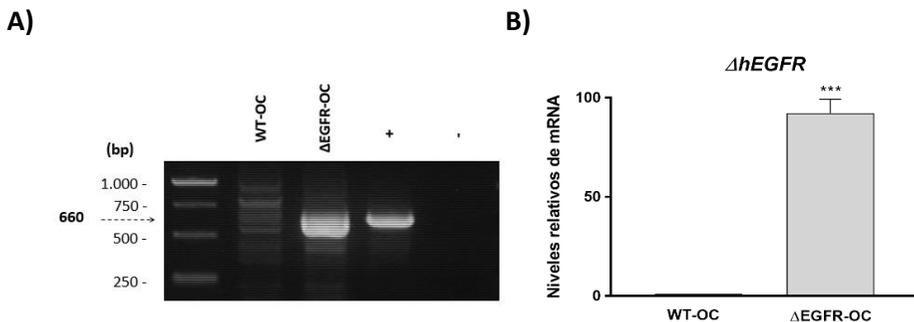
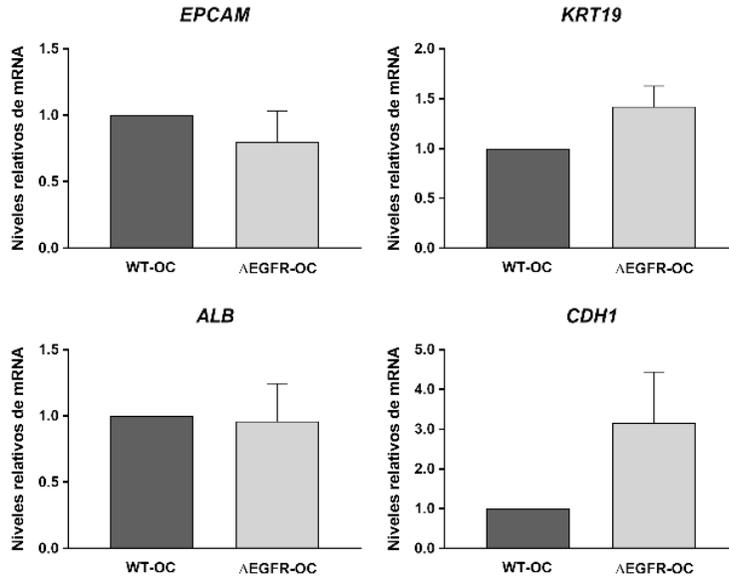


Figura 41. Análisis de la presencia y expresión del transgén en las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC. Las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC se mantuvieron en cultivo en medio completo (10% FBS). **A)** Se aisló DNA genómico y se realizó una PCR para la amplificación de una secuencia del transgén. + : control positivo; - : control negativo. **B)** Niveles de mRNA de $\Delta hEGFR$, analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a las células WT-OC (a las que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media \pm S.E.M, n=3 experimentos independientes. *** = $p < 0.001$ respecto a las células WT-OC.

Una vez comprobado el genotipo, se realizó una caracterización fenotípica de estas células. Se analizaron los niveles de expresión de algunos marcadores de HPC/célula oval, como son *EPCAM*, *KRT19* y *ALB* (Itoh & Miyajima, 2014; Chen et al., 2017), además de *CDH1* (*E-CADHERINA*) como marcador de célula epitelial, tanto por RT-qPCR (**Figura 42A**) como por western blot (**Figura 42B**). Se detectó la expresión de todos los marcadores en ambas líneas celulares, sin diferencias significativas entre ellas, aunque se observó una mayor expresión de CK19 y E-CADHERINA en las células Δ EGFR-OC.

A)



B)

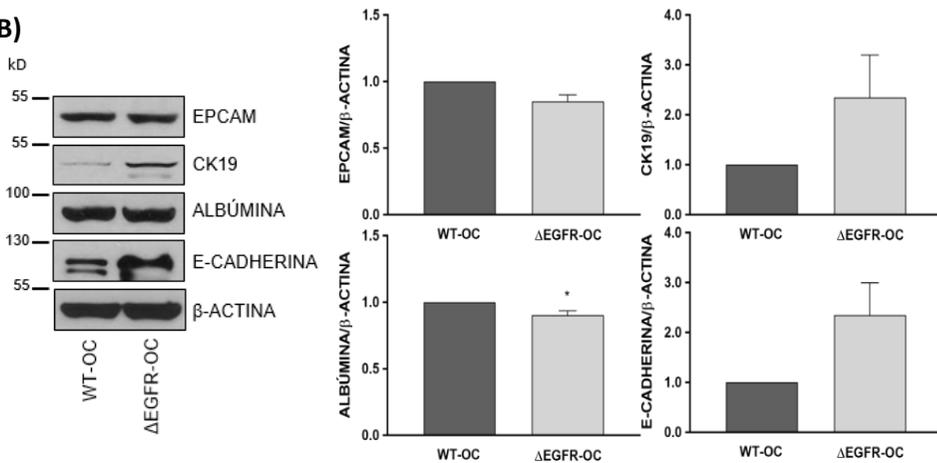


Figura 42. Análisis de la expresión de marcadores de HPC/células ovas en las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC. A) Niveles de mRNA de *EPCAM*, *KRT19*, *ALB* y *CDH1* en células WT-OC y ΔEGFR-OC mantenidas en cultivo en medio completo (10% FBS), analizados por RT-qPCR usando *GUSB* como normalizador. Los datos se expresan respecto a las células WT-OC (a las que se les asignó 1 unidad arbitraria) y representan la media ± S.E.M, n=5 experimentos independientes. Se utilizaron 2 líneas celulares diferentes. **B)** Western blots correspondientes a *EPCAM*, *CK19*, *ALBÚMINA* y *E-CADHERINA* en células WT-OC y ΔEGFR-OC mantenidas en cultivo en medio completo (10% FBS). Se utilizó β-ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel izquierdo) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a n=2-3 experimentos independientes (panel derecho). Los datos representan la media ± S.E.M y se expresan respecto a las células WT-OC (a las que se les asignó 1 unidad arbitraria). * = p<0.05 respecto a las células WT-OC. Se utilizaron 2-3 líneas celulares diferentes.

Para completar este estudio, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para CK19 y ALBÚMINA que se analizaron mediante microscopía confocal (**Figura 43**), con el fin de visualizar el patrón de expresión de estos marcadores en las poblaciones celulares y tener una idea más precisa de la homogeneidad o heterogeneidad de las mismas. La ALBÚMINA presentó un patrón de expresión bastante homogéneo y similar en ambas líneas. El patrón de expresión de CK19 fue algo más heterogéneo dentro de las poblaciones, algo que es habitual en poblaciones de HPC/células ovas. En cualquier caso, no se detectaron diferencias claras entre células WT-OC y Δ EGFR-OC, ni en intensidad ni en distribución subcelular, aunque de nuevo las células Δ EGFR-OC parecían presentar niveles algo superiores de CK19.

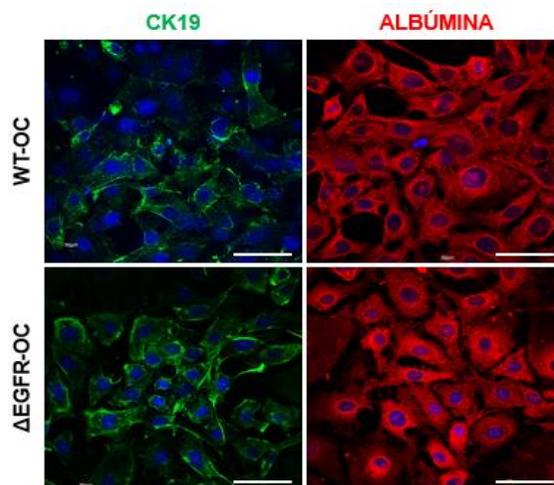


Figura 43. Ensayo de inmunofluorescencia de marcadores de HPC/células ovas en las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC tras la tinción con anticuerpos primarios específicos para CK19 y ALBÚMINA y anticuerpos secundarios fluorescentes. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestran imágenes representativas de un total de 7 experimentos independientes. Barra de escala = 30 μ m. Se utilizaron 3 líneas celulares diferentes.

Por último, realizamos un análisis de citometría de flujo con el fin de estudiar los niveles de expresión de EPCAM y A6, otro marcador de HPC/células ovas (**Engelhardt et al., 1993**) (**Figura 44**). Los histogramas de citometría mostraron un desplazamiento claro de toda la población en presencia del anticuerpo (línea rosa) frente al control negativo de tinción (línea gris) o el control de segunda capa (línea verde) en ambos casos, estimándose que alrededor de un 30-40% de las células, WT-OC y Δ EGFR-OC respectivamente, eran positivas para A6 (porcentajes medios respectivos de 28,01% y 40,86%). De forma similar, alrededor de un 40% de la población celular fue positiva para EPCAM en ambos tipos celulares (WT-OC, porcentaje medio = 38,50%; Δ EGFR-OC, porcentaje medio = 36,89%).

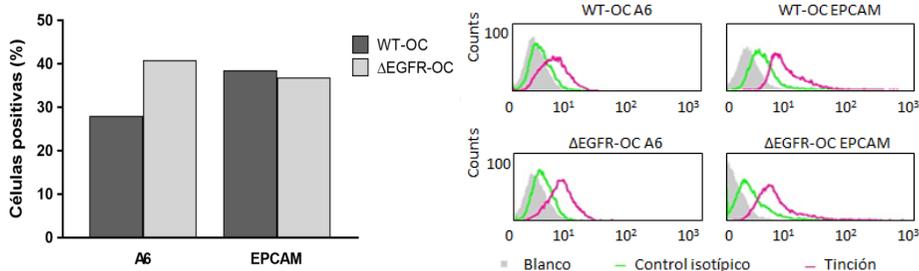


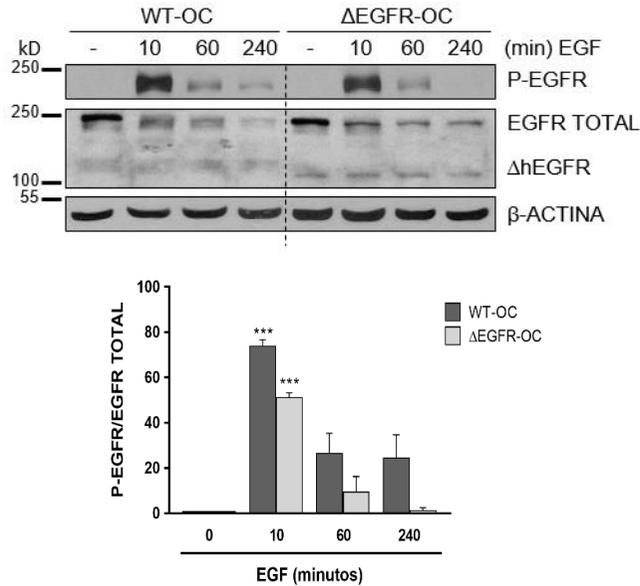
Figura 44. Citometría de flujo de marcadores de HPC/células ovas en las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC. Análisis por citometría de flujo de las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC tras tinción con anticuerpos específicos para A6 y EPCAM. Se muestra la media de los datos de 1-2 experimentos independientes (panel izquierdo), así como histogramas representativos (panel derecho).

Los análisis realizados utilizando diferentes abordajes demuestran que las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC establecidas presentan un fenotipo concordante con el de las HPC/células ovas, quedando así validado fenotípicamente el modelo celular. A este nivel no se observan diferencias significativas entre líneas de distinto genotipo.

3.2 Caracterización funcional de las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC: análisis de la respuesta al EGF

Resultados previos habían demostrado que el transgén ΔhEGFR presente en las células ΔEGFR-OC actúa como un dominante negativo, lo que resulta en una menor o nula respuesta al EGF en líneas de hepatocitos obtenidas a partir de este ratón (López-Luque et al., 2016). En base a esto, analizamos si este fenómeno también ocurría en las líneas de HPC/células ovas generadas. Para ello, analizamos la vía de señalización del EGFR en células WT-OC y ΔEGFR-OC tratadas con EGF. Los resultados obtenidos mediante western blot mostraron que el EGFR se fosforila, es decir, se activa, en ambos tipos celulares, pero los niveles del receptor activo fueron menores en las células ΔEGFR-OC (Figura 45A). Se observaron diferencias más notables al analizar la activación de vías de señalización diana del EGFR, como son las ERK1/2-MAPK y AKT (Figura 45B), cuyos niveles de fosforilación tras el tratamiento con EGF son claramente menores en las células ΔEGFR-OC en comparación con las células WT-OC. Sin embargo, no se observaron diferencias en la activación de STAT3.

A)



B)

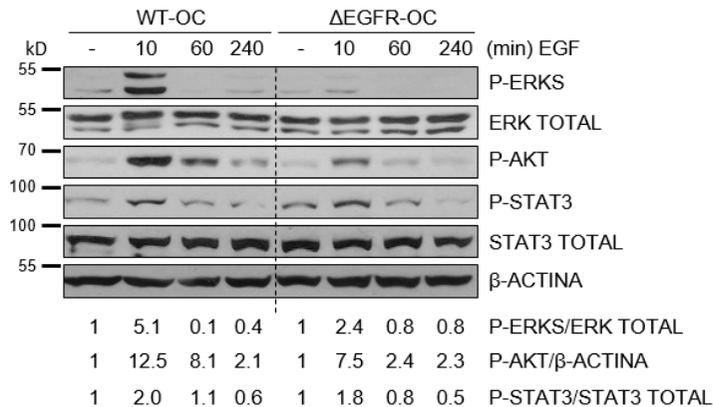


Figura 45. Análisis de la activación de la vía de señalización del EGFR en las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC. A-B) Las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC se privaron de suero durante 15-18 horas, se trataron con EGF (20 ng/ml) durante 0, 10, 60 y 240 minutos y se recogieron extractos de proteína total. **A)** Western blots correspondientes a las formas fosforilada (P-EGFR) y total (EGFR TOTAL) del EGFR. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente (ratio P-EGFR/EGFR) a n=3 experimentos independientes (panel inferior). Los datos representan la media ± S.E.M y se expresan respecto a sus respectivos controles (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). *** = p<0.001 respecto a las células control. Se utilizaron 2 líneas celulares diferentes. **B)** Western blots correspondientes a las formas fosforiladas y totales de ERK1/2-MAPK, AKT y STAT3. Se utilizaron ERK TOTAL, STAT3 TOTAL y β-ACTINA como controles de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente (panel inferior).

Diferentes estudios han demostrado que los ligandos del EGFR son factores mitogénicos para los hepatocitos y las HPC/células ovas, lo que resulta en una mayor proliferación celular en cultivo (**Martínez-Palacián et al., 2012; Michalopoulos & Bhushan, 2021**). Por tanto, a continuación, evaluamos si las células Δ EGFR-OC perdían o no esta respuesta al EGF. Para ello, se realizaron experimentos de conteo del número de células tras el tratamiento con diferentes concentraciones de EGF (**Figura 46**). Como cabía esperar, se observó un aumento significativo en el número de células en la línea celular WT-OC en respuesta a las diferentes concentraciones de EGF, efecto que desaparecía en las células Δ EGFR-OC.

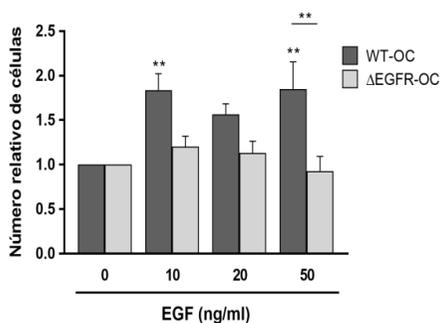


Figura 46. Análisis del crecimiento celular en respuesta al EGF en las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC. Las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC se privaron de suero durante 2 horas y se trataron con diferentes concentraciones de EGF (0, 10, 20 o 50 ng/ml) durante 24 horas. Se determinó el número de células mediante conteo tras ser teñidas con azul de tripano. Los datos se expresan respecto a sus respectivos controles y representan la media \pm S.E.M, n=7-8 experimentos independientes realizados por triplicado. ** = $p < 0.01$ respecto a las células control o como se indica. Se utilizaron 3 líneas celulares diferentes.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que las líneas celulares obtenidas a partir de los ratones Δ EGFR constituyen un modelo de HPC/células ovas con una activación notablemente aminorada de la vía de señalización del EGFR y la consiguiente pérdida de las respuestas biológicas, concretamente del efecto mitogénico inducido por el EGF.

3.3 Caracterización funcional de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC: respuesta a TGF- β , HGF y suero

En un siguiente paso de la caracterización funcional de estas líneas celulares, analizamos la respuesta de las células Δ EGFR-OC al tratamiento con TGF- β en presencia o ausencia de EGF, dado que resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el TGF- β induce un proceso de muerte por apoptosis en las HPC/células ovas que es rescatado por EGF (**Martínez-Palacián et al., 2012**) y, además, estudios previos *in vivo* evidenciaron una

sobreactivación de la vía del TGF- β en hígados de ratones Δ EGFR tanto basalmente como tras PH (López-Luque et al., 2016).

Se realizaron experimentos de conteo del número de células y análisis de núcleos apoptóticos tras el tratamiento con TGF- β , EGF o ambos (Figura 47A y B). Los resultados utilizando ambos abordajes mostraron una disminución del número de células y un aumento del porcentaje de núcleos apoptóticos tras el tratamiento con TGF- β tanto en las células WT-OC como en las células Δ EGFR-OC, siendo este efecto más pronunciado en estas últimas. Además, se observó que el EGF ejerce un papel protector en la muerte inducida por TGF- β exclusivamente en el caso de las células WT-OC, evidenciando la pérdida de respuesta de las células Δ EGFR-OC al EGF.

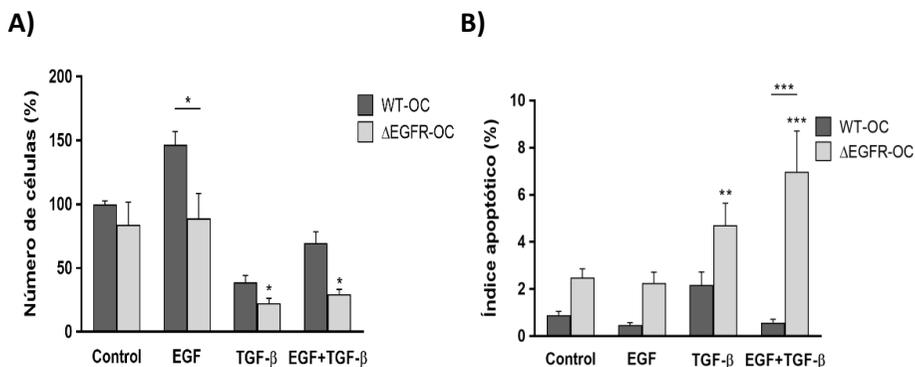


Figura 47. Análisis de la respuesta de las células WT-OC y Δ EGFR-OC al TGF- β en presencia o ausencia de EGF. A-B) Las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC se privaron de suero durante 2 horas y se trataron con EGF (20 ng/ml), TGF- β (1 ng/ml) o la combinación de ambos. **A)** Contaje celular tras tinción con azul de tripano en células tratadas durante 48 horas. Los datos se expresan como % respecto a las células WT-OC control y representan la media \pm S.E.M, n=3-8 experimentos independientes realizados por triplicado. * = p<0.05 respecto a las células WT-OC control o como se indica. Se utilizaron 3 líneas celulares diferentes. **B)** Índice apoptótico cuantificado mediante microscopía de fluorescencia en células tratadas durante 24 horas, tras fijación y tinción con yoduro de propidio. Los datos representan la media \pm S.E.M, n=3-4 experimentos independientes realizados por triplicado. ** = p<0.01, *** = p<0.001 respecto a las células WT-OC control o como se indica. Se utilizaron 2 líneas celulares diferentes.

Además, se analizó mediante western blot la señalización disparada por el TGF- β en ambas líneas celulares para ver si las diferencias en la respuesta a este factor estaban acompañadas de cambios en la señalización. Los datos mostraron un aumento de la fosforilación de SMAD2, componente clave de la vía canónica del TGF- β (Massagué, 2012; Derynck & Budi, 2019), en las células Δ EGFR-OC, aunque las diferencias no fueron significativas con respecto a las células WT-OC (Figura 48).

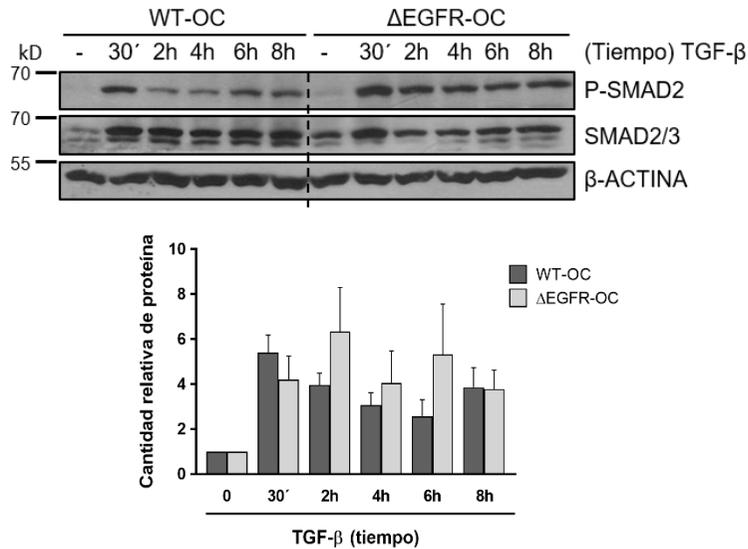


Figura 48. Análisis de la vía de señalización del TGF-β en los hígados de ratones WT y ΔEGFR sometidos a una dieta DDC. Las células WT-OC y ΔEGFR-OC se privaron de suero durante 15-18 horas y se trataron con TGF-β (1 ng/ml) durante 30 minutos, 2, 4, 6 y 8 horas. Se recogieron extractos de proteína total y se realizaron western blots correspondientes a la forma fosforilada de SMAD2 (P-SMAD2) y SMAD2/3. Se utilizó β-ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo (panel superior) y el análisis cuantitativo por densitometría correspondiente a n=3-6 experimentos independientes (panel inferior). Los datos representan la media ± S.E.M y se expresan respecto a sus respectivos controles (a los que se les asignó 1 unidad arbitraria). Se utilizaron 3 líneas celulares diferentes.

Al mismo tiempo, analizamos la respuesta de las células ΔEGFR-OC al tratamiento con HGF, un factor cuyo efecto mitogénico hemos demostrado que es independiente de la actividad quinasa del EGFR (**Martínez-Palacián et al., 2012**). Usando abordajes similares de conteo del número de células tras el tratamiento a 24 y 48 horas con HGF (**Figura 49**), los resultados evidenciaron una respuesta muy similar en ambos tipos de células, corroborando así que la actividad catalítica del EGFR no tiene ningún efecto sobre la respuesta mitogénica inducida por el HGF en las HPC/células ovales.

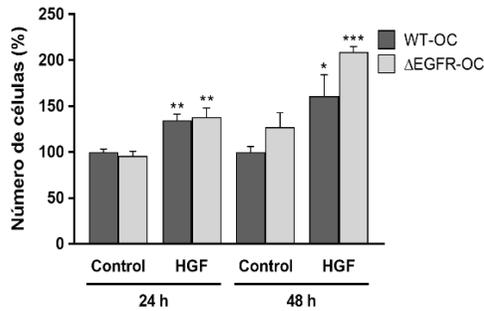


Figura 49. Análisis de la respuesta de las células WT-OC y ΔEGFR-OC al HGF. Las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC se privaron de suero durante 2 horas y se trataron con HGF (40 ng/ml). 24 y 48 horas después del tratamiento se contaron tras ser teñidas con azul de tripano. Los datos se expresan como % respecto a las células WT-OC y representan la media ± S.E.M, n=2 experimentos independientes realizados por triplicado. * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 respecto a las células WT-OC control a cada tiempo. Se utilizaron 2 líneas celulares diferentes.

Por último, evaluamos si existían diferencias en la capacidad proliferativa en respuesta al suero entre ambas líneas celulares. Para ello, realizamos una curva de crecimiento en medio de cultivo estándar suplementado con 10% FBS, realizando un conteo celular durante 5 días consecutivos (**Figura 50**). Como se puede observar en la gráfica, no encontramos diferencias en la proliferación en presencia de suero entre las células WT-OC y ΔEGFR-OC.

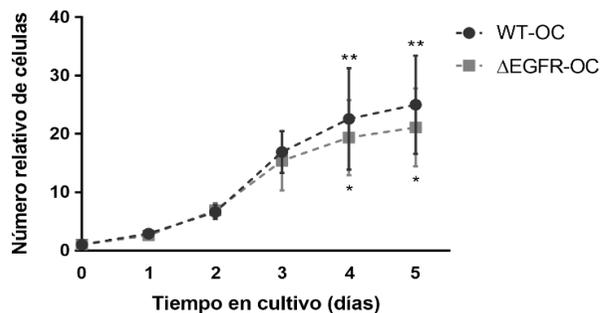


Figura 50. Análisis del crecimiento en presencia de suero en las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC. Las líneas celulares WT-OC y ΔEGFR-OC se mantuvieron en un medio al 10% FBS y se contaron durante un periodo de 5 días, tras ser teñidas con azul de tripano. Los datos se expresan respecto a sus respectivos controles a tiempo inicial y representan la media ± SEM, n=4-7 experimentos independientes realizados por triplicado. * = p<0.05, ** = p<0.01 respecto a las células control. Se utilizaron 2 líneas celulares diferentes.

De forma global, los resultados obtenidos indican que la ausencia de actividad catalítica del EGFR aumenta la sensibilidad de las HPC/células ovas a

los efectos supresores inducidos por el TGF- β y no varía la respuesta mitogénica al HGF ni al suero. Además, la pérdida del efecto de supervivencia del EGF sobre la apoptosis inducida por TGF- β , junto a la ausencia de efecto mitogénico, en las células Δ EGFR-OC, sirven como pruebas de validación funcional del modelo celular.

3.4 Generación y caracterización de las HPC/células ovas deficientes en EGFR mediante la tecnología CRISPR/Cas9

Como ya se ha mencionado anteriormente, con el fin de disponer de una herramienta adicional para reforzar los resultados obtenidos en relación a la relevancia de la vía del EGFR en la regulación de las propiedades y función de las HPC/células ovas, generamos HPC/células ovas deficientes en EGFR mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, en primer lugar, llevamos a cabo la introducción de la endonucleasa CAS9 en las HPC/células ovas por medio de las partículas lentivirales lentiCas9-Blast (**Figura 51**).

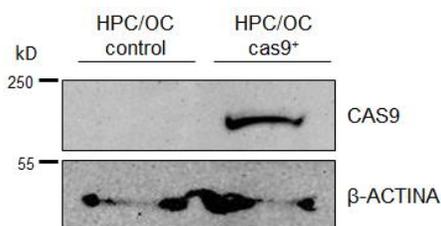


Figura 51. Análisis de la expresión de la endonucleasa CAS9 en las HPC/células ovas. Las células se mantuvieron en un medio al 10% FBS y se recogieron extractos de proteína total. Se realizó un western blot correspondiente a CAS9. Se utilizó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo.

Una vez detectada la presencia de la proteína CAS9 en las HPC/células ovas, llevamos a cabo la infección de dichas células con diferentes partículas lentivirales con sgRNAs dirigidos frente a los exones 4, 15 y 22 del EGFR (denominadas plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4/15/22). En paralelo, se realizó este protocolo con las partículas lentivirales lentiGuide-Puro-Non-Target Control (NTC) para obtener una población celular control. Asimismo, tras la selección de las células con puromicina y la comprobación de que había tenido lugar la edición genética mediante la secuenciación Sanger, se obtuvieron clones en los que se analizó la expresión del EGFR mediante western blot (**Figura 52**). La mayoría de los clones analizados no presentaban expresión de EGFR. En conjunto se logró una eficacia del proceso del 90%, siendo la mezcla de las tres diferentes partículas lentivirales (plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4+15+22) la que presentó la mayor eficacia.

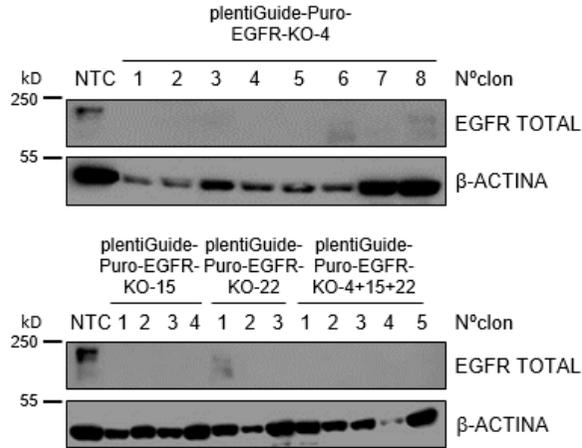


Figura 52. Análisis de los niveles de expresión de la proteína EGFR en los clones obtenidos mediante la infección de las células HPC/OC-Cas9⁺ con partículas lentivirales con diferentes sgRNAs. Las células se mantuvieron en un medio al 10% FBS y se recogieron extractos de proteína total. Se realizó un western blot correspondiente a EGFR TOTAL. Se utilizó β -ACTINA como control de carga. Se muestra un experimento representativo. NTC = Non-Target Control.

Se seleccionaron tres clones de células de entre los que no presentaban expresión de EGFR (plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4-clon8, plentiGuide-Puro-EGFR-KO-22-clon2 y plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4+15+22-clon5) y se analizó la activación del EGFR en respuesta a EGF. Los resultados obtenidos mediante western blot confirmaron la ausencia total de fosforilación del receptor en los clones deficientes en EGFR, mientras que las células control (NTC) mostraron la activación esperada del receptor (**Figura 53**).

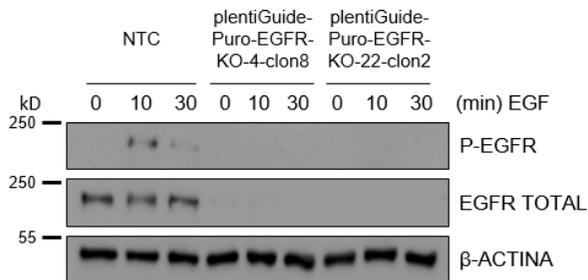


Figura 53. Análisis de la activación de la vía de señalización del EGFR en los clones plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4-clon8 y plentiGuide-Puro-EGFR-KO-22-clon2. Las células se privaron de suero durante 15-18 horas, se trataron con EGF (20 ng/ml) durante 0, 10 y 30 minutos y se recogieron extractos de proteína total. Se realizaron western blots correspondientes a la forma fosforilada de EGFR (P-EGFR) y EGFR TOTAL. Se utilizó EGFR TOTAL como control de carga. Se muestra un experimento representativo. NTC = Non-Target Control.

A continuación, analizamos la respuesta mitogénica al EGF en los clones seleccionados realizando experimentos de conteo del número de células tras el tratamiento con EGF a 24 y 48 horas (**Figura 54**). Como cabía esperar, se observó un aumento significativo en el número de células tras el tratamiento con EGF en las células control (NTC) en ambos tiempos. Sin embargo, el efecto mitogénico del EGF se pierde en las células que carecen de EGFR (plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4-clon8 y plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4+15+22-clon5).

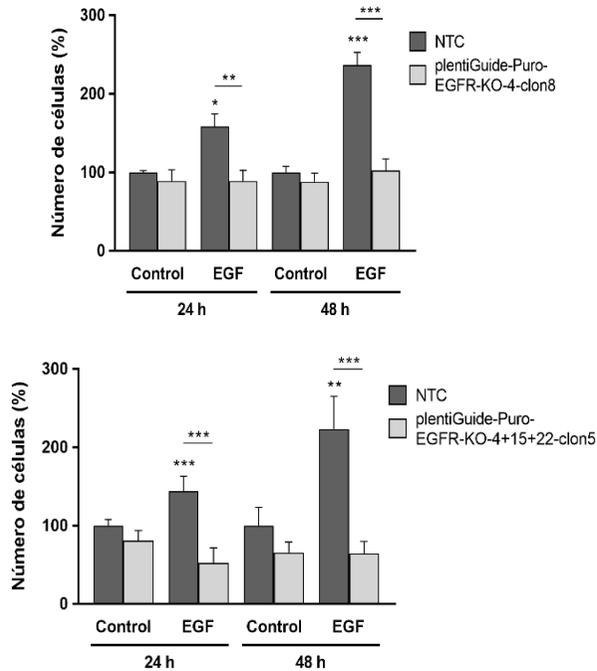


Figura 54. Análisis de la respuesta proliferativa al EGF en los clones plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4-clon8 y plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4+15+22-clon5. Las células se privaron de suero durante 2 horas, se trataron con EGF (20 ng/ml) durante 24 y 48 horas y se contaron tras ser teñidas con azul de tripano. Los datos se expresan como % respecto a las células control sin tratar y representan la media \pm S.E.M, n=2 experimentos independientes realizados por triplicado (panel superior) y la media \pm S.D. de un experimento realizado por triplicado (panel inferior). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ respecto a las células NTC control a cada tiempo.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los clones seleccionados (plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4-clon8, plentiGuide-Puro-EGFR-KO-22-clon2 y plentiGuide-Puro-EGFR-KO-4+15+22-clon5) constituyen un buen modelo de HPC/células ovas deficientes en EGFR, que no presentan activación de la vía de señalización del EGFR ni efecto mitogénico tras el tratamiento con EGF, quedando así validado funcionalmente el modelo celular.

9. DISCUSIÓN

1. La expresión de un EGFR sin actividad catalítica en hepatocitos conduce a una mayor expansión de HPC/células ovas en un modelo de enfermedad hepática colestásica

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la relevancia de la vía del EGFR en la respuesta regenerativa del hígado ante un daño colestásico crónico inducido por la dieta DDC, prestando especial atención al efecto sobre las HPC/células ovas, así como establecer un modelo *in vitro* de daño colestásico por tratamiento con sales biliares para analizar el papel del EGFR en dichas células.

Es clave comprender las vías de señalización y la regulación molecular de la regeneración hepática ya que esta información proporciona la base para mejorar o modular la capacidad regenerativa del hígado. Esto, a su vez, abre nuevas oportunidades de tratamiento diferentes al trasplante ortotópico del hígado, lo cual podría contribuir a reducir la mortalidad de las enfermedades hepáticas. Cabe destacar que la relevancia de la señalización mediada por el EGFR en la regeneración hepática es conocida desde hace tiempo. En este sentido existen estudios que ponen de manifiesto un papel importante del EGFR en la regeneración hepática tras daño agudo por PH, ya que promueve la proliferación de los hepatocitos. Consistente con esto, la delección o inactivación del EGFR provoca un retraso o un efecto supresor en dicho proceso (**Natarajan et al., 2007**; **Paranjpe et al., 2010**; **López-Luque et al., 2016**). También hay evidencias de un papel protector para esta vía en modelos de daño crónico, aunque en este contexto el panorama es mucho más confuso. La delección del EGFR en hepatocitos de ratones *Mdr2^{-/-}* (ratones que presentan daño biliar similar al de pacientes con PSC) (**Svinka et al., 2017**), así como la deficiencia de algunos ligandos en diversos modelos de daño hepático crónico en ratones (**Huang et al., 2012**; **Takemura et al., 2013**; **Santamaría et al., 2019**), resulta en un agravamiento de la fibrosis y el daño hepático. Sin embargo, otros estudios postulan que la vía del EGFR, o ligandos específicos, como AR, tendrían una actividad profibrógena, modulando la expresión de mediadores fibrogénicos y actuando directamente sobre las células estrelladas y la deposición de ECM, en modelos de daño crónico inducido por CCL₄, NAFLD, o daño colestásico (**Perugorria et al., 2008**; **McKee et al., 2015**; **Liang et al., 2018**; **Bhushan et al., 2019**; **Xu et al., 2020**). Todo esto sugiere que la vía de señalización del EGFR puede jugar papeles diferentes que vienen determinados por el contexto de daño, poniendo en evidencia un papel multifacético no convencional para el EGFR en regeneración hepática, que sin duda estimula la investigación en este campo.

Por otra parte, apenas se disponen de datos en la literatura respecto al efecto de la inhibición de la vía del EGFR en la activación, expansión y/o destino de HPC/células ovas en modelos de daño hepático crónico, como es el caso de las enfermedades hepáticas colestásicas, donde estas células pueden jugar un papel determinante para la progresión de la enfermedad (Itoh, 2016; Chen et al., 2017). En este sentido, es interesante destacar un trabajo en el que se describe que la vía de EGFR a través de la inducción de NOTCH1 promueve la especificación al linaje epitelial biliar a la vez que suprime la especificación al linaje de hepatocitos, y esto podría explicar una mejor respuesta regenerativa al daño inducido por DDC en ratones knockout condicionales hepáticos para EGFR (Kitade et al., 2013). En cualquier caso, como se discutirá más adelante, la señalización vía EGFR regula múltiples procesos y respuestas biológicas en células hepáticas, por lo que su papel exacto en este contexto probablemente sea más complejo e implique distintos mecanismos y procesos regulatorios.

En trabajos previos en diferentes modelos experimentales de daño hepático se ha visto un incremento en los niveles de expresión de diferentes ligandos del EGFR (Webber et al., 1993; Kiso et al., 1995; Berasain et al., 2005). Por otro lado, resultados obtenidos a partir del análisis de bases de datos públicas (GSE61256) que incluye muestras de hígado de sujetos con PSC y PBC (los dos tipos principales de enfermedad hepática colestásica crónica en humanos), también muestran un incremento en los niveles de expresión de *HB-EGF*, *EGF* y *AR* en los sujetos con PSC con respecto a los sujetos sanos. Adicionalmente, también se han observado alteraciones en la expresión del EGFR. Así, individuos con PSC muestran un aumento en la expresión y/o activación de la vía del EGFR en hígado (Trussoni et al., 2015), hecho que también se ha descrito en modelos experimentales de fibrosis por CCL₄, y NAFLD por dieta rica en grasa (Scheving et al., 2016; Liang et al., 2018). Por el contrario, en nuestro modelo hemos observado que tanto la expresión génica del *EGFR* endógeno como su activación están disminuidas tras el daño colestásico inducido por la dieta DDC (Figuras 19 y 20), evidenciando una regulación negativa de la vía. No obstante, la expresión de algunos de los ligandos del EGFR, como son *HB-EGF* y *AR*, está aumentada tras la dieta DDC (Figura 21), posiblemente en un intento de compensación fallido, aunque no se observan diferencias entre ratones WT y Δ EGFR. Tampoco se produce un aumento en los niveles de otros miembros de la familia del EGFR, ErbB2 y ErbB3 (datos no mostrados en esta memoria). Conviene mencionar que resultados del laboratorio no incluidos en esta memoria evidencian una activación muy temprana y transitoria de EGFR en el modelo de DDC, seguida de una disminución de los niveles de EGFR a partir de 4 días de tratamiento, lo que pondría de manifiesto una interesante regulación opuesta de la vía de forma fase-dependiente. Los mecanismos que median esta regulación están aún por determinar y el significado de esta disminución de la vía de señalización del

EGFR no está claro. Una posibilidad podría ser que dicha disminución fuese necesaria para permitir el proceso regenerativo del hígado, o, por el contrario, fuese una consecuencia del daño hepático e impida una regeneración eficiente.

Asimismo, hemos demostrado que la ausencia del EGFR en hepatocitos da lugar a un daño hepático aminorado o retrasado tras el tratamiento con la dieta DDC. Por un lado, hemos llevado a cabo la evaluación del daño hepático mediante el estudio de los niveles de algunos de los marcadores séricos de daño hepático más utilizados, como AST, ALT, ALP y bilirrubina total, mostrando un incremento menor de estos parámetros en los animales Δ EGFR tras la dieta DDC (**Figura 22**). No es sorprendente que los cambios más evidentes y las diferencias significativas con respecto a los ratones WT se encuentren en ALP y bilirrubina total, ya que estos dos parámetros son mejores marcadores de daño colestásico (**Pollock & Minuk, 2017**). Por otro lado, los niveles de marcadores fibrogénicos (*TGF- β 1*, *TGF- β 2*, *COL1A1*, *CTGF* y *ACTA-2*) están elevados tras el tratamiento con la dieta DDC en los animales WT, mostrando un pico de inducción a las 4 semanas, a excepción del marcador *ACTA-2* en el que el pico se observa a las 2 semanas. En los animales Δ EGFR el incremento es menor, alcanzando niveles similares a los WT solo al tiempo más largo (6 semanas) (**Figura 24**). Curiosamente, los datos obtenidos a partir de la tinción con Sirius Red no muestran diferencias significativas entre los ratones WT y Δ EGFR. A pesar de que no hay un paralelismo perfecto entre la expresión de marcadores fibrogénicos y los niveles de colágeno en el tejido, hay que destacar que los niveles basales de colágeno hepático en estos ratones son también algo superiores, de manera que el incremento real de la deposición de fibras de colágeno inducido por el tratamiento respecto a la situación control es menor en los ratones Δ EGFR en comparación con los ratones WT (a 2 semanas de tratamiento: $6,01 \pm 1,01$ versus $3,5 \pm 0,37$ veces de incremento en WT y Δ EGFR, respectivamente; a 6 semanas de tratamiento: $6,13 \pm 0,53$ versus $4,81 \pm 0,39$ veces de incremento en WT y Δ EGFR, respectivamente) (**Figura 25**).

En concordancia con las observaciones previas, los animales Δ EGFR presentan un incremento menor y más controlado en el tiempo de los niveles de CASPASA-3 activa, marcador que refleja los niveles de apoptosis en el tejido hepático, tras tratamiento con la dieta DDC. Mientras que en los animales WT los niveles están muy elevados a las 6 semanas de tratamiento, en los animales Δ EGFR se recuperan los niveles basales (**Figura 26**). Estos elevados niveles de CASPASA-3 activa en los animales WT podrían asociarse con los datos de tinción con Ki67 que muestran un claro aumento en la proliferación de los hepatocitos en respuesta al tratamiento con la dieta DDC en hígados WT, fenómeno que no se observa en los animales Δ EGFR (**Figura 27**). Conjuntamente, estos datos (menores niveles de apoptosis y menor tasa de proliferación de los hepatocitos) podrían ser consistentes con un menor recambio de la población celular

parenquimática en los ratones Δ EGFR, reflejo de un menor daño hepático que no necesitaría una respuesta proliferativa compensatoria por parte de los hepatocitos, tal y como se ha observado en diferentes estudios (Maeda et al., 2005; Tan et al., 2020).

De todos estos datos, los que aportan un panorama menos claro son los relativos al análisis de fibrosis. Para dar más solidez a estos datos se podrían realizar abordajes adicionales como el análisis del contenido de hidroxiprolina en el tejido hepático (Huang et al., 2014a), ya que constituye una herramienta para el análisis del grado de fibrosis hepática. También podría resultar útil analizar factores relacionados con la remodelación de la ECM, como pueden ser las metaloproteasas (MMPs) o sus inhibidores específicos, los TIMPs, ya que juegan un papel clave en la fibrogénesis y en la resolución de la fibrosis al regular con precisión la homeostasis de la ECM (Roeb, 2018). La alteración en el equilibrio entre las MMPs y los TIMPs se ha relacionado con el daño hepático, encontrándose un aumento en los niveles de expresión de los TIMPs por parte de las células estrelladas hepáticas activadas, que inhibiría las MMPs, reduciéndose así la degradación de la ECM al mismo tiempo que se incrementa la producción de las proteínas de la ECM (Geervliet & Bansal, 2020). Por otra parte, directamente en relación con la vía de EGFR, se ha descrito que la reducción en los niveles de α -SMA y en la deposición de colágeno, observada en ratones deficientes en el ligando de EGFR, AR, sometidos a tratamiento con CCL₄, está asociada a unos niveles disminuidos de TIMP-1, y que el tratamiento de células fibrogénicas en cultivo con AR conduce a un aumento en los niveles de TIMP-1 (Perugorria et al., 2008). Por tanto, sería interesante estudiar si los ratones Δ EGFR en el contexto colestásico inducido por DDC muestran alguna alteración en la expresión de las MMPs y los TIMPs y si esto podría aportar algo más de luz en relación al papel de EGFR en el desarrollo y la evolución del proceso fibrogénico en nuestro modelo. En cualquier caso, teniendo en cuenta que la fibrosis portal asociada a daño colestásico/biliar es un proceso menos estudiado y conocido que la fibrosis clásica que se inicia en el lóbulo hepático, y que difiere de ésta incluso a nivel de la fuente celular origen de los miofibroblastos (Karin et al., 2016; Pinzani & Luong, 2018), es evidente que hay muchos aspectos, no solo de regulación a nivel celular, molecular y de señalización del proceso, sino incluso de la evolución del mismo y su relevancia fisiopatológica, que son una incógnita y requieren estudios mucho más profundos.

Nuestros resultados también inciden sobre un importante tema de debate que existe hoy en día en el campo de la regeneración hepática: el papel exacto que juegan las HPC/células ovales en el hígado dañado. Como ya se ha comentado en secciones previas de esta memoria, aunque el potencial regenerativo de las HPC/células ovales se ha demostrado en diferentes estudios

(Wang et al., 2003; Suzuki et al., 2008; Papp et al., 2014), existen otros trabajos que apuntan hacia un papel pro-fibrótico de las HPC/células ovas (Chobert et al., 2012; Pan et al., 2017; Liu et al., 2020). En nuestro modelo experimental de daño inducido por la dieta DDC observamos que el daño hepático aminorado en los animales Δ EGFR (Figuras 22, 24, 25, 26 y 27) está asociado a una reacción ductular amplificada. Diferentes ensayos y aproximaciones experimentales indican este hecho: el análisis morfométrico (Figura 28); la expresión de marcadores de HPC/células ovas como son EPCAM, CK19 o CD133 (Figuras 29 y 30); la tinción inmunohistoquímica del marcador CK19 (Figura 31A) y su análisis histopatológico (Figura 31B); así como el análisis del índice proliferativo de las células CK19+ (Figura 32). Consistentemente, también se observa una mayor relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo (Figura 23A), lo cual está asociado a una mayor regeneración hepática tal y como se ha observado en otros estudios (Dusabineza et al., 2012; Ishikawa et al., 2012). Cabe destacar que los animales Δ EGFR pierden menos peso corporal, y además los hígados ganan más peso, observándose un punto de inflexión (cambio de pérdida de peso a ganancia) tras 2 semanas de tratamiento, fenómeno que no está claro en los animales WT (Figura 23B). Estos resultados irían en consonancia con la mayor proliferación de las HPC/células ovas en los animales Δ EGFR, permitiendo así una mejor regeneración. Por tanto, todos estos datos apoyarían el papel beneficioso de la expansión de las HPC/células ovas en el proceso de regeneración hepática que acompaña al daño inducido por DDC, en contraposición de la hipótesis que sostiene un papel perjudicial. Por otro lado, a pesar de que estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la señalización del EGFR es importante en la regeneración hepática mediada por estas células al promover su proliferación, así como en la supervivencia de las mismas (Nagy et al., 1996; del Castillo et al., 2008; Martínez-Palacián et al., 2012), estos datos también sugieren que la ausencia del EGFR en el hígado está promoviendo de forma inequívoca la expansión de las HPC/células ovas. Nuestras observaciones de una mejor respuesta regenerativa van en la línea del estudio realizado por el grupo del Dr. Thorgeirsson en el que la pérdida total del EGFR en el hígado de ratón resulta beneficiosa durante la regeneración hepática mediada por las HPC/células ovas tras el daño inducido con la dieta DDC (Kitade et al., 2013). No obstante, este trabajo se enfoca exclusivamente en la regulación de las decisiones de linaje celular, como se ha comentado previamente, y pone énfasis en un posible desequilibrio en el proceso de diferenciación celular a favor de la diferenciación hacia el linaje de hepatocitos sobre el linaje biliar. Nosotros demostramos una mayor proliferación en la población de células ductales, luego independientemente de que se produzca un cambio en el proceso de diferenciación, algo que no descartamos pero que no hemos comprobado en nuestro modelo, también se ve afectación a nivel de proliferación.

En este sentido, nuestros datos muestran una activación más intensa y/o sostenida de las vías de señalización ERK1/2-MAPK y PI3K/AKT en los ratones Δ EGFR tras la dieta DDC (**Figura 36**), sobre todo a tiempos tardíos, sugiriendo su implicación en la expansión de las HPC/células ovas y la respuesta regenerativa potenciada en nuestro modelo. La activación de estas rutas parece ser clave para la regeneración mediada por las HPC/células ovas. Así, en trabajos anteriores de nuestro grupo, de forma similar a lo observado en este trabajo, se vio una activación potenciada de estas vías de señalización acompañando a una mayor reacción ductular y expansión de las HPC/células ovas en ratones BMP9-KO sometidos a daño hepático inducido por la dieta DDC (**Addante et al., 2018**). De manera inversa, en el trabajo de Ishikawa et al. (**Ishikawa et al., 2012**), usando el mismo modelo de daño hepático se mostró que la ausencia de c-MET en el hígado se correlaciona con una reducción de la expansión, diferenciación y migración de la población de HPC/células ovas, y con una ausencia de activación de ERK1/2-MAPK y AKT. Nuestros resultados también muestran una mayor expresión hepática de HGF en los ratones Δ EGFR, tanto a 2 como a 4 semanas de tratamiento, en comparación con los ratones WT, coincidiendo con el aumento en la expansión de las HPC/células ovas, así como mayores niveles de expresión de c-MET a tiempos tardíos (**Figura 37**). Estos resultados sugieren la sobreactivación de la vía de HGF/c-MET en los ratones Δ EGFR como mecanismo compensatorio para frenar el daño y recuperar la funcionalidad hepática, tal y como se ha observado en estudios previos en estos mismos ratones sometidos a PH (**López-Luque et al., 2016**). Para poder confirmar estos resultados hemos intentado analizar el estado de activación y señalización de la vía de HGF/c-MET en los hígados WT y Δ EGFR, tanto por inmunohistoquímica como por western blot e inmunoprecipitación, pero debido a problemas técnicos no hemos sido capaces de optimizar los protocolos. No obstante, de corroborarse estos resultados, podríamos especular que la vía de señalización de HGF/c-MET podría ser responsable de la fuerte activación de las vías ERK1/2-MAPK y PI3K/AKT en los ratones Δ EGFR, ya que la activación de ambas vías se ha asociado con respuestas activadas por c-MET en hepatocitos y HPC/células ovas (**Factor et al., 2010; Kitade et al., 2013; Martínez-Palacián et al., 2013**). Aun así, tampoco se puede descartar la activación de otras vías de señalización diferentes a la vía de HGF/c-MET para compensar la pérdida de EGFR en el hígado. Una vía potencialmente interesante es la de PDGFR α , para la cual se ha descrito un papel importante tanto durante el desarrollo embrionario hepático, concretamente para la proliferación de hepatoblastos, como durante la regeneración hepática tras PH (**Awuah et al., 2013**). Además, el silenciamiento del EGFR mediante shRNA dio lugar a un aumento en los niveles génicos y proteicos de PDGFR α , PDGFA y PDGFB, en hígado de rata tras PH, aunque éste es un modelo de regeneración vía hepatocitos, no vía HPC/células ovas (**Paranjpe et al., 2010**).

Otras señales candidatas a contribuir a la expansión de las HPC/células ovas son las señales inflamatorias. El análisis histopatológico realizado a partir de los cortes histológicos teñidos con H&E (**Figura 33**) y el análisis de los marcadores inflamatorios (**Figura 34**), revela una mayor respuesta inflamatoria, particularmente a nivel portal, en los ratones Δ EGFR tras el tratamiento con la dieta DDC, al mostrar una mayor expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como *IL6*, *IL1B*, *IL12B*, *IL17*, *CXCL1* y *CCL2* y una menor expresión de citoquinas antiinflamatorias como *IL4*. No obstante, el perfil de expresión de la citoquina proinflamatoria *TNF- α* fue diferente al resto, ya que se observó una menor expresión en los ratones Δ EGFR, apoyando la idea de que estos ratones presentan una respuesta inflamatoria modificada o alterada. Asimismo, estos animales también presentan una mayor activación de la vía de P-STAT3 (**Figura 35**), que refleja la señalización mediada por citoquinas y, por tanto, se asocia también a una mayor respuesta inflamatoria (**Wang et al., 2011**). Este aumento en la inflamación podría tener un papel positivo en la activación y expansión de las HPC/células ovas durante la respuesta regenerativa inducida por la dieta DDC, en base a la relación establecida entre dicho proceso y las citoquinas inflamatorias (**Knight et al., 2005b; Xiang et al., 2012; Ji et al., 2016; Guillot et al., 2018**). Así, la eliminación de macrófagos en el modelo regenerativo 2-AAF/PH en ratas, inhibe significativamente la expresión hepática de IL-6 y, junto con la falta de fosforilación de STAT3 durante las primeras etapas posteriores a la PH, la expansión de las HPC/células ovas y el proceso de regeneración hepática se ven gravemente comprometidos (**Xiang et al., 2012**). En este sentido, también merece la pena destacar que se ha asociado el efecto proliferativo de la IL-6 en HPC/células ovas con la inducción de la expresión de HGF y TWEAK (**Ji et al., 2016**). Otras citoquinas que regulan directamente las HPC/células ovas son la IL-17, que estimula la proliferación de las mismas, o la IL-27, que promueve su diferenciación hacia un fenotipo hepático (**Guillot et al., 2018**). También el incremento de la quimioquina CCL2 en hígado de rata regenerante se ha asociado a una mayor proliferación de las HPC/células ovas (**Zhao et al., 2016**). Por tanto, no se puede descartar que algunas de estas señales puedan estar actuando como señales compensatorias por la pérdida de EGFR en el hígado.

No está claro el nexo entre esta reacción inflamatoria potenciada y la falta de actividad catalítica del EGFR. Datos previos de nuestro grupo y otros han evidenciado un papel para EGFR en el proceso inflamatorio que acompaña al desarrollo del carcinoma hepatocelular, regulando la expresión de citoquinas y quimioquinas en células tumorales y macrófagos hepáticos (**Berasain et al., 2009; Huang et al., 2014b; Lanaya et al., 2014; López-Luque et al., 2016**). Sin embargo, si la vía del EGFR juega o no un papel clave en la respuesta inflamatoria que acompaña al daño colestásico está por determinar. Este es uno de los frentes de investigación abiertos en nuestro laboratorio actualmente.

Algunos de los análisis realizados en HPC/células ovas *in vitro* incluidos en esta memoria van en esa dirección, por lo que este punto se discutirá más adelante.

Por otro lado, dado que los resultados muestran un aumento de la reacción inflamatoria hepática en paralelo a un menor daño y una respuesta regenerativa aparentemente más eficiente, en hígados Δ EGFR, consideramos que sería interesante caracterizar mejor qué tipo de respuesta inflamatoria está teniendo lugar en nuestro modelo de estudio. Tras un daño hepático, los macrófagos residentes en el hígado, denominados células de Kupffer, se activan y ejercen efectos proinflamatorios, de cicatrización y de restauración en diferentes etapas del daño hepático y de la respuesta reparativa (**Vannella & Wynn, 2017**). Tradicionalmente, los macrófagos se han clasificado en dos subgrupos distintos denominados macrófagos M1 de activación clásica y M2 de activación alternativa. Los macrófagos de fenotipo M1 expresan niveles elevados de complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II), CD86, CD40 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS); se caracterizan por la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α , IL-1 o IL-12 o la producción de ROS; y juegan un papel fundamental desencadenando lesiones tisulares. Por su parte, los macrófagos de fenotipo M2 expresan CD163, el receptor de manosa (CD206), CD36 y arginasa-1; suprimen las respuestas inflamatorias mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias; y facilitan la reparación tisular (**Sun et al., 2017; Dong et al., 2019; Ahmed & Ismail, 2020; Nijland & Bansal, 2020**). Actualmente se están realizando estudios en el laboratorio en esta dirección, mediante el aislamiento y caracterización de las poblaciones de células inflamatorias por citometría de flujo, para intentar demostrar si la ausencia de actividad del EGFR conduce a un cambio en el patrón de respuesta inflamatoria consistente con un perfil más restaurador.

De forma global, nuestros resultados apoyan una regulación de la vía del EGFR durante el daño colestásico, así como un papel para dicha vía en la regulación del proceso regenerativo que lo acompaña. Todo apunta a que en este contexto el EGFR ejerce un papel regulador directo e indirecto en la biología de las HPC/células ovas *in vivo*. El hecho de que la ausencia de la actividad catalítica del EGFR en hepatocitos resulte en una mayor expansión de las HPC/células ovas a priori pensamos que estaría asociado a la sobreactivación de señales compensatorias (como podría ser la vía de HGF/c-MET, ERK1/2-MAPK y AKT, IL-6 o IL-17, entre otras), que intentan revertir el daño inicialmente incrementado en hepatocitos Δ EGFR y que en último término son capaces de promover una respuesta regenerativa más eficiente y recuperar la funcionalidad hepática. No se puede descartar que la respuesta inflamatoria alterada, y de alguna manera exacerbada, que se observa en los ratones Δ EGFR pueda intervenir favoreciendo la resolución del daño. El papel del EGFR en la inducción de esta respuesta inflamatoria aún está por determinar. Experimentos

adicionales en progreso nos ayudarán a contestar éstas y otras cuestiones que han quedado sin resolver, así como a esclarecer los mecanismos concretos implicados.

2. Estudio de la relevancia de la vía de señalización del EGFR en HPC/células ovals usando un modelo *in vitro* de daño colestásico

Para profundizar en el conocimiento del efecto regulador de la vía de señalización del EGFR en la expansión y función de las HPC/células ovals en un contexto colestásico, los estudios *in vivo* han sido complementados con estudios *in vitro* en un modelo que imita la enfermedad hepática colestásica basado en el tratamiento con las sales biliares GCDC y TCA, a concentraciones presentes en la bilis de pacientes con colestasis (Woolbright & Jaeschke, 2015). En la literatura, se ha descrito que el GCDC induce muerte en los hepatocitos de rata a concentraciones de 50 μM , aunque en otros modelos, como los hepatocitos humanos, esta concentración se eleva hasta 1000 μM (Woolbright & Jaeschke, 2015). Dado que no existe ningún dato en la literatura sobre la respuesta de las HPC/células ovals a las sales biliares, los resultados obtenidos tanto por tinción con cristal violeta como por ensayo de MTT demuestran por primera vez que estas sales inducen una respuesta citotóxica en las HPC/células ovals (Figura 38). Además, el hecho de que el efecto citotóxico de GCDC en las HPC/células ovals se observe a partir de concentraciones de 1500 μM sugiere que estas células son más resistentes que los hepatocitos a la acción citotóxica de las sales biliares. Resultados preliminares no mostrados en este trabajo indicarían que así es, dado que hepatocitos primarios adultos de ratón presentan un mayor porcentaje de pérdida de viabilidad a concentraciones de sales biliares a las que no hay efecto en las HPC/células ovals, efecto que sería interesante analizar más profundamente. Esta mayor resistencia de las HPC/células ovals es relevante ya que les conferiría ventajas de supervivencia respecto a los hepatocitos en un contexto de daño colestásico y les permitiría proliferar y expandirse en dicho contexto, jugando un papel de liderazgo en la respuesta regenerativa. Cabe mencionar que se ha descrito que los colangiocitos se protegen de los efectos tóxicos de los BAs, mediante la formación de micelas mixtas con fostafidilcolina y colesterol, o mediante el mantenimiento de un ambiente alcalino en la membrana apical, mantenido por los transportadores CFTR/ Cl^- y AE2/ HCO_3^- (Fickert & Wagner, 2017). Por tanto, dado el estrecho vínculo de linaje entre las HPC/células ovals y los colangiocitos parece sensato pensar que también las HPC/células ovals puedan expresar elementos que les sirvan de protección en el contexto de daño colestásico. Por otro lado, también sería interesante completar estos estudios utilizando otras sales biliares diferentes u otros agentes colestásicos como el ANIT para poder corroborar que las HPC/células ovals son más resistentes al daño colestásico. En cualquier

caso, queda por determinar el mecanismo a través del cual las sales biliares causan la muerte de las HPC/células ovas. A este respecto, existen trabajos que reflejan que éste puede ser tanto un proceso necrótico como apoptótico en hepatocitos dependiendo de la especie en estudio (necrosis en el caso de hepatocitos humanos o de ratón, o apoptosis en el caso de hepatocitos de ratas) (**Woolbright & Jaeschke, 2019**). Resultados preliminares del laboratorio no incluidos en esta memoria evidenciarían la inducción de un proceso necrótico, lo que iría en consonancia con lo descrito en hepatocitos de ratón.

Pese al importante efecto mitogénico y de supervivencia de la vía del EGFR en las HPC/células ovas (**Hu et al., 1996; Nagy et al., 1996; del Castillo et al., 2008; Martínez-Palacián et al., 2012**), nuestros resultados indican que ni el EGF ni el HB-EGF frenan el proceso de muerte inducido por las sales biliares. Además, en presencia de las sales biliares se produce la pérdida de la respuesta proliferativa de estos ligandos de la vía del EGFR (**Figura 39**). Esto discrepa de lo descrito en otras células, en las que la vía del EGFR es capaz de ejercer un efecto protector ante el daño colestásico. Así, en hepatocitos primarios adultos de ratón el ligando AR reduce los efectos citotóxicos de CDCA y el ácido litocólico (LCA), al prevenir la escisión de caspasa-3 y reducir la apoptosis (**Santamaría et al., 2019**). Por otro lado, en líneas de colangiocarcinoma y células epiteliales del ducto biliar transformadas con SV40 se ha observado que los BAs dan lugar a la transactivación del EGFR mediante un mecanismo dependiente del ligando TGF- α , lo cual resulta en la estimulación del crecimiento celular (**Werneburg et al., 2003**). Esta aparente discrepancia podría simplemente reflejar la diversidad de efectos de las sales biliares en las diferentes poblaciones celulares hepáticas, así como los diferentes papeles jugados por el EGFR en cada una de ellas.

El mecanismo que conduce a la falta de respuesta del EGFR no se conoce con exactitud. Para ahondar en este aspecto, se podrían realizar diferentes abordajes: es clave analizar la expresión del EGFR, así como la activación de la señalización del EGFR en respuesta a ligando en células tratadas con sales biliares, de modo que una atenuación de la señalización podría explicar la pérdida del efecto mitogénico observado en nuestros resultados. Asimismo, consideramos que la utilización de HPC/células ovas carentes de EGFR sería útil para confirmar si la vía es importante o no para la supervivencia de estas células en el contexto de daño colestásico. De esta manera se abren las puertas a futuros estudios encaminados a dilucidar los mecanismos directos o indirectos por los que la señalización de las sales biliares vía receptores de membrana acoplados a proteínas G, o a través de receptores nucleares (**Deutschmann et al., 2018**), podría alterar vías de señalización intracelulares, como la del EGFR.

Como ya se ha comentado anteriormente, existen estudios que han establecido una relación directa entre la respuesta inflamatoria caracterizada por la liberación de citoquinas que acompaña a diferentes tipos de daño hepático crónico y la expansión de las HPC/células ovas (Knight et al., 2005b; Guillot et al., 2018). Además, cabe destacar que aparte de sus efectos citotóxicos, también se ha visto que las sales biliares actúan como señales reguladoras que modulan la secreción de citoquinas y quimioquinas por parte de hepatocitos (Allen et al., 2011; Cai et al., 2017). Nuestros resultados van en esta línea ya que el tratamiento de las HPC/células ovas con las sales biliares induce la expresión de las citoquinas inflamatorias CXCL2 e IL6 (Figura 40), lo cual proporciona evidencias de la participación activa de las HPC/células ovas en la respuesta inflamatoria y anima a la realización de estudios sobre la interacción de las HPC/células ovas con otras células implicadas en el daño colestásico (macrófagos, células estrelladas). Por otro lado, nuestros resultados también evidencian un papel para la vía del EGFR en la modulación de la respuesta inflamatoria en las HPC/células ovas, ya que el tratamiento conjunto de sales biliares y EGF da lugar a una potenciación de la inducción de las citoquinas inflamatorias (Figura 40). Estos datos, por tanto, proporcionan nuevas evidencias que apoyan un papel para la vía del EGFR en la regulación de la respuesta inflamatoria hepática en diferentes contextos fisiopatológicos. De hecho, según estudios previos (Lanaya et al., 2014; López-Luque et al., 2016), el EGFR tendría un papel promotor tumoral en los macrófagos del hígado, de forma que tras la estimulación con IL-1, que es liberada por los hepatocitos dañados, el EGFR es requerido en los macrófagos hepáticos para inducir transcripcionalmente IL-6, que, a su vez, desencadena la proliferación compensatoria de los hepatocitos dañados y da lugar al desarrollo de HCC (Lanaya et al., 2014). En base a nuestros resultados y los datos de la literatura podríamos hipotetizar que un mayor daño inicial en hepatocitos Δ EGFR exacerbaría la activación de macrófagos y células estrelladas hepáticas potenciando así la inflamación. En este sentido, hay que tener en cuenta que en los ratones Δ EGFR solo está alterada la vía en células albúmina positivas, pero no en otras células con un papel crítico en las respuestas inflamatoria y pro-fibrótica, como son los macrófagos y células estrelladas hepáticas, por lo que la vía podría también estar contribuyendo a esta reacción inflamatoria a ese nivel. Si las HPC/células ovas podrían participar también en esta reacción en los hígados Δ EGFR no está claro, pero algunas evidencias del laboratorio no incluidas en esta memoria indicarían que la expresión del transgén en la población de HPC/células ovas sería heterogénea y en todo caso mucho menor que en hepatocitos, por lo que es probable que la vía esté al menos parcialmente activa en esta población. No obstante, convendría validar y completar los resultados *in vitro* analizando la expresión de otras citoquinas que puedan estar siendo secretadas por las HPC/células ovas en respuesta a las sales biliares, como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), la

proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α) y CCL5, basándonos en estudios previos que indican que estas citoquinas son moduladas por taurocolato en una línea de HPC/células ovas murinas (Pozniak et al., 2017). Además, también sería útil emplear HPC/células ovas carentes de EGFR para confirmar la implicación de la vía en la modulación de la respuesta inflamatoria en las HPC/células ovas.

Caminando en esa dirección, hemos llevado a cabo el aislamiento y caracterización de HPC/células ovas con la vía del EGFR inactivada a partir de ratones WT y Δ EGFR, estableciendo así las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC. Utilizando diferentes abordajes experimentales, que incluyen RT-qPCR, western blot, microscopía confocal y citometría de flujo, se ha validado el fenotipo de las células aisladas, HPC/células ovas WT-OC y Δ EGFR-OC, basándonos en la presencia de varios marcadores tanto de linaje biliar como de hepatocito maduro (que reflejan su carácter bipotencial) y de célula epitelial: A6, EPCAM, CK19, ALBÚMINA y E-CADHERINA (Figuras 42, 43 y 44) (Itoh & Miyajima, 2014; Chen et al., 2017). Al analizar los niveles de A6 y EPCAM por citometría de flujo (Figura 44), se obtienen aparentemente valores de porcentaje de células positivas más bajos de lo esperado, ya que en principio toda la población celular debería ser positiva para estos dos marcadores. Sin embargo, los histogramas muestran un desplazamiento completo del pico de absorbancia en ambos casos, aunque se superpone ligeramente con el fondo, lo cual da lugar a un porcentaje absoluto subestimado de células positivas. Más importante aún es el hecho de que se observa cierta heterogeneidad entre las líneas celulares en los niveles de expresión de estos marcadores. No obstante, esta heterogeneidad no parece seguir un patrón específico relacionado con el genotipo, sino que refleja la conocida heterogeneidad intrínseca de la población de las HPC/células ovas, que alberga células en diferentes etapas de maduración, característica que supone una limitación no solo a la hora de estudiar/caracterizar esta población sino también de su posible aplicación en terapia celular regenerativa por la dificultad de establecer su identidad exacta (Yovchev et al., 2008; Deng et al., 2011). Además, es importante señalar que las líneas celulares generadas no son líneas celulares clonales, por lo que las diferencias observadas son esperables. No obstante, podría ser interesante realizar un análisis más profundo del estado de diferenciación basal de estas líneas celulares, ya que, como se ha demostrado, la señalización inducida por el EGFR es fundamental para el compromiso de linaje epitelial biliar en las HPC/células ovas (Kitade et al., 2013), lo que hace pensar que en las células Δ EGFR-OC podría estar favorecida la diferenciación hacia hepatocitos.

La caracterización funcional de las líneas celulares WT-OC y Δ EGFR-OC indica una reducción en la activación de la vía de señalización del EGFR tras el tratamiento con EGF en las células Δ EGFR-OC, tanto a nivel de fosforilación del

propio receptor como a nivel de vías diana del EGFR (ERKs y AKT). De hecho, es en la activación de estas vías donde se observan unos efectos inhibitorios más pronunciados por la presencia del transgén en las HPC/células ovales: los efectos a nivel de fosforilación del EGFR no son muy marcados y no hay modulación en la activación de STAT3 (Figura 45). Ciertamente, esperábamos encontrar un mayor nivel de expresión proteica del transgén, ya que los datos obtenidos por RT-qPCR indicaban aparentemente unos buenos niveles de mRNA del mismo en las células Δ EGFR-OC (Figura 41B). Esta diferencia de resultados podría deberse bien a un problema de detección de la forma mutada del EGFR por el anticuerpo o a algún problema de estabilidad de la proteína, aspectos que quedan pendientes de analizar. No obstante, también es importante tener en cuenta que la expresión del transgén está bajo el control del promotor de albúmina, lo cual es un factor limitante del modelo porque, aunque las HPC/células ovales expresan albúmina (Figuras 42 y 43), los niveles de expresión puede que no sean lo suficientemente altos como para permitir una buena expresión del transgén. Esto sin duda podría suponer una limitación en la utilidad de las HPC/células ovales que hay que tener presente.

No obstante, a pesar de estos resultados, hemos observado una fuerte inhibición de la proliferación celular tras el tratamiento con EGF en las células Δ EGFR-OC (Figura 46), lo que demuestra que el transgén es funcional y puede causar un efecto dominante negativo y bloquear de forma significativa las acciones biológicas inducidas por el EGFR en estas células, como el efecto mitogénico (Martínez-Palacián et al., 2012). Resultados similares se habían visto previamente en una línea celular de hepatocitos Δ EGFR aislada de ratones Δ EGFR (López-Luque et al., 2016). Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el TGF- β induce un proceso de muerte por apoptosis en las HPC/células ovales que es rescatado por EGF (Martínez-Palacián et al., 2012). La caracterización funcional de la línea celular Δ EGFR-OC también demuestra pérdida de respuesta al EGF en términos de supervivencia, ya que tanto el contaje del número de células como el análisis de núcleos apoptóticos evidencian no solo un aumento de sensibilidad al efecto pro-apoptótico del TGF- β , sino también una pérdida del efecto protector del EGF (Figura 47). Asimismo, también se observa un aumento de la apoptosis basal (en ausencia de suero y de estímulos exógenos) en las células Δ EGFR-OC (Figura 47), lo que supone una prueba adicional de la existencia de una activación autocrina de la vía EGFR que promueve supervivencia (Martínez-Palacián et al., 2012). Las diferencias en viabilidad y apoptosis son más pronunciadas que las observadas en la señalización disparada por el TGF- β , que muestra un aumento de la fosforilación de SMAD2 en las células Δ EGFR-OC, pero que no alcanza significatividad con respecto a las células WT-OC (Figura 48). Sin duda, se podría profundizar más en los estudios a nivel de la señalización del TGF- β , y también se podría analizar el contenido de ROS en respuesta al TGF- β para poder

clarificar a qué nivel ejerce el EGFR su efecto protector, dado que la apoptosis inducida por TGF- β en las HPC/células ovals es dependiente del estrés oxidativo (Martínez-Palacián et al., 2013). Por último, para completar la caracterización funcional, se ha estudiado la respuesta a HGF y a los efectos mitogénicos del suero, no encontrándose diferencias entre las células WT-OC y Δ EGFR-OC (Figuras 49 y 50). El hecho de que el efecto mitogénico del HGF en las HPC/células ovals sea independiente de la actividad quinasa del EGFR confirma resultados previos de nuestro grupo que indicaban que los efectos de ambos factores de crecimiento son independientes uno del otro, así, el HGF induce un aumento en la síntesis del DNA en presencia de un inhibidor de la actividad quinasa del EGFR (AG1478) que es capaz de bloquear completamente el aumento en la síntesis del DNA inducido por el EGF en estas mismas células (Martínez-Palacián et al., 2012).

Adicionalmente a la generación de líneas de HPC/células ovals WT-OC y Δ EGFR-OC, se han generado y caracterizado HPC/células ovals deficientes en EGFR mediante la tecnología CRISPR/Cas9. Utilizando partículas lentivirales con sgrNAs dirigidos frente a distintos exones del EGFR se han obtenido diferentes clones de HPC/células ovals en los que se ha cancelado la expresión de EGFR, en los cuales no se observa activación de la vía de señalización del EGFR ni efecto mitogénico tras el tratamiento con EGF, quedando así validado funcionalmente el modelo celular (Figuras 52, 53 y 54). No obstante, cabe mencionar que al deletar una vía mitogénica importante para las células, como es la vía del EGFR, el problema que nos encontramos es que las células tienen dificultad para expandirse y mantenerse en cultivo, de modo que se acaban seleccionando aquellas que tienen alguna mínima expresión del EGFR, problema que es difícil de solventar.

En definitiva, hemos generado y caracterizado diferentes modelos de HPC/células ovals con la vía del EGFR alterada (células WT-OC y Δ EGFR-OC y HPC/células ovals deficientes en EGFR) con el objetivo de disponer de herramientas que nos permitan estudiar de manera más fina el papel de la vía del EGFR en la regulación de las propiedades y función de las HPC/células ovals, y esclarecer los mecanismos moleculares dependientes de EGFR implicados en la respuesta al daño colestásico, avanzando así en el conocimiento de la función de las HPC/células ovals en la fisiopatología hepática.

3. Discusión general

El estudio del comportamiento de las HPC/células ovals en un contexto de daño colestásico en presencia/ausencia de factores reguladores es clave para esclarecer nitidamente el papel de estas células en el hígado y permitirá

determinar su verdadero potencial regenerativo. Esta información podría proporcionar las bases moleculares para modular la respuesta de estas células ante un daño colestásico con objetivos terapéuticos.

Como ya se ha mencionado previamente, diferentes estudios han puesto de manifiesto un papel importante del EGFR no solo en la regeneración hepática tras PH y especialmente en la respuesta proliferativa de los hepatocitos (Natarajan et al., 2007; Paranjpe et al., 2010; López-Luque et al., 2016), sino también en su intervención en las enfermedades hepáticas colestásicas, donde su papel no está claramente definido (Takemura et al., 2013; Fuchs et al., 2014; Svinka et al., 2017; Santamaría et al., 2019; Xu et al., 2020). Hasta ahora apenas se disponían de datos en la literatura respecto al efecto de la inhibición de la vía del EGFR en la activación, expansión y/o destino de HPC/células ovas en modelos de daño hepático crónico, como es el caso de las enfermedades hepáticas colestásicas, donde estas células pueden jugar un papel determinante para la progresión de la enfermedad (Itoh, 2016; Chen et al., 2017). En el presente trabajo hemos demostrado un efecto regulador de la vía de señalización del EGFR en la expansión y función de las HPC/células ovas *in vivo* en un modelo de enfermedad hepática colestásica. Nuestros resultados indican que la ausencia de la actividad catalítica del EGFR en hepatocitos tiene un efecto beneficioso en el proceso regenerativo asociado al daño inducido por la dieta DDC, observándose una mayor expansión de la población de HPC/células ovas que va acompañada de una respuesta inflamatoria mayor y alterada, y un daño hepático aminorado o retrasado, lo que probablemente contribuya a una recuperación de la funcionalidad hepática más eficiente. Es factible que la ausencia de señalización de EGFR en hepatocitos pueda estar causando inicialmente mayor daño en el hígado tras el tratamiento con la dieta DDC, y que el hígado responda activando señales compensatorias que dan lugar a la reversión de la situación. Además, nuestros datos evidencian que la inactivación del EGFR en hepatocitos conduce a su vez a una alteración en la respuesta inflamatoria tras el tratamiento, lo que es consistente con el papel que se ha descrito para esta vía en la inducción de inflamación en contextos de daño hepático y/o hepatocarcinogénesis. Esa alteración de la respuesta inflamatoria podría implicar un cambio de una respuesta inflamatoria clásica hacia una respuesta inflamatoria restauradora que favorece la resolución del daño. La demostración de esta hipótesis, así como el esclarecimiento de las diferentes poblaciones implicadas y el papel exacto que jugaría la señalización vía EGFR en esta compleja respuesta son cuestiones que quedan pendientes de analizar en futuros experimentos.

Apoyándonos en trabajos anteriores realizados en hepatocitos (Clouzeau-Girard et al., 2006; Zhang et al., 2012; Woolbright & Jaeschke, 2015) y colangiocitos (Benedetti et al., 1997; Hohenester et al., 2012; Fickert &

Wagner, 2017), hemos puesto a punto un modelo *in vitro* de daño colestásico basado en el tratamiento con sales biliares, con el fin de que nos permita profundizar en el estudio del efecto regulador de la vía de señalización del EGFR en la expansión y función de las HPC/células ovals en este contexto de daño. Nuestros resultados han demostrado por primera vez que las sales biliares reducen la viabilidad de las HPC/células ovals, aunque presentan menor sensibilidad a la muerte en comparación con hepatocitos en otros modelos, lo que en sí mismo podría otorgarles a priori una ventaja de supervivencia en un contexto de daño colestásico. No obstante, pese al importante efecto mitogénico y de supervivencia de la vía del EGFR en las HPC/células ovals (**Hu et al., 1996; Nagy et al., 1996; del Castillo et al., 2008; Martínez-Palacián et al., 2012**), nuestros resultados sugieren que las sales biliares podrían interferir con los efectos beneficiosos y pro-regenerativos de la vía en las HPC/células ovals, lo que difiere de observaciones previas en hepatocitos o células epiteliales biliares, evidenciando una vez más respuestas y regulaciones diferenciales en distintas poblaciones. Asimismo, hemos demostrado no solo la implicación directa de las HPC/células ovals en la respuesta inflamatoria en un contexto de daño colestásico, sino un papel importante para la vía del EGFR a este nivel. Todos estos resultados nos han llevado a la generación y caracterización de las líneas celulares con la vía del EGFR alterada (células WT-OC y Δ EGFR-OC y HPC/células ovals deficientes en EGFR), que confiamos sean una herramienta valiosa para ahondar en el estudio del papel de la vía del EGFR en las HPC/células ovals en respuesta al daño colestásico.

En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idoneidad del modelo de ratón Δ EGFR para avanzar en el conocimiento de los mecanismos que gobiernan las respuestas celulares al daño hepático, a la vez que apoyan un papel importante de la vía de señalización del EGFR en la regulación de la regeneración hepática en el modelo de enfermedad hepática colestásica inducida por la dieta DDC y en la regulación del comportamiento de las HPC/células ovals. Esto, a su vez, abre nuevas perspectivas para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la función y destino de estas células, lo cual sin duda contribuirá en el futuro al desarrollo de nuevas terapias en enfermedades hepáticas crónicas.

10. CONCLUSIONES

1. La ausencia de actividad tirosina quinasa del EGFR en hepatocitos conduce a un daño hepático aminorado o retrasado y una regeneración más eficiente en respuesta a la dieta DDC.
2. La respuesta regenerativa hepática mejorada observada en ratones Δ EGFR sometidos a daño por DDC está acompañada de una mayor expansión de las HPC/células ovals y una respuesta inflamatoria hepática exacerbada y alterada.
3. Las sales biliares inducen en HPC/células ovals *in vitro* una respuesta citotóxica que no es contrarrestada por tratamiento con los ligandos del EGFR, EGF y HB-EGF. Además, en presencia de sales biliares, se pierde el efecto mitogénico de estos ligandos.
4. Las sales biliares promueven la secreción de quimioquinas y citoquinas por parte de las HPC/células ovals, efecto que es potenciado por el tratamiento con EGF.
5. Se han generado, validado y caracterizado dos modelos de HPC/células ovals con la vía del EGFR inactivada (células Δ EGFR-OC) o silenciada (HPC/células ovals deficientes en EGFR generadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9), como herramienta para clarificar el papel de la vía del EGFR en la regulación de las HPC/células ovals en un contexto de daño colestásico.

11. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Misih, S. R., & Bloomston, M. (2010). Liver anatomy. *The Surgical clinics of North America*, 90(4), 643-653.

Addante, A., Roncero, C., Almalé, L., Lazcanoiturburu, N., García-Álvaro, M., Fernández, M., Sanz, J., Hammad, S., Nwosu, Z. C., Lee, S. J., Fabregat, I., Dooley, S., Ten Dijke, P., Herrera, B., & Sánchez, A. (2018). Bone morphogenetic protein 9 as a key regulator of liver progenitor cells in DDC-induced cholestatic liver injury. *Liver international*, 38(9), 1664-1675.

Ahmed, I., & Ismail, N. (2020). M1 and M2 macrophages polarization via mTORC1 influences innate immunity and outcome of *Ehrlichia* infection. *Journal of cellular immunology*, 2(3), 108-115.

Akhurst, B., Croager, E. J., Farley-Roche, C. A., Ong, J. K., Dumble, M. L., Knight, B., & Yeoh, G. C. (2001). A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology*, 34(3), 519-522.

Allen, K., Jaeschke, H., & Copple, B. L. (2011). Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *The American journal of pathology*, 178(1), 175-186.

Anastasi, S., Baietti, M. F., Frosi, Y., Alemà, S., & Segatto, O. (2007). The evolutionarily conserved EBR module of RALT/MIG6 mediates suppression of the EGFR catalytic activity. *Oncogene*, 26(57), 7833-7846.

Apte, U., Thompson, M. D., Cui, S., Liu, B., Cieply, B., & Monga, S. P. (2008). Wnt/ β -catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology*, 47(1), 288-295.

Asrani, S. K., Devarbhavi, H., Eaton, J., & Kamath, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of hepatology*, 70(1), 151-171.

Avraham, R., & Yarden, Y. (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(2), 104-117.

Awuah, P. K., Nejak-Bowen, K. N., & Monga, S. P. (2013). Role and regulation of PDGFR α signaling in liver development and regeneration. *The American journal of pathology*, 182(5), 1648-1658.

Balogh, J., Victor III, D., Asham, E. H., Burroughs, S. G., Boktour, M., Saharia, A., Li, X., Ghobrial, R. M., & Monsour Jr, H. P. (2016). Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of hepatocellular carcinoma*, 3, 41-53.

Bangru, S., & Kalsotra, A. (2020). Cellular and molecular basis of liver regeneration. *Seminars in cell & developmental biology*, 100, 74-87.

Bellentani, S. (2017). The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international*, 37 Suppl 1, 81-84.

Benedetti, A., Alvaro, D., Bassotti, C., Gigliozzi, A., Ferretti, G., La Rosa, T., Di Sario, A., Baiocchi, L., & Jezequel, A. M. (1997). Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: a study in isolated bile ductule fragments and isolated perfused rat liver. *Hepatology*, 26(1), 9-21.

Benedict, M., & Zhang, X. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World journal of hepatology*, 9(16), 715-732.

Berasain, C., & Ávila, M. A. (2014). The EGFR signalling system in the liver: from hepatoprotection to hepatocarcinogenesis. *Journal of gastroenterology*, 49(1), 9-23.

Berasain, C., García-Trevijano, E. R., Castillo, J., Erroba, E., Lee, D. C., Prieto, J., & Ávila, M. A. (2005). Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*, 128(2), 424-432.

Berasain, C., Perugorria, M. J., Latasa, M. U., Castillo, J., Goñi, S., Santamaría, M., Prieto, J., & Ávila, M. A. (2009). The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Experimental biology and medicine*, 234(7), 713-725.

Berasain, C., Ujue Latasa, M., Urtasun, R., Goñi, S., Elizalde, M., Garcia-Irigoyen, O., Azcona, M., Prieto, J., & Ávila, M. A. (2011). Epidermal growth factor receptor (EGFR) crosstalks in liver cancer. *Cancers*, 3(2), 2444-2461.

Best, J., Dollé, L., Manka, P., Coombes, J., van Grunsven, L. A., & Syn, W. K. (2013). Role of liver progenitors in acute liver injury. *Frontiers in Physiology*, 4, 258.

Bhushan, B., Banerjee, S., Paranjpe, S., Koral, K., Mars, W. M., Stoops, J. W., Orr, A., Bowen, W. C., Locker, J., & Michalopoulos, G. K. (2019). Pharmacologic inhibition of epidermal growth factor receptor suppresses nonalcoholic fatty liver disease in a murine fast-food diet model. *Hepatology*, 70(5), 1546-1563.

Bi, Y., Liu, X., Si, C., Hong, Y., Lu, Y., Gao, P., Yang, Y., Zhang, X., Wang, Y., Xiong, H., Duan, Z., Chen, Y., & Hong, F. (2019). Transplanted adult human hepatic stem/progenitor cells prevent histogenesis of advanced hepatic fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride. *American journal of translational research*, 11(4), 2350-2358.

Bisgaard, H. C., Santoni-Rugiu, E., Nagy, P., & Thorgeirsson, S. S. (1998). Modulation of the plasminogen activator/plasmin system in rat liver regenerating by recruitment of oval cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 78(3), 237-246.

Blobel, C. P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(1), 32-43.

Blobel, C. P., Carpenter, G., & Freeman, M. (2009). The role of protease activity in ErbB biology. *Experimental cell research*, 315(4), 671-682.

- Borowiak, M., Garratt, A. N., Wüstefeld, T., Strehle, M., Trautwein, C., & Birchmeier, C. (2004). Met provides essential signals for liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(29), 10608-10613.
- Böttcher, K., & Pinzani, M. (2017). Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. *Advanced drug delivery reviews*, *121*, 3-8.
- Boulter, L., Lu, W. Y., & Forbes, S. J. (2013). Differentiation of progenitors in the liver: a matter of local choice. *The Journal of clinical investigation*, *123*(5), 1867-1873.
- Bria, A., Marda, J., Zhou, J., Sun, X., Cao, Q., Petersen, B. E., & Pi, L. (2017). Hepatic progenitor cell activation in liver repair. *Liver research*, *1*(2), 81-87.
- Bucher, N. L., Patel, U., & Cohen, S. (1977). Hormonal factors concerned with liver regeneration. *Ciba Foundation symposium*, (55), 95-107.
- Buckley, A. F., Burgart, L. J., Sahai, V., & Kakar, S. (2008). Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *American journal of clinical pathology*, *129*(2), 245-251.
- Byass, P. (2014). The global burden of liver disease: a challenge for methods and for public health. *BMC medicine*, *12*, 159.
- Cai, S. Y., Li, M., & Boyer, J. L. (2020). The role of bile acid-mediated inflammation in cholestatic liver injury. En Arias, I. M., Alter, H. J., Boyer, J. L., Cohen, D. E., Shafritz, D. A., Thorgeirsson, S. S., & Wolkoff, A. W. (Eds.). *The Liver: Biology and Pathobiology (6th Edition)*. John Wiley & Sons Ltd, 728-736.
- Cai, S. Y., Ouyang, X., Chen, Y., Soroka, C. J., Wang, J., Mennone, A., Wang, Y., Mehal, W. Z., Jain, D., & Boyer, J. L. (2017). Bile acids initiate cholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response. *JCI insight*, *2*(5), e90780.
- Caja, L., Sancho, P., Bertran, E., & Fabregat, I. (2011). Dissecting the effect of targeting the epidermal growth factor receptor on TGF- β -induced-apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of hepatology*, *55*(2), 351-358.
- Caldieri, G., Malabarba, M. G., Di Fiore, P. P., & Sigismund, S. (2018). EGFR trafficking in physiology and cancer. *Progress in molecular and subcellular biology*, *57*, 235-272.
- Cardinale, V., Wang, Y., Carpino, G., Cui, C. B., Gatto, M., Rossi, M., Berloco, P. B., Cantafora, A., Wauthier, E., Furth, M. E., Inverardi, L., Dominguez-Bendala, J., Ricordi, C., Gerber, D., Gaudio, E., Alvaro, D., & Reid, L. (2011). Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology*, *54*(6), 2159-2172.

Carmona-Cuenca, I., Herrera, B., Ventura, J. J., Roncero, C., Fernández, M., & Fabregat, I. (2006). EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF- β in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *Journal of cellular physiology*, 207(2), 322-330.

Carpino, G., Cardinale, V., Folseraas, T., Overi, D., Floreani, A., Franchitto, A., Onori, P., Cazzagon, N., Berloco, P. B., Karlsen, T. H., Alvaro, D., & Gaudio, E. (2018). Hepatic stem/progenitor cell activation differs between primary sclerosing and primary biliary cholangitis. *The American journal of pathology*, 188(3), 627-639.

Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J., & Pandolfi, P. P. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of clinical investigation*, 118(9), 3065-3074.

Carver, R. S., Stevenson, M. C., Scheving, L. A., & Russell, W. E. (2002). Diverse expression of ErbB receptor proteins during rat liver development and regeneration. *Gastroenterology*, 123(6), 2017-2027.

Chatterjee, R., & Mitra, A. (2015). An overview of effective therapies and recent advances in biomarkers for chronic liver diseases and associated liver cancer. *International immunopharmacology*, 24(2), 335-345.

Chen, J., Chen, L., Zern, M. A., Theise, N. D., Diehl, A. M., Liu, P., & Duan, Y. (2017). The diversity and plasticity of adult hepatic progenitor cells and their niche. *Liver International*, 37(9), 1260-1271.

Cheng, J. Y. K., & Wong, G. L. H. (2017). Advances in the diagnosis and treatment of liver fibrosis. *Hepatoma Research*, 3, 156-169.

Cheung, R. S., Brooling, J. T., Johnson, M. M., Riehle, K. J., Campbell, J. S., & Fausto, N. (2007). Interactions between MYC and transforming growth factor alpha alter the growth and tumorigenicity of liver progenitor cells. *Carcinogenesis*, 28(12), 2624-2631.

Chobert, M. N., Couchie, D., Fourcot, A., Zafrani, E. S., Laperche, Y., Mavier, P., & Brouillet, A. (2012). Liver precursor cells increase hepatic fibrosis induced by chronic carbon tetrachloride intoxication in rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 92(1), 135-150.

Chou, W. Y., Lu, C. N., Lee, T. H., Wu, C. L., Hung, K. S., Concejero, A. M., Jawan, B., & Wang, C. H. (2006). Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation. *Acta pharmacologica Sinica*, 27(4), 469-476.

Clouzeau-Girard, H., Guyot, C., Combe, C., Moronville-Halley, V., Housset, C., Lamireau, T., Rosenbaum, J., & Desmoulière, A. (2006). Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 86(3), 275-285.

- Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 1555-1562.
- Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C., & Chinkers, M. (1982). A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(3), 1523-1531.
- Collin de l'Hortet, A., Gilgenkrantz, H., & Guidotti, J. E. (2012). EGFR: A Master Piece in G1/S Phase Transition of Liver Regeneration. *International journal of hepatology*, 2012, 476910.
- Connolly, M. K., Bedrosian, A. S., Mallen-St Clair, J., Mitchell, A. P., Ibrahim, J., Stroud, A., Pachter, H. L., Bar-Sagi, D., Frey, A. B., & Miller, G. (2009). In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF- α . *The Journal of clinical investigation*, 119(11), 3213-3225.
- Crespo, J., Rivero, M., Fábrega, E., Cayón, A., Amado, J. A., García-Unzeta, M. T., & Pons-Romero, F. (2002). Plasma leptin and TNF- α levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis. *Digestive diseases and sciences*, 47(7), 1604-1610.
- Cuenda, A., & Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1358-1375.
- Czaja, A. J. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World journal of gastroenterology*, 20(10), 2515-2532.
- D'Agostino, Y., & D'Aniello, S. (2017). Molecular basis, applications and challenges of CRISPR/Cas9: a continuously evolving tool for genome editing. *Briefings in functional genomics*, 16(4), 211-216.
- Dai, Z., Song, G., Balakrishnan, A., Yang, T., Yuan, Q., Möbus, S., Weiss, A. C., Bentler, M., Zhu, J., Jiang, X., Shen, X., Bantel, H., Jaeckel, E., Kispert, A., Vogel, A., Saborowski, A., Büning, H., Manns, M., Cantz, T., Ott, M., & Sharma, A. D. (2020). Growth differentiation factor 11 attenuates liver fibrosis via expansion of liver progenitor cells. *Gut*, 69(6), 1104-1115.
- D'Ambrosio, R., Aghemo, A., Rumi, M. G., Ronchi, G., Donato, M. F., Paradis, V., Colombo, M., & Bedossa, P. (2012). A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology*, 56(2), 532-543.
- Darmadi, D., & Ruslie, R. H. (2021). Association between serum interleukin (IL)-12 level and severity of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*, 59(1), 66-72.

Darwiche, H., Oh, S. H., Steiger-Luther, N. C., Williams, J. M., Pintilie, D. G., Shupe, T. D., & Petersen, B. E. (2011). Inhibition of Notch signaling affects hepatic oval cell response in rat model of ZAAF-PH. *Hepatic medicine: evidence and research*, 3, 89-98.

de Juan, C., Benito, M., & Fabregat, I. (1992b). Regulation of albumin expression in fetal rat hepatocytes cultured under proliferative conditions: role of epidermal growth factor and hormones. *Journal of cellular physiology*, 152(1), 95-101.

de Juan, C., Benito, M., Álvarez, A., & Fabregat, I. (1992a). Differential proliferative response of cultured fetal and regenerating hepatocytes to growth factors and hormones. *Experimental cell research*, 202(2), 495-500.

del Castillo, G., Factor, V. M., Fernández, M., Alvarez-Barrientos, A., Fabregat, I., Thorgeirsson, S. S., & Sánchez, A. (2008). Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro. *The American journal of pathology*, 172(5), 1238-1247.

Delire, B., Stärkel, P., & Leclercq, I. (2015). Animal models for fibrotic liver diseases: what we have, what we need, and what is under development. *Journal of clinical and translational hepatology*, 3(1), 53-66.

Deng, H., Wang, H. F., Gao, Y. B., Jin, X. L., & Xiao, J. C. (2011). Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma. *Medical hypotheses*, 76(6), 809-812.

Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.

Derynck, R., & Budi, E. H. (2019). Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science signaling*, 12(570), eaav5183.

Deutschmann, K., Reich, M., Klindt, C., Dröge, C., Spomer, L., Häussinger, D., & Keitel, V. (2018). Bile acid receptors in the biliary tree: TGR5 in physiology and disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(4), 1319-1325.

Dianat, N., Dubois-Pot-Schneider, H., Steichen, C., Desterke, C., Leclerc, P., Raveux, A., Combettes, L., Weber, A., Corlu, A., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2014). Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells. *Hepatology*, 60(2), 700-714.

Dollé, L., Best, J., Mei, J., Al Battah, F., Reynaert, H., van Grunsven, L. A., & Geerts, A. (2010). The quest for liver progenitor cells: a practical point of view. *Journal of hepatology*, 52(1), 117-129.

Dong, X., Liu, J., Xu, Y., & Cao, H. (2019). Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice. *Experimental and therapeutic medicine*, 17(5), 3835-3847.

- Draghi, E., Armato, U., Andreis, P. G., & Mengato, L. (1980). The stimulation by epidermal growth factor (urogastrone) of the growth of neonatal rat hepatocytes in primary tissue culture and its modulation by serum and associated pancreatic hormones. *Journal of cellular physiology*, *103*(1), 129-147.
- Du, W. J., Zhen, J. H., Zeng, Z. Q., Zheng, Z. M., Xu, Y., Qin, L. Y., & Chen, S. J. (2013). Expression of interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. *Diagnostic pathology*, *8*, 40.
- Dumble, M. L., Croager, E. J., Yeoh, G. C., & Quail, E. A. (2002). Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, *23*(3), 435-445.
- Duncan, A. W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, *137*(2), 466-481.
- Dusabineza, A. C., Van Hul, N. K., Abarca-Quinones, J., Starkel, P., Najimi, M., & Leclercq, I. A. (2012). Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of evidence in the AAF/PH rat model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *92*(1), 72-81.
- Earp, H. S., & O'keefe, E. J. (1981). Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. *The Journal of clinical investigation*, *67*(5), 1580-1583.
- Ebrahimi, H., Naderian, M., & Sohrabpour, A. A. (2016). New concepts on pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis; a review article. *Middle East journal of digestive diseases*, *8*(3), 166-178.
- El-Emshaty, H. M., Nasif, W. A., & Mohamed, I. E. (2015). Serum cytokine of IL-10 and IL-12 in chronic liver disease: the immune and inflammatory response. *Disease markers*, *2015*, 707254.
- Ellis, E. L., & Mann, D. A. (2012). Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *Journal of hepatology*, *56*(5), 1171-1180.
- Engelhardt, N. V., Factor, V. M., Medvinsky, A. L., Baranov, V. N., Lazareva, M. N., & Poltoranina, V. S. (1993). Common antigen of oval and biliary epithelial cells (A6) is a differentiation marker of epithelial and erythroid cell lineages in early development of the mouse. *Differentiation; research in biological diversity*, *55*(1), 19-26.
- Erker, L., & Grompe, M. (2008). Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem cell research*, *1*(2), 90-102.
- Evarts, R. P., Hu, Z., Fujio, K., Marsden, E. R., & Thorgeirsson, S. S. (1993). Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor α , hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell growth & differentiation*, *4*(7), 555-561.

Fabregat, I. (2009). Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World journal of gastroenterology*, 15(5), 513-520.

Fabregat, I., Herrera, B., Fernández, M., Álvarez, A. M., Sánchez, A., Roncero, C., Ventura, J. J., Valverde, A. M., & Benito, M. (2000). Epidermal growth factor impairs the cytochrome C/caspase-3 apoptotic pathway induced by transforming growth factor β in rat fetal hepatocytes via a phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway. *Hepatology*, 32(3), 528-535.

Fabregat, I., Sánchez, A., Álvarez, A. M., Nakamura, T., & Benito, M. (1996). Epidermal growth factor, but not hepatocyte growth factor, suppresses the apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocytes in primary culture. *FEBS letters*, 384(1), 14-18.

Factor, V. M., Seo, D., Ishikawa, T., Kaposi-Novak, P., Marquardt, J. U., Andersen, J. B., Conner, E. A., & Thorgeirsson, S. S. (2010). Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PloS One*, 5(9), e12739.

Fausto, N., & Campbell, J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*, 120(1), 117-130.

Fenlon, M., Short, C., Xu, J., Malkoff, N., Mahdi, E., Hough, M., Glazier, A., Lee, C., Asahina, K., & Wang, K. S. (2020). Prominin-1-expressing hepatic progenitor cells induce fibrogenesis in murine cholestatic liver injury. *Physiological reports*, 8(14), e14508.

Fernández-Iglesias, A., & Gracia-Sancho, J. (2017). How to face chronic liver disease: the sinusoidal perspective. *Frontiers in medicine*, 4, 7.

Fickert, P., & Wagner, M. (2017). Biliary bile acids in hepatobiliary injury - What is the link?. *Journal of hepatology*, 67(3), 619-631.

Fickert, P., Stöger, U., Fuchsbichler, A., Moustafa, T., Marschall, H. U., Weiglein, A. H., Tsybrovskyy, O., Jaeschke, H., Zatloukal, K., Denk, H., & Trauner, M. (2007). A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *The American journal of pathology*, 171(2), 525-536.

Forbes, S. J., & Newsome, P. N. (2016). Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 13(8), 473-485.

Forbes, S. J., & Parola, M. (2011). Liver fibrogenic cells. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 25(2), 207-217.

Fuchs, B. C., Hoshida, Y., Fujii, T., Wei, L., Yamada, S., Lauwers, G. Y., McGinn, C. M., DePeralta, D. K., Chen, X., Kuroda, T., Lanuti, M., Schmitt, A. D., Gupta, S., Crenshaw, A., Onofrio, R., Taylor, B., Winckler, W., Bardeesy, N., Caravan, P., Golub, T. R., & Tanabe, K. K. (2014). Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59(4), 1577-1590.

Gadd, V. L., Skoien, R., Powell, E. E., Fagan, K. J., Winterford, C., Horsfall, L., Irvine, K., & Clouston, A. D. (2014). The portal inflammatory infiltrate and ductular reaction in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, *59*(4), 1393-1405.

Geervliet, E., & Bansal, R. (2020). Matrix metalloproteinases as potential biomarkers and therapeutic targets in liver diseases. *Cells*, *9*(5), 1212.

Giancotti, A., Monti, M., Nevi, L., Safarikia, S., D'Ambrosio, V., Brunelli, R., Pajno, C., Corno, S., Di Donato, V., Musella, A., Chiappetta, M. F., Bosco, D., Panici, P. B., Alvaro, D., & Cardinale, V. (2019). Functions and the emerging role of the foetal liver into regenerative medicine. *Cells*, *8*(8), 914.

Gielsing, R. G., Wallace, K., & Han, Y. P. (2009). Interleukin-1 participates in the progression from liver injury to fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *296*(6), G1324-G1331.

Gil-Farina, I., Di Scala, M., Salido, E., López-Franco, E., Rodríguez-García, E., Blasi, M., Merino, J., Aldabe, R., Prieto, J., & Gonzalez-Aseguinolaza, G. (2016). Transient expression of transgenic IL-12 in mouse liver triggers unremitting inflammation mimicking human autoimmune hepatitis. *The Journal of Immunology*, *197*(6), 2145-2156.

Gilgenkrantz, H., & Collin de l'Hortet, A. (2018). Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine. *The American journal of pathology*, *188*(6), 1316-1327.

Giraldo, P., & Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic research*, *10*(2), 83-103.

Grompe, M. (2005). The origin of hepatocytes. *Gastroenterology*, *128*(7), 2158-2160.

Guillot, A., Gasmi, I., Brouillet, A., Ait-Ahmed, Y., Calderaro, J., Ruiz, I., Gao, B., Lotersztajn, S., Pawlotsky, J. M., & Lafdil, F. (2018). Interleukins-17 and 27 promote liver regeneration by sequentially inducing progenitor cell expansion and differentiation. *Hepatology communications*, *2*(3), 329-343.

Gur, G., Rubin, C., Katz, M., Amit, I., Citri, A., Nilsson, J., Amariglio, N., Henriksson, R., Rechavi, G., Hedman, H., Wides, R., & Yarden, Y. (2004). LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *The EMBO journal*, *23*(16), 3270-3281.

Hanada, N., Lo, H. W., Day, C. P., Pan, Y., Nakajima, Y., & Hung, M. C. (2006). Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor. *Molecular carcinogenesis*, *45*(1), 10-17.

Hara, M., Kono, H., Furuya, S., Hirayama, K., Tsuchiya, M., & Fujii, H. (2013). Interleukin-17A plays a pivotal role in cholestatic liver fibrosis in mice. *The Journal of surgical research*, *183*(2), 574-582.

Hart, P. H., Vitti, G. F., Burgess, D. R., Whitty, G. A., Piccoli, D. S., & Hamilton, J. A. (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(10), 3803-3807.

Hata, S., Namae, M., & Nishina, H. (2007). Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Development, growth & differentiation*, *49*(2), 163-170.

Hattoum, A., Rubin, E., Orr, A., & Michalopoulos, G. K. (2013). Expression of hepatocyte epidermal growth factor receptor, FAS and glypican 3 in EpCAM-positive regenerative clusters of hepatocytes, cholangiocytes, and progenitor cells in human liver failure. *Human pathology*, *44*(5), 743-749.

Heinrichs, D., Berres, M. L., Nellen, A., Fischer, P., Scholten, D., Trautwein, C., Wasmuth, H. E., & Sahin, H. (2013). The chemokine CCL3 promotes experimental liver fibrosis in mice. *PLoS One*, *8*(6), e66106.

Heydari, Z., Najimi, M., Mirzaei, H., Shpichka, A., Ruoss, M., Farzaneh, Z., Montazeri, L., Piryaei, A., Timashev, P., Gramignoli, R., Nussler, A., Baharvand, H., & Vosough, M. (2020). Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*, *9*(2), 304.

Hohenester, S., Wenniger, L. M., Paulusma, C. C., van Vliet, S. J., Jefferson, D. M., Elferink, R. P., & Beuers, U. (2012). A biliary HCO₃⁻ umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology*, *55*(1), 173-183.

Hu, Z., Evarts, R. P., Fujio, K., Omori, N., Omori, M., Marsden, E. R., & Thorgeirsson, S. S. (1996). Expression of transforming growth factor alpha/epidermal growth factor receptor, hepatocyte growth factor/c-met and acidic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptors during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, *17*(5), 931-938.

Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., & Sorkin, A. (2006b). Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular cell*, *21*(6), 737-748.

Huang, G., Besner, G. E., & Brigstock, D. R. (2012). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor suppresses experimental liver fibrosis in mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *92*(5), 703-712.

Huang, P., Xu, X., Wang, L., Zhu, B., Wang, X., & Xia, J. (2014b). The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *Journal of cellular and molecular medicine*, *18*(2), 218-230.

Huang, X., Wang, X., Lv, Y., Xu, L., Lin, J., & Diao, Y. (2014a). Protection effect of kallistatin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via antioxidative stress. *PLoS One*, *9*(2), e88498.

Huang, Y. H., Shi, M. N., Zheng, W. D., Zhang, L. J., Chen, Z. X., & Wang, X. Z. (2006a). Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *12*(9), 1386-1391.

Huh, C. G., Factor, V. M., Sánchez, A., Uchida, K., Conner, E. A., & Thorgeirsson, S. S. (2004). Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(13), 4477-4482.

Hynes, N. E., & MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current opinion in cell biology*, *21*(2), 177-184.

Hynes, N. E., & Schlang, T. (2006). Targeting ADAMS and ERBBs in lung cancer. *Cancer cell*, *10*(1), 7-11.

Isfort, R. J., Cody, D. B., Richards, W. G., Yoder, B. K., Wilkinson, J. E., & Woychik, R. P. (1998). Characterization of growth factor responsiveness and alterations in growth factor homeostasis involved in the tumorigenic conversion of mouse oval cells. *Growth Factors*, *15*(2), 81-94.

Ishikawa, T., Factor, V. M., Marquardt, J. U., Raggi, C., Seo, D., Kitade, M., Conner, E. A., & Thorgeirsson, S. S. (2012). Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology*, *55*(4), 1215-1226.

Ito, Y., Takeda, T., Sakon, M., Tsujimoto, M., Higashiyama, S., Noda, K., Miyoshi, E., Monden, M., & Matsuura, N. (2001). Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer*, *84*(10), 1377-1383.

Itoh, T. (2016). Stem/progenitor cells in liver regeneration. *Hepatology*, *64*(2), 663-668.

Itoh, T., & Miyajima, A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology*, *59*(4), 1617-1626.

Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T. J., Park, T. J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y. H., Meng, F., Asagiri, M., Murray, L. A., Hofmann, A. F., Iida, T., Glass, C. K., Brenner, D. A., & Kisseleva, T. (2014). Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(32), E3297-E3305.

Jansen, P. L., Ghallab, A., Vartak, N., Reif, R., Schaap, F. G., Hampe, J., & Hengstler, J. G. (2017). The ascending pathophysiology of cholestatic liver disease. *Hepatology*, *65*(2), 722-738.

- Ji, T., Li, G., Chen, J., Zhao, J., Li, X., Lin, H., Cai, X., & Cang, Y. (2016). Distinct role of interleukin-6 and tumor necrosis factor receptor-1 in oval cell-mediated liver regeneration and inflammation-associated hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 7(41), 66635-66646.
- Jo, M., Stolz, D. B., Esplen, J. E., Dorko, K., Michalopoulos, G. K., & Strom, S. C. (2000). Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8806-8811.
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., & Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research*, 284(1), 31-53.
- Kanda, D., Takagi, H., Toyoda, M., Horiguchi, N., Nakajima, H., Otsuka, T., & Mori, M. (2002). Transforming growth factor α protects against Fas-mediated liver apoptosis in mice. *FEBS letters*, 519(1-3), 11-15.
- Kaneda, M., Kashiwamura, S., Ueda, H., Sawada, K., Sugihara, A., Terada, N., Kimura-Shimmyo, A., Fukuda, Y., Shimoyama, T., & Okamura, H. (2003). Inflammatory liver steatosis caused by IL-12 and IL-18. *Journal of interferon & cytokine research*, 23(3), 155-162.
- Karin, D., Koyama, Y., Brenner, D., & Kisseleva, T. (2016). The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis. *Differentiation; research in biological diversity*, 92(3), 84-92.
- Kario, E., Marmor, M. D., Adamsky, K., Citri, A., Amit, I., Amariglio, N., Rechavi, G., & Yarden, Y. (2005). Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 7038-7048.
- Katz, S., Ayala, V., Santillán, G., & Boland, R. (2011). Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y₂ receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 513(2), 144-152.
- Kaur, S., Siddiqui, H., & Bhat, M. H. (2015). Hepatic progenitor cells in action: liver regeneration or fibrosis?. *The American journal of pathology*, 185(9), 2342-2350.
- Kholodenko, I. V., & Yarygin, K. N. (2017). Cellular mechanisms of liver regeneration and cell-based therapies of liver diseases. *BioMed research international*, 2017, 8910821.
- Kil, S. J., & Carlin, C. (2000). EGF receptor residues leu(679), leu(680) mediate selective sorting of ligand-receptor complexes in early endosomal compartments. *Journal of cellular physiology*, 185(1), 47-60.
- Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Higashiyama, S., Ito, N., Tsushima, H., Taniguchi, N., & Matsuzawa, Y. (1995). Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth

factor as a hepatotrophic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*, 22(5), 1584-1590.

Kiso, S., Kawata, S., Tamura, S., Inui, Y., Yoshida, Y., Sawai, Y., Umeki, S., Ito, N., Yamada, A., Miyagawa, J., Higashiyama, S., Iwawaki, T., Saito, M., Taniguchi, N., Matsuzawa, Y., & Kohno, K. (2003). Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology*, 124(3), 701-707.

Kitade, M., Factor, V. M., Andersen, J. B., Tomokuni, A., Kaji, K., Akita, H., Holczbauer, A., Seo, D., Marquardt, J. U., Conner, E. A., Lee, S. B., Lee, Y. H., & Thorgeirsson, S. S. (2013). Specific fate decisions in adult hepatic progenitor cells driven by MET and EGFR signaling. *Genes & development*, 27(15), 1706-1717.

Kitade, M., Kaji, K., Nishimura, N., Seki, K., Nakanishi, K., Tsuji, Y., Sato, S., Saikawa, S., Takaya, H., Kawaratani, H., Namisaki, T., Moriya, K., Mitoro, A., & Yoshiji, H. (2019). Blocking development of liver fibrosis augments hepatic progenitor cell-derived liver regeneration in a mouse chronic liver injury model. *Hepatology research*, 49(9), 1034-1045.

Knight, B., Matthews, V. B., Akhurst, B., Croager, E. J., Klinken, E., Abraham, L. J., Olynyk, J. K., & Yeoh, G. (2005b). Liver inflammation and cytokine production, but not acute phase protein synthesis, accompany the adult liver progenitor (oval) cell response to chronic liver injury. *Immunology and cell biology*, 83(4), 364-374.

Knight, B., Matthews, V. B., Olynyk, J. K., & Yeoh, G. C. (2005a). Jekyll and Hyde: evolving perspectives on the function and potential of the adult liver progenitor (oval) cell. *Bioessays*, 27(11), 1192-1202.

Köhn-Gaone, J., Gogoi-Tiwari, J., Ramm, G. A., Olynyk, J. K., & Tirnitz-Parker, J. E. (2016). The role of liver progenitor cells during liver regeneration, fibrogenesis, and carcinogenesis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 310(3), G143-G154.

Komposch, K., & Sibilica, M. (2015). EGFR signaling in liver diseases. *International journal of molecular sciences*, 17(1), 30.

Kong, X., Feng, D., Wang, H., Hong, F., Bertola, A., Wang, F. S., & Gao, B. (2012). Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 56(3), 1150-1159.

Kordes, C., Sawitzka, I., Götze, S., Herebian, D., & Häussinger, D. (2014). Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *The Journal of clinical investigation*, 124(12), 5503-5515.

Kovalovich, K., DeAngelis, R. A., Li, W., Furth, E. E., Ciliberto, G., & Taub, R. (2000). Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology*, 31(1), 149-159.

Kuramitsu, K., Sverdlov, D. Y., Liu, S. B., Csizmadia, E., Burkly, L., Schuppan, D., Hanto, D. W., Otterbein, L. E., & Popov, Y. (2013). Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation. *The American journal of pathology*, *183*(1), 182-194.

Laederich, M. B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway III, K. L., & Sweeney, C. (2004). The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(45), 47050-47056.

Lanaya, H., Natarajan, A., Komposch, K., Li, L., Amberg, N., Chen, L., Wculek, S. K., Hammer, M., Zenz, R., Peck-Radosavljevic, M., Sieghart, W., Trauner, M., Wang, H., & Sibilina, M. (2014). EGFR has a tumour-promoting role in liver macrophages during hepatocellular carcinoma formation. *Nature cell biology*, *16*(10), 972-977.

Le Roy, C., & Wrana, J. L. (2005). Clathrin-and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *6*(2), 112-126.

Lee, J. S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I. S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D. F., Mikaelyan, A., Roberts, L. R., Demetris, A. J., Sun, Z., Nevens, F., Roskams, T., & Thorgeirsson, S. S. (2006). A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nature medicine*, *12*(4), 410-416.

Lee, T. K. W., Castilho, A., Ma, S., & Ng, I. O. L. (2009). Liver cancer stem cells: implications for a new therapeutic target. *Liver International*, *29*(7), 955-965.

Lee, Y. A., Wallace, M. C., & Friedman, S. L. (2015). Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut*, *64*(5), 830-841.

Lee, Y., Doumouras, A. G., Yu, J., Brar, K., Banfield, L., Gmora, S., Anvari, M., & Hong, D. (2019). Complete resolution of nonalcoholic fatty liver disease after bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology*, *17*(6), 1040-1060.

Lemmon, M. A., Freed, D. M., Schlessinger, J., & Kiyatkin, A. (2016). The dark side of cell signaling: positive roles for negative regulators. *Cell*, *164*(6), 1172-1184.

Lemmon, M. A., Schlessinger, J., & Ferguson, K. M. (2014). The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *6*(4), a020768.

Lemoinne, S., & Friedman, S. L. (2019). New and emerging anti-fibrotic therapeutics entering or already in clinical trials in chronic liver diseases. *Current opinion in pharmacology*, *49*, 60-70.

Li, T., & Chiang, J. Y. (2020). Bile acid metabolism in health and disease: an update. En Arias, I. M., Alter, H. J., Boyer, J. L., Cohen, D. E., Shafritz, D. A., Thorgeirsson, S. S., &

Wolkoff, A. W. (Eds.). *The Liver: Biology and Pathobiology (6th Edition)*. John Wiley & Sons Ltd, 271-285.

Liang, D., Chen, H., Zhao, L., Zhang, W., Hu, J., Liu, Z., Zhong, P., Wang, W., Wang, J., & Liang, G. (2018). Inhibition of EGFR attenuates fibrosis and stellate cell activation in diet-induced model of nonalcoholic fatty liver disease. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(1), 133-142.

Liebmann, C., & Böhmer, F. D. (2000). Signal transduction pathways of G protein-coupled receptors and their cross-talk with receptor tyrosine kinases: lessons from bradykinin signaling. *Current medicinal chemistry*, 7(9), 911-943.

Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., & Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nature cell biology*, 3(9), 802-808.

Liu, M. L., Mars, W. M., Zarnegar, R., & Michalopoulos, G. K. (1994). Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- α in adult rat liver. *Hepatology*, 19(6), 1521-1527.

Liu, W. T., Jing, Y. Y., Gao, L., Li, R., Yang, X., Pan, X. R., Yang, Y., Meng, Y., Hou, X. J., Zhao, Q. D., Han, Z. P., & Wei, L. X. (2020). Lipopolysaccharide induces the differentiation of hepatic progenitor cells into myofibroblasts constitutes the hepatocarcinogenesis-associated microenvironment. *Cell death and differentiation*, 27(1), 85-101.

Liu, Y., Meyer, C., Xu, C., Weng, H., Hellerbrand, C., ten Dijke, P., & Dooley, S. (2013). Animal models of chronic liver diseases. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 304(5), G449-G468.

Lo, H. W., Hsu, S. C., Ali-Seyed, M., Gunduz, M., Xia, W., Wei, Y., Bartholomeusz, G., Shih, J. Y., & Hung, M. C. (2005). Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer cell*, 7(6), 575-589.

Lombard, C. A., Prigent, J., & Sokal, E. M. (2013). Human liver progenitor cells for liver repair. *Cell medicine*, 5(1), 1-16.

López-Luque, J., Caballero-Díaz, D., Martínez-Palacián, A., Roncero, C., Moreno-Càceres, J., García-Bravo, M., Grueso, E., Fernández, A., Crosas-Molist, E., García-Álvaro, M., Addante, A., Bertran, E., Valverde, A. M., González-Rodríguez, Á., Herrera, B., Montoliu, L., Serrano, T., Segovia, J. C., Fernández, M., Ramos, E., Sánchez, A., & Fabregat, I. (2016). Dissecting the role of epidermal growth factor receptor catalytic activity during liver regeneration and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 63(2), 604-619.

Lorenzini, S., Bird, T. G., Boulter, L., Bellamy, C., Samuel, K., Aucott, R., Clayton, E., Andreone, P., Bernardi, M., Golding, M., Alison, M. R., Iredale, J. P., & Forbes, S. J. (2010). Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut*, 59(5), 645-654.

- Lukacs-Kornek, V., & Lammert, F. (2017). The progenitor cell dilemma: cellular and functional heterogeneity in assistance or escalation of liver injury. *Journal of hepatology*, *66*(3), 619-630.
- Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). IKK β couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, *121*(7), 977-990.
- Malarkey, D. E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., & Maronpot, R. R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic pathology*, *33*(1), 27-34.
- Mallat, A., & Lotersztajn, S. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. *American journal of physiology. Cell physiology*, *305*(8), C789-C799.
- Mao, S. A., Glorioso, J. M., & Nyberg, S. L. (2014). Liver regeneration. *Translational research*, *163*(4), 352-362.
- Marcellin, P., & Kutala, B. K. (2018). Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver international*, *38 Suppl 1*, 2-6.
- Marcellin, P., Gane, E., Buti, M., Afdhal, N., Sievert, W., Jacobson, I. M., Washington, M. K., Germanidis, G., Flaherty, J. F., Aguilar Schall, R., Bornstein, J. D., Kitrinis, K. M., Subramanian, G. M., McHutchison, J. G., & Heathcote, E. J. (2013). Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *The Lancet*, *381*(9865), 468-475.
- Marra, F., & Tacke, F. (2014). Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*, *147*(3), 577-594.
- Martínez-Palacián, A., del Castillo, G., Herrera, B., Fernández, M., Roncero, C., Fabregat, I., & Sánchez, A. (2012). EGFR is dispensable for c-Met-mediated proliferation and survival activities in mouse adult liver oval cells. *Cellular signalling*, *24*(2), 505-513.
- Martínez-Palacián, A., del Castillo, G., Suárez-Causado, A., García-Álvaro, M., de Morena-Frutos, D., Fernández, M., Roncero, C., Fabregat, I., Herrera, B., & Sánchez, A. (2013). Mouse hepatic oval cells require Met-dependent PI3K to impair TGF- β -induced oxidative stress and apoptosis. *PLoS One*, *8*(1), e53108.
- Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *13*(10), 616-630.
- McGowan, J. A., Strain, A. J., & Bucher, N. L. (1981). DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *Journal of cellular physiology*, *108*(3), 353-363.

McKee, C., Sigala, B., Soeda, J., Mouralidarane, A., Morgan, M., Mazzoccoli, G., Rappa, F., Cappello, F., Cabibi, D., Paziienza, V., Selden, C., Roskams, T., Vinciguerra, M., & Oben, J. A. (2015). Amphiregulin activates human hepatic stellate cells and is upregulated in non alcoholic steatohepatitis. *Scientific reports*, 5, 8812.

Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *Journal of cellular physiology*, 213(2), 286-300.

Michalopoulos, G. K. (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *The American journal of pathology*, 176(1), 2-13.

Michalopoulos, G. K. (2013). Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Comprehensive physiology*, 3(1), 485-513.

Michalopoulos, G. K. (2014). Advances in liver regeneration. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 8(8), 897-907.

Michalopoulos, G. K., & Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(1), 40-55.

Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., & Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*, 376(6538), 337-341.

Mishra, L., Banker, T., Murray, J., Byers, S., Thenappan, A., He, A. R., Shetty, K., Johnson, L., & Reddy, E. P. (2009). Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 49(1), 318-329.

Mitchell, C., Nivison, M., Jackson, L. F., Fox, R., Lee, D. C., Campbell, J. S., & Fausto, N. (2005). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(4), 2562-2568.

Morales-Ruiz, M., Santel, A., Ribera, J., & Jiménez, W. (2017). The role of Akt in chronic liver disease and liver regeneration. *Seminars in liver disease*, 37(1), 11-16.

Morandell, S., Stasyk, T., Skvortsov, S., Ascher, S., & Huber, L. A. (2008). Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics*, 8(21), 4383-4401.

Morgillo, F., Woo, J. K., Kim, E. S., Hong, W. K., & Lee, H. Y. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer research*, 66(20), 10100-10111.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Murillo, M. M., del Castillo, G., Sánchez, A., Fernández, M., & Fabregat, I. (2005). Involvement of EGF receptor and c-Src in the survival signals induced by TGF- β 1 in hepatocytes. *Oncogene*, 24(28), 4580-4587.

Musallam, L., Ethier, C., Haddad, P. S., & Bilodeau, M. (2001). Role of EGF receptor tyrosine kinase activity in antiapoptotic effect of EGF on mouse hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 280(6), G1360-G1369.

Nagy, P., Bisgaard, H. C., Santoni-Rugiu, E., & Thorgeirsson, S. S. (1996). In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene. *Hepatology*, 23(1), 71-79.

Naseem, S., Hussain, T., & Manzoor, S. (2018). Interleukin-6: A promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies. *Cytokine & growth factor reviews*, 39, 36-45.

Nasir, G. A., Mohsin, S., Khan, M., Shams, S., Ali, G., Khan, S. N., & Riazuddin, S. (2013). Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. *Journal of translational medicine*, 11, 78.

Natarajan, A., Wagner, B., & Sibia, M. (2007). The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17081-17086.

Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., & Karin, M. (2007). Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317(5834), 121-124.

Neben, C. L., Lo, M., Jura, N., & Klein, O. D. (2019). Feedback regulation of RTK signaling in development. *Developmental biology*, 447(1), 71-89.

Nelson, D. R., Lauwers, G. Y., Lau, J. Y., & Davis, G. L. (2000). Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology*, 118(4), 655-660.

Nevzorova, Y. A., Boyer-Diaz, Z., Cubero, F. J., & Gracia-Sancho, J. (2020). Animal models for liver disease - A practical approach for translational research. *Journal of hepatology*, 73(2), 423-440.

Nicholson, S. E., Metcalf, D., Sprigg, N. S., Columbus, R., Walker, F., Silva, A., Cary, D., Willson, T. A., Zhang, J. G., Hilton, D. J., Alexander, W. S., & Nicola, N. A. (2005). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7), 2328-2333.

- Nijland, H., & Bansal, R. (2020). Therapeutic targeting of hepatic macrophages. *Current Tissue Microenvironment Reports*, 1, 113-120.
- Njoku, D. B. (2010). Suppressive and pro-inflammatory roles for IL-4 in the pathogenesis of experimental drug-induced liver injury: a review. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(5), 519-531.
- Oertel, M., Menthena, A., Chen, Y. Q., Teisner, B., Jensen, C. H., & Shafritz, D. A. (2008). Purification of fetal liver stem/progenitor cells containing all the repopulation potential for normal adult rat liver. *Gastroenterology*, 134(3), 823-832.
- O'Reilly, S., Ciechomska, M., Cant, R., & van Laar, J. M. (2014). Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor- β (TGF- β) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9952-9960.
- Oсна, N. A., Donohue Jr, T. M., & Kharbanda, K. K. (2017). Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management. *Alcohol research: current reviews*, 38(2), 147-161.
- Pagan, R., Sánchez, A., Martín, I., Llobera, M., Fabregat, I., & Vilaró, S. (1999). Effects of growth and differentiation factors on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *Journal of hepatology*, 31(5), 895-904.
- Pan, X. R., Jing, Y. Y., Liu, W. T., Han, Z. P., Li, R., Yang, Y., Zhu, J. N., Li, X. Y., Li, P. P., & Wei, L. X. (2017). Lipopolysaccharide induces the differentiation of hepatic progenitor cells into myofibroblasts via activation of the Hedgehog signaling pathway. *Cell cycle*, 16(14), 1357-1365.
- Papp, V., Rókus, A., Dezső, K., Bugyik, E., Szabó, V., Pávai, Z., Paku, S., & Nagy, P. (2014). Expansion of hepatic stem cell compartment boosts liver regeneration. *Stem cells and development*, 23(1), 56-65.
- Paranjpe, S., Bowen, W. C., Tseng, G. C., Luo, J. H., Orr, A., & Michalopoulos, G. K. (2010). RNA interference against hepatic epidermal growth factor receptor has suppressive effects on liver regeneration in rats. *The American journal of pathology*, 176(6), 2669-2681.
- Park, B. J., Lee, Y. J., & Lee, H. R. (2014). Chronic liver inflammation: clinical implications beyond alcoholic liver disease. *World journal of gastroenterology*, 20(9), 2168-2175.
- Parola, M., & Pinzani, M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Molecular aspects of medicine*, 65, 37-55.
- Pellat, A., Vaquero, J., & Fouassier, L. (2018). Role of ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases in cholangiocyte biology. *Hepatology*, 67(2), 762-773.

Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P., & Fallowfield, J. A. (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology*, *14*(3), 181-194.

Peng, Z. W., Ikenaga, N., Liu, S. B., Sverdlov, D. Y., Vaid, K. A., Dixit, R., Weinreb, P. H., Violette, S., Sheppard, D., Schuppan, D., & Popov, Y. (2016). Integrin $\alpha\beta 6$ critically regulates hepatic progenitor cell function and promotes ductular reaction, fibrosis, and tumorigenesis. *Hepatology*, *63*(1), 217-232.

Perugorria, M. J., Latasa, M. U., Nicou, A., Cartagena-Lirola, H., Castillo, J., Goñi, S., Vespasiani-Gentilucci, U., Zagami, M. G., Lotersztajn, S., Prieto, J., Berasain, C., & Ávila, M. A. (2008). The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology*, *48*(4), 1251-1261.

Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S., & Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*, *284*(5417), 1168-1170.

Pi, L., Oh, S. H., Shupe, T., & Petersen, B. E. (2005). Role of connective tissue growth factor in oval cell response during liver regeneration after 2-AAF/PHx in rats. *Gastroenterology*, *128*(7), 2077-2088.

Pinzani, M., & Luong, T. V. (2018). Pathogenesis of biliary fibrosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular Basis of Disease*, *1864*(4), 1279-1283.

Pollock, G., & Minuk, G. Y. (2017). Diagnostic considerations for cholestatic liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *32*(7), 1303-1309.

Pozniak, K. N., Pearen, M. A., Pereira, T. N., Kramer, C., Kalita-De Croft, P., Nawaratna, S. K., Fernandez-Rojo, M. A., Gobert, G. N., Tirnitz-Parker, J., Olynyk, J. K., Shepherd, R. W., Lewindon, P. J., & Ramm, G. A. (2017). Taurocholate induces biliary differentiation of liver progenitor cells causing hepatic stellate cell chemotaxis in the ductular reaction: Role in pediatric cystic fibrosis liver disease. *The American journal of pathology*, *187*(12), 2744-2757.

Preisegger, K. H., Factor, V. M., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Denk, H., & Thorgeirsson, S. S. (1999). Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *79*(2), 103-109.

Qin, L., & Beier, F. (2019). EGFR signaling: friend or foe for cartilage?. *JBMR plus*, *3*(2), e10177.

Racanelli, V., & Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*, *43*(2 Suppl 1), S54-S62.

- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*(22), 3100-3112.
- Riehle, K. J., Dan, Y. Y., Campbell, J. S., & Fausto, N. (2011). New concepts in liver regeneration. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *26 Suppl 1*(Suppl 1), 203-212.
- Rinella, M. E., Elias, M. S., Smolak, R. R., Fu, T., Borensztajn, J., & Green, R. M. (2008). Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *Journal of lipid research*, *49*(5), 1068-1076.
- Rmilah, A. A., Zhou, W., Nelson, E., Lin, L., Amiot, B., & Nyberg, S. L. (2019). Understanding the marvels behind liver regeneration. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *8*(3), e340.
- Roeb, E. (2018). Matrix metalloproteinases and liver fibrosis (translational aspects). *Matrix Biology*, *68*, 463-473.
- Roehlen, N., Crouchet, E., & Baumert, T. F. (2020). Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*, *9*(4), 875.
- Russell, W. E., Kaufmann, W. K., Sitaric, S., Luetkeke, N. C., & Lee, D. C. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- α -targeted mice. *Molecular carcinogenesis*, *15*(3), 183-189.
- Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K., & Berk, B. C. (2001). Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation. *Molecular and cellular biology*, *21*(19), 6387-6394.
- Samant, H., Manatsathit, W., Dies, D., Shokouh-Amiri, H., Zibari, G., Boktor, M., & Alexander, J. S. (2019). Cholestatic liver diseases: An era of emerging therapies. *World journal of clinical cases*, *7*(13), 1571-1581.
- Sánchez, A., & Fabregat, I. (2010). Growth factor-and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation. *World journal of gastroenterology*, *16*(41), 5148-5161.
- Sánchez, A., Pagan, R., Álvarez, A. M., Roncero, C., Vilaró, S., Benito, M., & Fabregat, I. (1998). Transforming growth factor- β (TGF- β) and EGF promote cord-like structures that indicate terminal differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *Experimental cell research*, *242*(1), 27-37.
- Sancho, P., Bertran, E., Caja, L., Carmona-Cuenca, I., Murillo, M. M., & Fabregat, I. (2009). The inhibition of the epidermal growth factor (EGF) pathway enhances TGF- β -induced apoptosis in rat hepatoma cells through inducing oxidative stress coincident with a change in the expression pattern of the NADPH oxidases (NOX) isoforms. *Biochimica et biophysica acta*, *1793*(2), 253-263.

Sandhu, J. S., Petkov, P. M., Dabeva, M. D., & Shafritz, D. A. (2001). Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells. *The American journal of pathology*, *159*(4), 1323-1334.

Santamaría, E., Rodríguez-Ortigosa, C. M., Uriarte, I., Latasa, M. U., Urtasun, R., Alvarez-Sola, G., Bárcena-Varela, M., Colyn, L., Arcelus, S., Jiménez, M., Deutschmann, K., Peleteiro-Vigil, A., Gómez-Cambronero, J., Milkiewicz, M., Milkiewicz, P., Sangro, B., Keitel, V., Monte, M. J., Marin, J., Fernández-Barrena, M. G., Ávila, M. A., & Berasain, C. (2019). The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin protects from cholestatic liver injury and regulates bile acids synthesis. *Hepatology*, *69*(4), 1632-1647.

Santoni-Rugiu, E., Jelnes, P., Thorgeirsson, S. S., & Bisgaard, H. C. (2005). Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion. *APMIS*, *113*(11-12), 876-902.

Sato, K., Marzioni, M., Meng, F., Francis, H., Glaser, S., & Alpini, G. (2019). Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. *Hepatology*, *69*(1), 420-430.

Sawada, N., Lee, G. H., Mochizuki, Y., & Ishikawa, T. (1988). Active proliferation of mouse hepatocytes in primary culture under defined conditions as compared to rat hepatocytes. *Japanese journal of cancer research*, *79*(9), 983-988.

Scaltriti, M., & Baselga, J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research*, *12*(18), 5268-5272.

Scheving, L. A., Zhang, X., Threadgill, D. W., & Russell, W. E. (2016). Hepatocyte ERBB3 and EGFR are required for maximal CCl4-induced liver fibrosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *311*(5), G807-G816.

Schiffer, E., Housset, C., Cacheux, W., Wendum, D., Desbois-Mouthon, C., Rey, C., Clergue, F., Poupon, R., Barbu, V., & Rosmorduc, O. (2005). Gefitinib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology*, *41*(2), 307-314.

Schneider, M. R., & Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology*, *218*(3), 460-466.

Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, *182*(3), 311-322.

Schulze, A., Nicke, B., Warne, P. H., Tomlinson, S., & Downward, J. (2004). The transcriptional response to Raf activation is almost completely dependent on mitogen-activated protein kinase kinase activity and shows a major autocrine component. *Molecular biology of the cell*, *15*(7), 3450-3463.

- Segatto, O., Anastasi, S., & Alemà, S. (2011). Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. *Journal of cell science*, 124(Pt 11), 1785-1793.
- Seitz, H. K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Mueller, S., Szabo, G., & Tsukamoto, H. (2018). Alcoholic liver disease. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 16.
- Seki, E., & Schwabe, R. F. (2015). Hepatic inflammation and fibrosis: functional links and key pathways. *Hepatology*, 61(3), 1066-1079.
- Seki, E., de Minicis, S., Inokuchi, S., Taura, K., Miyai, K., Van Rooijen, N., Schwabe, R. F., & Brenner, D. A. (2009). CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*, 50(1), 185-197.
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 343(6166), 84-87.
- Sharma, A., & Nagalli, S. (Actualizado 7 de Abril de 2021). Chronic liver disease. En: StatPearls (Internet). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554597/>
- Shilo, B. Z. (2005). Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development*, 132(18), 4017-4027.
- Shiota, G., Kunisada, T., Oyama, K., Udagawa, A., Nomi, T., Tanaka, K., Tsutsumi, A., Isono, M., Nakamura, T., Hamada, H., Sakatani, T., Sell, S., Sato, K., Ito, H., & Kawasaki, H. (2000). In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *FEBS letters*, 470(3), 325-330.
- Sibilia, M., & Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, 269(5221), 234-238.
- Sibilia, M., Wagner, B., Hoebertz, A., Elliott, C., Marino, S., Jochum, W., & Wagner, E. F. (2003). Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development*, 130(19), 4515-4525.
- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., & Di Fiore, P. P. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell*, 15(2), 209-219.
- Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(9), 609-622.

- Spear, B. T., Jin, L., Ramasamy, S., & Dobierzewska, A. (2006). Transcriptional control in the mammalian liver: liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 63(24), 2922-2938.
- Sun, Y. Y., Li, X. F., Meng, X. M., Huang, C., Zhang, L., & Li, J. (2017). Macrophage phenotype in liver injury and repair. *Scandinavian journal of immunology*, 85(3), 166-174.
- Suzuki, A., Sekiya, S., Onishi, M., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakauchi, H., & Taniguchi, H. (2008). Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology*, 48(6), 1964-1978.
- Svinka, J., Pflügler, S., Mair, M., Marschall, H. U., Hengstler, J. G., Stiedl, P., Poli, V., Casanova, E., Timelthaler, G., Sibilia, M., & Eferl, R. (2017). Epidermal growth factor signaling protects from cholestatic liver injury and fibrosis. *Journal of molecular medicine*, 95(1), 109-117.
- Takahashi, Y., Sugimoto, K., Inui, H., & Fukusato, T. (2015). Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*, 21(13), 3777-3785.
- Takemura, T., Yoshida, Y., Kiso, S., Kizu, T., Furuta, K., Ezaki, H., Hamano, M., Egawa, M., Chatani, N., Kamada, Y., Imai, Y., Higashiyama, S., Iwamoto, R., Mekada, E., & Takehara, T. (2013). Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(2), 185-191.
- Tan, E. K., Shuh, M., & Cohen, A. J. (2015). Liver injury models for induction of hepatic oval cells in rodents. *Journal of liver research, Disorders & Therapy*, 1(1), 15-27.
- Tan, S., Zhao, J., Sun, Z., Cao, S., Niu, K., Zhong, Y., Wang, H., Shi, L., Pan, H., Hu, J., Qian, L., Liu, N., & Yuan, J. (2020). Hepatocyte-specific TAK1 deficiency drives RIPK1 kinase-dependent inflammation to promote liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(25), 14231-14242.
- Tan, X., Lambert, P. F., Rapraeger, A. C., & Anderson, R. A. (2016). Stress-induced EGFR trafficking: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Trends in Cell Biology*, 26(5), 352-366.
- Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., & Miyajima, A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *The Journal of Biochemistry*, 149(3), 231-239.
- Tao, Y., Wang, M., Chen, E., & Tang, H. (2017). Liver regeneration: analysis of the main relevant signaling molecules. *Mediators of inflammation*, 2017, 4256352.

Tarantino, G., Conca, P., Pasanisi, F., Ariello, M., Mastrolia, M., Arena, A., Tarantino, M., Scopacasa, F., & Vecchione, R. (2009). Could inflammatory markers help diagnose nonalcoholic steatohepatitis?. *European journal of gastroenterology & hepatology*, *21*(5), 504-511.

Tarantino, G., Savastano, S., & Colao, A. (2010). Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance. *World journal of gastroenterology*, *16*(38), 4773-4783.

Tarlow, B. D., Pelz, C., Naugler, W. E., Wakefield, L., Wilson, E. M., Finegold, M. J., & Grompe, M. (2014). Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell stem cell*, *15*(5), 605-618.

Teis, D., Wunderlich, W., & Huber, L. A. (2002). Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Developmental cell*, *3*(6), 803-814.

Thomas, R., & Weihua, Z. (2019). Rethink of EGFR in cancer with its kinase independent function on board. *Frontiers in oncology*, *9*, 800.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., & Harris, R. C. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, *269*(5221), 230-234.

Tomas, A., Futter, C. E., & Eden, E. R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in cell biology*, *24*(1), 26-34.

Trivedi, P. J., Corpechot, C., Pares, A., & Hirschfield, G. M. (2016). Risk stratification in autoimmune cholestatic liver diseases: opportunities for clinicians and trialists. *Hepatology*, *63*(2), 644-659.

Trussoni, C. E., Tabibian, J. H., Splinter, P. L., & O'Hara, S. P. (2015). Lipopolysaccharide (LPS)-induced biliary epithelial cell NRas activation requires epidermal growth factor receptor (EGFR). *PLoS One*, *10*(4), e0125793.

Van Hul, N. K., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Horsmans, Y., & Leclercq, I. A. (2009). Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology*, *49*(5), 1625-1635.

Vannella, K. M., & Wynn, T. A. (2017). Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. *Annual review of physiology*, *79*, 593-617.

Verhulst, S., Best, J., van Grunsven, L. A., & Dollé, L. (2015). Advances in hepatic stem/progenitor cell biology. *EXCLI journal*, *14*, 33-47.

Vilar-Gomez, E., Martinez-Perez, Y., Calzadilla-Bertot, L., Torres-Gonzalez, A., Gra-Oramas, B., Gonzalez-Fabian, L., Friedman, S. L., Diago, M., & Romero-Gomez, M.

(2015). Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, *149*(2), 367-378.

Wagner, B., Natarajan, A., Grünaug, S., Kroismayr, R., Wagner, E. F., & Sibilio, M. (2006). Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *The EMBO journal*, *25*(4), 752-762.

Wang, H., Lafdil, F., Kong, X., & Gao, B. (2011). Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *International journal of biological sciences*, *7*(5), 536-550.

Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., & Grompe, M. (2003). The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100* Suppl 1(Suppl 1), 11881-11888.

Wang, Z., Wang, M., & Carr, B. I. (2008). Integrin α 5-induced EGFR activation by prothrombin triggers hepatocyte apoptosis via the JNK signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, *216*(2), 551-557.

Warming, S., Costantino, N., Court, D. L., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. (2005). Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic acids research*, *33*(4), e36.

Webber, E. M., Fitzgerald, M. J., Brown, P. I., Bartlett, M. H., & Fausto, N. (1993). Transforming growth factor- α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- α and hepatocyte growth factor. *Hepatology*, *18*(6), 1422-1431.

Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, *9*(5), 52.

Weiskirchen, R., & Tacke, F. (2016). Liver fibrosis: from pathogenesis to novel therapies. *Digestive Diseases*, *34*(4), 410-422.

Weiskirchen, R., Weiskirchen, S., & Tacke, F. (2018). Recent advances in understanding liver fibrosis: bridging basic science and individualized treatment concepts. *F1000Research*, *7*, F1000 Faculty Rev-921.

Werneburg, N. W., Yoon, J. H., Higuchi, H., & Gores, G. J. (2003). Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, *285*(1), G31-G36.

Weston, C. R., & Davis, R. J. (2007). The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology*, *19*(2), 142-149.

- Wieckowska, A., Papouchado, B. G., Li, Z., Lopez, R., Zein, N. N., & Feldstein, A. E. (2008). Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *The American Journal of gastroenterology*, *103*(6), 1372-1379.
- Williams, M. J., Clouston, A. D., & Forbes, S. J. (2014). Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology*, *146*(2), 349-356.
- Woodward, E. A., Prêle, C. M., Nicholson, S. E., Kolesnik, T. B., & Hart, P. H. (2010). The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). *Immunology*, *131*(1), 118-127.
- Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2015). Critical factors in the assessment of cholestatic liver injury in vitro. *Methods in molecular biology*, *1250*, 363-376.
- Woolbright, B. L., & Jaeschke, H. (2019). Inflammation and cell death during cholestasis: the evolving role of bile acids. *Gene expression*, *19*(3), 215-228.
- Woolbright, B. L., Dorko, K., Antoine, D. J., Clarke, J. I., Gholami, P., Li, F., Kumer, S. C., Schmitt, T. M., Forster, J., Fan, F., Jenkins, R. E., Park, B. K., Hagenbuch, B., Olyae, M., & Jaeschke, H. (2015). Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis. *Toxicology and applied pharmacology*, *283*(3), 168-177.
- Wree, A., McGeough, M. D., Inzaugarat, M. E., Eguchi, A., Schuster, S., Johnson, C. D., Peña, C. A., Geisler, L. J., Papouchado, B. G., Hoffman, H. M., & Feldstein, A. E. (2018). NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: Roles of IL-17 and TNF in mice. *Hepatology*, *67*(2), 736-749.
- Xiang, S., Dong, H. H., Liang, H. F., He, S. Q., Zhang, W., Li, C. H., Zhang, B. X., Zhang, B. H., Jing, K., Tomlinson, S., van Rooijen, N., Jiang, L., Cianflone, K., & Chen, X. P. (2012). Oval cell response is attenuated by depletion of liver resident macrophages in the 2-AAF/partial hepatectomy rat. *PLoS One*, *7*(4), e35180.
- Xu, H., Liu, L., Cong, M., Liu, T., Sun, S., Ma, H., You, H., Jia, J., & Wang, P. (2020). EGF neutralization antibodies attenuate liver fibrosis by inhibiting myofibroblast proliferation in bile duct ligation mice. *Histochemistry and cell biology*, *154*(1), 107-116.
- Yamashita, M., Chattopadhyay, S., Fensterl, V., Saikia, P., Wetzel, J. L., & Sen, G. C. (2012). Epidermal growth factor receptor is essential for Toll-like receptor 3 signaling. *Science signaling*, *5*(233), ra50.
- Yamazaki, Y., Moore, R., & Negishi, M. (2011). Nuclear receptor CAR (NR1H3) is essential for DDC-induced liver injury and oval cell proliferation in mouse liver. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *91*(11), 1624-1633.
- Yeh, S. H., & Chen, P. J. (2010). Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology*, *78* Suppl 1, 172-179.

- Yeoh, G. C., Ernst, M., Rose-John, S., Akhurst, B., Payne, C., Long, S., Alexander, W., Croker, B., Grail, D., & Matthews, V. B. (2007). Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology*, *45*(2), 486-494.
- Yovchev, M. I., Grozdanov, P. N., Zhou, H., Racherla, H., Guha, C., & Dabeva, M. D. (2008). Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology*, *47*(2), 636-647.
- Zhang, L. J., Zheng, W. D., Chen, Y. X., Huang, Y. H., Chen, Z. X., Zhang, S. J., Shi, M. N., & Wang, X. Z. (2007a). Antifibrotic effects of interleukin-10 on experimental hepatic fibrosis. *Hepato-gastroenterology*, *54*(79), 2092-2098.
- Zhang, X., Pickin, K. A., Bose, R., Jura, N., Cole, P. A., & Kuriyan, J. (2007b). Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature*, *450*(7170), 741-744.
- Zhang, Y., Hong, J. Y., Rockwell, C. E., Copple, B. L., Jaeschke, H., & Klaassen, C. D. (2012). Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver. *Liver International*, *32*(1), 58-69.
- Zhao, W. M., Qin, Y. L., Niu, Z. P., Chang, C. F., Yang, J., Li, M. H., Zhou, Y., & Xu, C. S. (2016). Branches of the NF- κ B signaling pathway regulate proliferation of oval cells in rat liver regeneration. *Genetics and molecular research*, *15*(1), gmr15017750.
- Zhou, W. C., Zhang, Q. B., & Qiao, L. (2014). Pathogenesis of liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology*, *20*(23), 7312-7324.

